



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI
ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU

UNIVERSITAS



GALATIENSIS

MINISTERUL EDUCAȚIEI, CERCETĂRII, TINERETULUI ȘI SPORTULUI
UNIVERSITATEA "DUNĂREA DE JOS" DIN GALAȚI
FACULTATEA DE MECANICĂ
DOMENIUL INGINERIE INDUSTRIALĂ

Teză de doctorat - Rezumat

**Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu
aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă**

Autor chim. Simona Patriche

Conducător științific

Prof. dr. ing. Mihaela Banu

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Galați, 2012

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Mulțumiri

În primul rând aș dori să îmi exprim mulțumirea față de coordonatorii mei științifici, prof. dr. ing. Mihaela Banu și prof. dr. ing. Bogdan Epureanu pentru suportul și îndrumarea activității mele de cercetare în acest domeniu complex al motoarelor moleculare, ce reprezintă o adevărată provocare pentru diverse domenii de cercetare.

Mulțumesc în mod deosebit d-lui. prof.dr.ing. Taiji Adachi (Kyoto University, RIKEN Innovation Center), d-lui. dr. Sung-Woong Han (Kyoto University, RIKEN Innovation Center), d-nei. dr. Hiromi Miyoshi (RIKEN Innovation Center), d-lui. prof. Akitake Makinouchi (RIKEN Innovation Center) și d-nei. Atsuko Kanda (RIKEN Innovation Center) pentru colaborarea deosebită pe toată durata stagiului de cercetare la RIKEN Innovation Center - Computational Cell Biomechanics Team (VCAD System Research Program), Japonia, concretizată în studii experimentale cu ajutorul microscopiei de forță atomică și numeroase studii numerice pe baza simulărilor de dinamică moleculară. Le mulțumesc în același timp pentru sfaturile și încurajările lor, în momente esențiale ale acestui stagiu de cercetare.

De asemenea, doresc să adresez sincere mulțumiri d-nei. prof. Marileen Dogterom (directorul grupului "Bio-assembly &-organization" de la FOM Institute AMOLF Amsterdam (Olanda)) și tuturor membrilor acestui grup pentru posibilitatea de a realiza studii experimentale cu ajutorul tehnicii "optical tweezers".

Mulțumesc membrilor din comisia de îndrumare, conf. dr. ing. Felicia Stan și conf. dr. chim. Rodica-Mihaela Dinică, pentru valoroasele comentarii și sugestii oferite în scopul finalizării acestei teze de doctorat.

Sincere mulțumiri conducerii și tuturor cadrelor didactice din cadrul Facultății de Mecanică.

Mulțumesc foștilor colegi din perioada doctoratului, Olguța Marinescu, Mitică Afteni și Florin Susac, pentru sprijinul și ajutorul acordat de-a lungul celor trei ani.

Elaborarea acestei teze a fost realizată cu suportul financiar al proiectului POSDRU cod 88/1.5/S/61445 - Eficientizarea activității studenților din cadrul ciclului de studii doctorale-EFICIENT.

Dedic această teză de doctorat familiei mele, care mi-a oferit sprijinul și încurajarea continuă pentru finalizarea acestei lucrări.

chim. Simona Patriche

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

*Orice mecanism descoperit în știință este o fereastră
către natură și fiecare din aceste ferestre contribuie la dezvoltarea
viziunii noastre asupra tuturor lucrurilor care ne înconjoară.*

(Cecil Frank Powell)

Cuprins

Introducere	5
Capitolul 1. Stadiul actual al cercetării transportului intracelular	6
1.1. Introducere	6
1.2. Modele mecanice	6
1.3. Dispozitive cu rigiditate variabilă	6
Direcții de cercetare	9
Capitolul 2. Algoritmul de simulare a solicitării la tracțiune aplicată proteinelor	10
2.1. Introducere	10
2.2. Algoritmul de simulare a încercărilor mecanice aplicate kinezinei	10
2.3. Dinamica moleculară	11
2.3.1. Simularea cu ajutorul dinamicii moleculare a pierderii stabilității ”neck linker”-ului	12
2.3.2. Modelarea testului de tracțiune a ”neck linker”-ului cu ajutorul metodei de dinamică moleculară direcționată (SMD)	16
2.4. Optimizarea etapei de echilibrare la proteinele scurte	17
2.5. Concluzii	18
Capitolul 3. Identificarea rigidității kinezinei în cazul deformațiilor constante	20
3.1. Introducere	20
3.2. Identificarea rigidității ”neck linker”-ului în cazul deformațiilor mici	20
3.3. Identificarea rigidității ”neck linker”-ului în cazul deformațiilor mari	22
3.4. Concluzii	24
Capitolul 4. Identificarea rigidității kinezinei în cazul deformațiilor instantanee	25
4.1. Introducere	25
4.2. Cercetări experimentale privind caracterizarea structurală și identificarea rigidității microtubulilor	25
4.2.1. Principiul metodei	25
4.2.2. Caracterizarea structurală a microtubulilor folosind etapa de imagistică în aer și mediul lichid	27

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

4.2.3. Măsurarea rigidității caracteristice microtubulilor în mediul lichid	28
4.3. Cercetări numerice privind identificarea rigidității microtubulilor în cazul deformațiilor instantanee	31
4.3.1. Algoritmul utilizat în investigațiile privind efectul rotenonei asupra structurii microtubulilor	32
4.3.2. Evaluarea stării de funcționalitate a structurii de microtubuli	34
4.4. Concluzii	36
Capitolul 5. Validarea experimentală a comportării kinezinei la deplasarea sub sarcină constantă	37
5.1. Introducere	37
5.2. Principiul metodei	37
5.3. Studiul procesivității kinezinei convenționale	38
5.4. Analiza parametrilor procesivității motorului proteic, Tea2 atât în absența cât și în prezența proteinelor, Mal3 și Tip1	40
5.5. Investigații privind mecanismul de generare a forței caracteristice motorului proteic monomolecular, Tea2 folosind tehnica ”optical tweezers” cu sistemul „force-feedback”	42
5.6. Concluzii	44
Capitolul 6. Concluzii și contribuții personale	46
6.1. Concluzii	46
6.2. Contribuții personale	47
6.3. Direcții viitoare de cercetare	49
Bibliografie selectivă	50

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Introducere

Modelarea transportului intracelular realizat de către sistemul kinezină-microtubuli are importante aplicații atât în domeniul ingineriei cât și cel al nanomedicinii. Acest sistem constituie elementul cheie în realizarea transportului intracelular direcționat al diverselor încărcări la nivelul celulelor polarizate: neuroni și celule epiteliale. Transportul intracelular este procesul prin care motoarele moleculare se deplasează de-a lungul filamentelor de citoscheletal pentru a facilita deplasarea în salturi într-un mod dependent de hidroliza ATP-ului [Alberts et al., 2008], [Hirokawa et al., 2008]. Direcționalitatea transportului intracelular realizat de către sistemul kinezină-microtubuli este determinată de către interacțiunile dintre motorul proteic și microtubuli. În general, motoarele moleculare de tip kinezină se deplasează spre capătul plus al microtubulilor, ceea ce determină transportul sarcinilor celulare (organite, vezicule) de la centrul celulei spre periferia acesteia. Acest tip de transport este cunoscut sub numele de transport anterograd [Hirokawa et al., 2008]. Necesitatea unei modelări mecano-chimice a transportului intracelular realizat de către sistemul kinezină-microtubuli se dovedește a fi esențială în înțelegerea mecanismului de funcționare al acestui sistem, ale cărui particularități pot fi preluate pentru a proiecta diverse nanodispozitive, cum ar fi nanopompele, nanoarcurile și biosenzorii.

Motivația încadrării acestei teze în domeniul ingineriei industriale

Cercetarea este multidisciplinară, iar principiile biomimetice care se desprind se pot utiliza în proiectarea și experimentarea unor dispozitive nano sau micrometrice. Lucrarea are ca scop extragerea unor principii de comportare a unui motor molecular la transportul unei încărcări variabile, întâlnind obstacole. Lucrarea are ca obiective: (1) obținerea diagramei forța de încărcare – rigiditate; (2) crearea unui model de predicție a rigidității în condiții de încărcare variabilă. Rigiditatea acestui motor molecular la schimbarea încărcării redă variația. Construcția unui arc care să aibă rigiditate variabilă în condiții de vâscozitate variabilă, este o aplicație care necesită cunoștințe de mecanică, construcții de mașini, chimie și biologie. Iată de ce, această teză poate fi încadrată în domeniul ingineriei industriale.

Capitolul 1. Stadiul actual al cercetării transportului intracelular

1.1. Introducere

În cadrul acestui capitol au fost analizate modelele mecanice propuse pentru a descrie dinamica motorului molecular de tip kinezină și mecanismul de generare a forței caracteristice motorului molecular de tip kinezină și respectiv, prototipurile dispozitivelor cu rigiditate variabilă ce prezintă o serie de particularități ce pot fi identificate în principiul biomimetic al acestui tip de mașini biomoleculare. S-au stabilit obiectivele acestei teze de doctorat și anume: conceperea algoritmului de modelare a solicitării mecanice la tracțiunea aplicată proteinelor, identificarea rigidității kinezinei în funcție de deformațiile constante, identificarea rigidității kinezinei în funcție de deformațiile instantanee, validarea experimentală a comportării kinezinei la deplasarea sub sarcină constantă.

1.2 Modele mecanice

Din literatura de specialitate s-au identificat patru modele mecanice principale, care descriu dinamica motorului molecular de tip kinezină: modelul mecanic propus de Peskin și Oster, 1995, care explică ciclul mecano-chimic al kinezinei convenționale în timpul deplasării de-a lungul microtubulilor [Peskin et al., 1995]; modelul schimbărilor conformaționale din structura de "neck linker" a kinezinei convenționale dezvoltat de către [Mogilner et al., 2001], care este un model fenomenologic pentru generarea forței în kinezină pe baza comportamentului "neck linker"-ului dependent de nucleotida bi-stabilă; modelul mecanic propus de Alzberger și Peskin, în 2006, ce este un model mecanic tridimensional al kinezinei considerând elementele structurale ale motorului molecular [Alzberger et al., 2006]; cel mai complet model mecanic este cel propus de [Hendricks et al., 2008], ce redă cu mare fidelitate mecanismul deplasării kinezinei convenționale de-a lungul microtubulilor descriind în mod deterministic mișcarea medie a kinezinei în timp și spațiu variind încărcările.

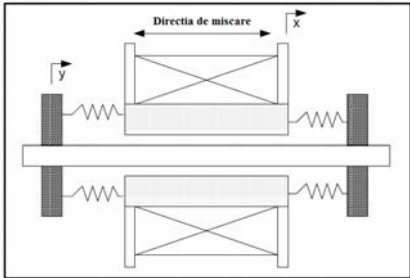
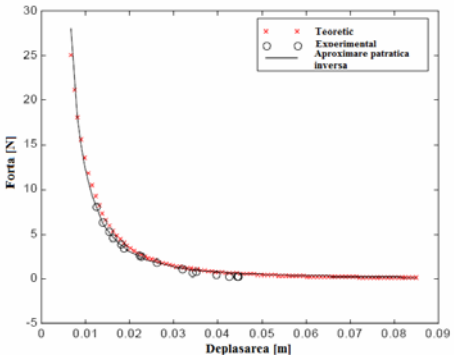
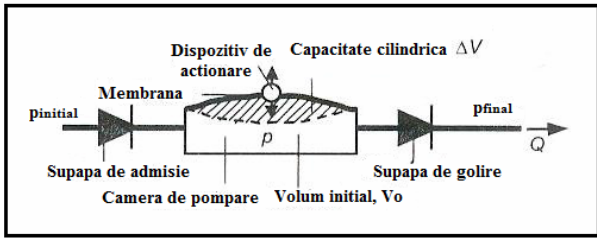
1.3. Dispozitive cu rigiditate variabilă

Dispozitivele cu rigiditate variabilă sunt acele dispozitive ce conțin în structura lor o caracteristică de recondiționare a forței, ca urmare a prezenței unui arc sau unui sistem de arcuri în componența acestor dispozitive. Aplicabilitatea acestor dispozitive este însemnată atât la

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

scară macro (amortizoare de vibrații, izolatoare de vibrații, dispozitive cu structuri inteligente de variere a rigidității) cât și la scară nano (nanopompe, nanoarcuri de amortizare ale șocurilor și diverși senzori). Datorită similitudinii dintre mecanismul de funcționare al acestor dispozitive la scară macro și nano cu principiul biomimetic al motorului molecular de tip kinezină, înțelegerea în detaliu a mecanismului de funcționare a sistemului kinezină-microtubuli s-a dovedit a fi o provocare atât pentru domeniul ingineriei cât și pentru cel al nanomedicinii. În tabelul 1.1 sunt prezentate o serie de dispozitive cu rigidități variabile la scară macro și nano, precizându-se principale caracteristici și respectiv, mecanismul de funcționare al acestora.

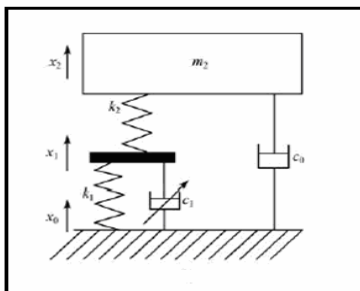
Tabelul 1.1. Dispozitive mecanice cu rigiditate variabilă

DISPOZITIVE MACRO	DISPOZITIVE NANO
<p data-bbox="284 779 667 808">Amortizoare de vibrații acordate</p> <ul data-bbox="172 831 778 1133" style="list-style-type: none"> - au rolul de a atenua vibrațiile structurale, prin adăugarea unei mase, a unui arc sau a unui amortizor; - dinamica sistemului este invariantă; - viteza funcționării este cuprinsă într-un interval limitat al frecvenței; - introducerea unui generator de forță în paralel cu un arc asigură un control structural activ; - în figura de mai jos este prezentată configurația sistemului de arcuri din amortizoarele de vibrații acordate:  <p data-bbox="188 1480 762 1529">Configurația sistemului de arcuri din amortizoarele de vibrații acordate [Tentor et al., 2001]</p> <ul data-bbox="172 1563 778 1619" style="list-style-type: none"> - acest tip de dispozitive prezintă următoarea caracteristică forță - deplasare  <p data-bbox="284 2029 667 2058">Forță versus deplasare [Tentor et al., 2001]</p>	<p data-bbox="986 741 1241 770">DISPOZITIVE NANO</p> <p data-bbox="1042 779 1185 808">Nanopompe</p> <ul data-bbox="810 831 1425 1111" style="list-style-type: none"> - Componentele de bază a unei nanopompe: <ul data-bbox="850 864 1425 1048" style="list-style-type: none"> - camera de pompare atașată la diafragma de deplasare (membrana); - un mecanism de acționare; - dispozitiv de alimentare (linia de absorbire) și un dispozitiv de golire (linia de descărcare); - două valve pasive de verificare. - în figura de mai jos este prezentată structura unei nanopompe cu elementele componente:  <p data-bbox="826 1473 1409 1529">Structura unei nanopompe (http://www.ac.tut.fi/aci/courses/ACI-51406/mat/pdf/Mechanical%20Micropumps.pdf)</p> <p data-bbox="810 1563 1425 1865">Mecanismul de funcționare:</p> <ul data-bbox="850 1585 1425 1865" style="list-style-type: none"> - actuatorul (elementul de acționare) crește și scade în mod alternativ volumul camerei de pompare prin aplicarea diferitelor forțe la diafragmă; - fluidul este absorbit în timpul expansiunii și eliberat în timpul contracției; - valvele pasive de verificare sunt folosite pentru a orienta procesul de curgere în interiorul și în afara camerei de pompare. <ul data-bbox="810 1899 1425 1989" style="list-style-type: none"> - motoarele moleculare de tip kinezină ar putea îndeplini funcția de actuator (element de acțiune) pentru a acționa valvele dintr-o nanopompă [Hess et al., 2011].

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Izolatoare de vibrații

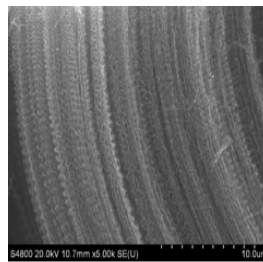
- sunt folosite pentru a separa sursa de excitație a vibrațiilor de obiectul protejat cu scopul de a reduce efectul negativ al vibrației nedorite ce provine de la sursa de excitație;
- modelarea structurii sistemelor de izolare a vibrațiilor este realizată cu ajutorul arcurilor liniare;
- modelul fizic simplificat al izolatorului de vibrații este prezentat în următoarea figură:



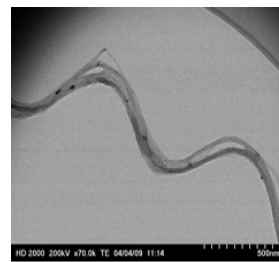
Modelul fizic simplificat al izolatorului de vibrații, ce conține două arcuri și un amortizor al structurii izolatorului [Zhou et al., 2009]

Nanoarcuri de amortizare a șocurilor

- au fost obținute din nanotuburi de carbon sub formă elicoidală;
- straturi de acest tip de nanoarcuri ar putea acționa sub forma unor amortizoare de șocuri, oferind astfel posibilitatea de a proteja diverse obiecte delicate împotriva diverselor impacte;
- reprezentarea schematică a structurii acestor nanodispozitive este prezentată în figura de mai jos:



Bed of coiled nanotubes

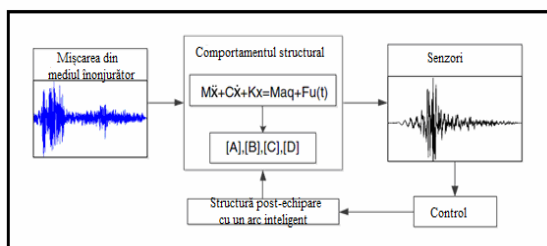


A few strands of coiled nanotubes

Structura nanoarcurilor de amortizare a șocurilor [Wang et al., 2008]

Dispozitive cu structuri inteligente de variație a rigidității

- scopul principal al proiectării acestor dispozitive este de a diminua efectele seismice, ce au un efect distructiv asupra diferitelor clădiri în urma producerii cutremurilor;
- acest tip de dispozitive are rolul de a controla rigiditățile structurale cu scopul de a diminua răspunsul vibrațiilor structurale;
- schema unui sistem ce conține structuri inteligente este prezentată mai jos:



Schema unui sistem ce conține structuri inteligente [Duerr et al., 2012]

- Comportamentul structural al acestui sistem este redat prin următorii parametri caracteristici: M (masa unei clădiri), C (coeficientul de amortizare), k (rigiditatea), a_g (acelerația unei excitații externe, cum ar fi: un cutremur), F și $u(t)$ reprezintă locația și mărimea forței de control. Îmbunătățirea structurală a performanței seismice se poate realiza prin modificarea unuia sau a mai multor parametri [Duerr et al., 2012].

Senzori de adaptare la diferitele variații de presiune și deformații [Lipomi et al., 2011]

- sunt alcătuiți dintr-o membrană elastică, transparentă, ce conține nanotuburi din carbon, având capacitatea de a-și schimba forma ca urmare a acțiunii presiunii și a factorilor externi. Această capacitate de schimbare a formei membranei se datorează organizării sub forma unor nanoarcuri a nanotuburilor din carbon, în urma procesului întindere, urmat de perioade repetate de relaxare.



Structura senzorilor de adaptare la diferitele variații de presiune și deformații [Lipomi et al., 2011]

- în figura de mai sus este prezentată o schemă reprezentativă a structurii senzorilor de adaptare la diferitele variații de presiune și deformații;
- Această membrană prezintă proprietățile elastice asemănătoare pielii oferind posibilitatea să fie alungită de două ori mai mult decât mărimea ei normală, în timp ce este menținută constantă conductivitatea. Această membrană ar putea fi utilizată în realizarea dispozitivelor protetice (proteze).

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Direcții de cercetare

În urma analizei cercetărilor realizate privind modelarea mecanismului de deplasare a motorului molecular de tip kinezină de-a lungul microtubulilor și identificarea posibilelor aplicații ingineresti ale sistemului kinezină-microtubuli sub formă de dispozitive cu rigiditate variabilă, au rezultat următoarele direcții de cercetare ale acestei teze de doctorat:

- **Conceperea algoritmului de modelare a solicitării mecanice la tracțiunea aplicată proteinelor** - se va realiza prin modelarea structurală a efectelor mecanice/încărcărilor asupra transformărilor conformaționale din domeniile caracteristice kinezinei, cum ar fi structura de "neck linker" și zona de atașare a capătului globular al kinezinei la microtubuli;
- **Identificarea rigidității kinezinei în funcție de deformațiile constante** – aceste deformații vor fi simulate cu ajutorul simulărilor de dinamică prin aplicarea unor forțe constante în intervalele [2-15 pN] (deformații mici) și respectiv, [700-1400 pN] (deformații mari);
- **Identificarea rigidității kinezinei în funcție de deformațiile instantanee** – acest tip de deformații sunt asociate cu obstacolele prezente în structura de microtubuli, ce reprezintă sistemul celular de-a lungul căruia se deplasează kinezina. Analiza rigidității kinezinei în cazul acestor deformații se va realiza prin caracterizarea structurală și mecanică a microtubulilor cu ajutorul atât al cercetărilor experimentale efectuate folosind microscopia de forță atomică cât și al celor numerice realizate cu ajutorul simulărilor de dinamică moleculară;
- **Validarea experimentală a comportării kinezinei la deplasarea sub sarcină constantă** – se va realiza prin evaluarea dinamicii și procesului de generare a forței caracteristice motoarelor moleculare de tip kinezină în timpul deplasării de-a lungul microtubulilor folosind tehnica "optical tweezers".

Capitolul 2. Algoritm de simulare a solicitării la tracțiune aplicată proteinelor

2.1. Introducere

În acest capitol, se propune o metodă de modelare a solicitării la tracțiune aplicată unui subsistem al kinezinei, și anume "neck linker"-ul, care reprezintă componenta ce participă la tracțiunea unei încărcări. Se cunoaște faptul că această proteină scurtă (13 aminoacizi, lungime 35,56 Å) are o comportare diferită, neliniară, atunci când kinezina trebuie să transporte sarcini diferite. Pentru a afla care sunt cauzele unei comportări neliniare în mecanismul de deplasare al kinezinei, se propune o metodă de modelare a solicitării de tracțiune ce se va aplica "neck linker"-ului moleculei monomerice de kinezină convențională, PDB ID: 1MKJ. Precizia răspunsului la solicitări este dată de o serie de secvențe ce trebuie urmărite în modelarea cu dinamică moleculară. Aceste secvențe constituie algoritmul de modelare a solicitării la tracțiune. Gradul de incertitudine al acestei modelări este mare, având în vedere complexitatea fenomenelor chimice, termice și mecanice ce participă la deplasarea kinezinei. Pentru a crește gradul de încredere în rezultate, la fiecare secvență a algoritmului se introduc elemente de validare prin analiza statistică, urmărindu-se obținerea echilibrului energetic la fiecare etapă.

2.2. Algoritm de simulare a încercărilor mecanice aplicate kinezinei

Algoritm de simulare a încercărilor mecanice aplicate kinezinei are la bază simulările de dinamică moleculară efectuate cu ajutorul programului de dinamică moleculară, NAMD și respectiv, a programului de grafică moleculară VMD. Schema algoritmului de simulare a încercărilor mecanice aplicate kinezinei este prezentată în Fig. 2.1. Modelarea interacțiunilor la nivel molecular în vederea simulării aplicării unor forțe de tracțiune asupra lanțurilor de proteine din kinezina supusă discuției, presupune parcurgerea unor etape similare cu cele din modelarea la nivel macroscopic. În mod particular, în modelarea la nivel molecular, modelul geometric (fișier *.pdb (Protein Data Bank)) este obținut prin cristalizarea proteinei și obținerea poziției geometrice bidimensionale (x,y) a centroidelor fiecărei molecule din lanțul proteic față de un sistem de referință comun. Fiecărei centroide i se asociază o dimensiune de moleculă de aminoacid care are diferite potențiale de legătură cu ioni pozitivi sau negativi din proximitate prin intermediul valențelor atomilor înconjurători. Spre exemplu, un aminoacid se leagă cu un

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

atom de carbon (C) cu legătura simplă și cu O₂ cu legătură dublă la gruparea amino din următorul aminoacid.

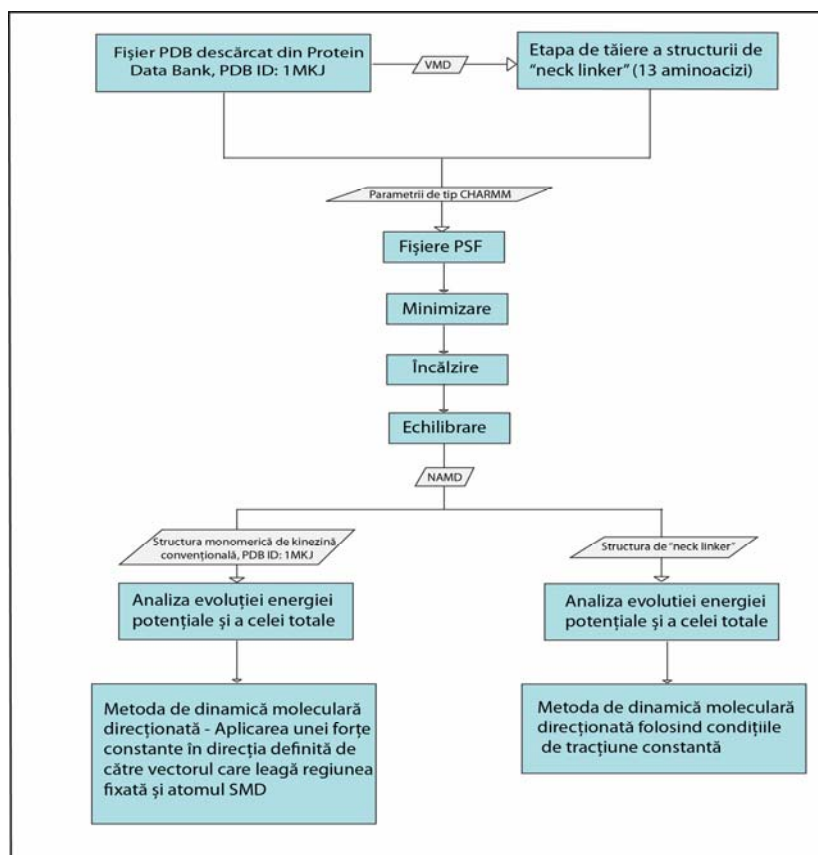


Fig 2.1. Schema algoritmului utilizat în analiza proprietăților structurale și mecanice ale domeniilor motorului molecular de tip kinezină

Acest algoritm a fost utilizat pentru a analiza comportamentul mecanic și schimbările conformaționale caracteristice domeniilor esențiale în mecanismul de deplasare a kinezei de-a lungul microtubulilor. Domeniile motorului molecular de tip kinezină supuse analizei au fost următoarele: zona de atașare la microtubuli, structura de "neck linker" și o parte din domeniul de răsucire în alfa-helix din structura monomerică a acestui motor proteic.

2.3. Dinamica moleculară

Dinamica moleculară reprezintă o metodă de simulare numerică a deplasărilor fizice ale atomilor și ale moleculelor dintr-un lanț de proteine în cazul de față. Simulările de dinamică moleculară au rolul de a calcula traiectoriile atomice prin rezolvarea ecuațiilor de mișcare folosind câmpurile de forță empirice, cum ar fi câmpurile de forță CHARMM, ce aproximează forțele atomice existente în sistemele biopolimerice.

În cele ce urmează se va folosi metoda de dinamică direcționată folosind condițiile de tracțiune la forță constantă pentru a analiza comportamentul "neck linker"-ului în cazul aplicării

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

unor solicitări mecanice de tracțiune. "Neck linker"-ul kinezinei convenționale constituie elementul cheie în deplasarea kinezinei și mecanismul de generare a forței [Case et al., 2000], [Czövek et al., 2008] în cazul transportării diverselor vezicule și organite de-a lungul microtubulilor (Fig. 2.2).

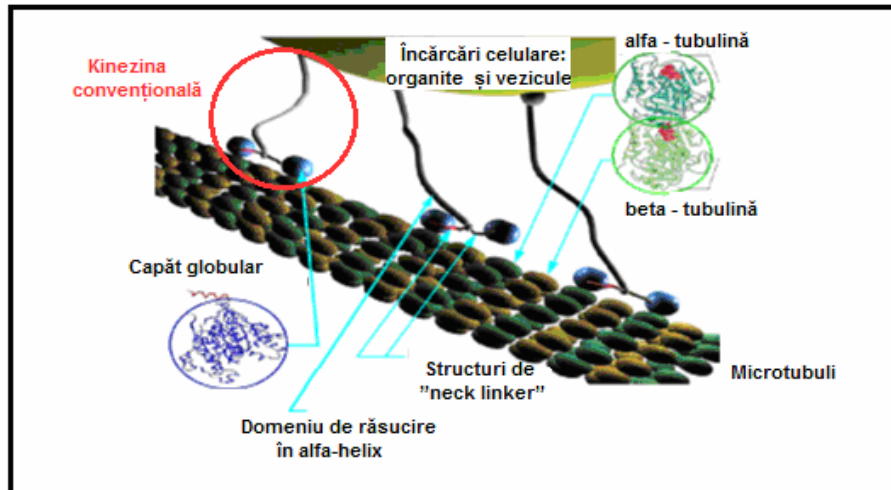


Fig. 2.2. Reprezentarea schematică a transportului diverselor vezicule și organite de-a lungul microtubulilor realizat de către motorul molecular, kinezina convențională (<http://www-personal.umich.edu/~epureanu/>)

În comparație cu cercetările numerice privind comportamentul mecanic al structurii de "neck linker" în funcție de forțele aplicate, realizate de către [Hariharan et al., 2009], cele efectuate de către noi cu ajutorul algoritmului dezvoltat în cadrul acestui capitol oferă posibilitatea de a identifica rigiditatea "neck linker"-ului și de a explica în detaliu comportamentul neliniar al acestui segment.

2.3.1. Simularea cu ajutorul dinamicii moleculare a pierderii stabilității "neck linker"-ului

S-a observat că la anumite forțe de solicitare a lanțului proteic al "neck linker"-ului, rigiditatea acestuia variază, astfel încât capacitatea portantă a acestuia crește după care scade brusc. Pentru a investiga mecanismul de pierdere a stabilității și implicit a portanței acestuia, acest paragraf se referă la un studiu al dependenței dintre forța aplicată "neck linker"-ului și răspunsul acestuia prin prisma analizei legăturilor sale de hidrogen.

Metode și materiale

Pentru a studia evoluția legăturilor de hidrogen din structura de "neck linker" a kinezinei convenționale s-a utilizat metoda de dinamică moleculară direcționată (SMD), realizată cu

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

ajutorul programelor NAMD 2.7b2 [Phillips et al., 2005] și VMD 1.8.7 [Humphrey et al., 1996], folosind parametrii CHARMM pentru proteine și lipide [Mackerell et al., 1998]. În cazul acestor simulări, s-a utilizat o structură monomerică a kinezinei convenționale de tip uman, ce a fost obținută din banca de proteine (PDB ID: 1MKJ). Această structură cristalină reprezintă structura monomerică a kinezinei convenționale, fiind formată din 349 de reziduuri [Sindelar et al., 2002], unde "neck linker"-ul este definit între reziduurile 325-337 (Fig. 2.3). Acest segment scurt (13 aminoacizi) face legătura între capătul globular al kinezinei convenționale și domeniul de răsucire în α -helix, ce are rol în stabilizarea motorului dimeric și conduce la formarea unui domeniu globular implicat în procesul de atașare a încărcării celulare [Hahlen et al., 2007].

Structura monomerică a kinezinei convenționale cu dimensiunile ($60 \times 68 \times 45 \text{ \AA}^3$) a fost plasată în interiorul unei cutii de apă cu dimensiunile ($80 \times 88 \times 65 \text{ \AA}^3$) și grosimea stratului de apă egală cu 15 \AA , folosind modelul TIP3P pentru moleculele de apă și adăugând ioni Na^+ și Cl^- , cu o concentrație egală cu 30 mM (Fig. 2.4). După introducerea acestei structuri în interiorul cutiei de apă, sistemul total conține 42741 de atomi, din care 5306 atomi reprezintă structura de "neck linker", 37435 atomii moleculelor de apă, 36 ioni Na^+ și 33 ioni Cl^- . Interacțiunile van der Waals au fost calculate folosind o valoare a distanței limită de 12 \AA , iar cele electrostatice cu ajutorul metodei Particle Mesh Ewald [Darden et al., 1993].

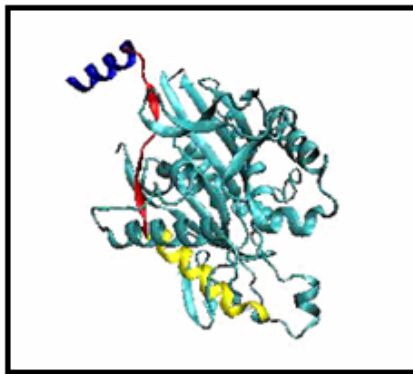


Fig.2.3. Structura monomerică a kinezinei convenționale (PDB ID: 1MKJ) reprezentată în editorul VMD: "neck linker"-ul (reziduurile 325-337, regiunea roșie) face legătura între ultimul alfa helix din domeniul catalitic central, α -6 (zona galbenă) și primul alfa helix din domeniul de răsucire în alfa-helix, α -7 (zona albastră)

Un algoritm "multiple time-stepping" [Schlick et al., 1999] a fost utilizat timp de 500 ps cu o valoare a pasului egală cu 2 fs. Simulările de dinamică moleculară au fost efectuate într-un ansamblu NPT (presiunea = 1atm, temperatura de 300 K), în care presiunea a fost controlată cu ajutorul metodei pistonului hibrid Nosé – Hoover Langevin [Hoover, 1999], [Martyna et al.,

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

[1992], iar temperatura a fost controlată folosind metoda Langevin în faza de echilibru [Matsushita et al., 2010]. S-a efectuat o dinamică liberă pentru întreg sistemul timp de 600 ps cu scopul obținerii unei structuri echilibrate.

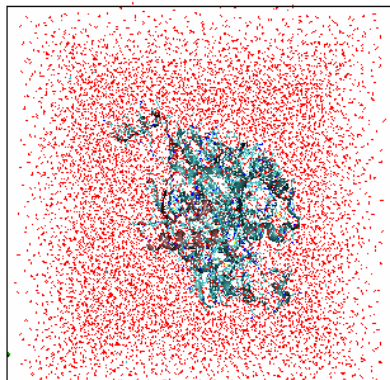


Fig. 2.4. Structura kinezinei convenționale în cutia de apă cu grosimea stratului de apă egală cu 15 Å

Metoda de dinamică moleculară direcționată (SMD) – kinezina convențională

Se crează un fișier de tip pdb, în care sunt prezentate informațiile referitoare la molecula de kinezină convențională echilibrată în cutia de apă. Acest fișier a fost utilizat în simulările de dinamică moleculară când s-a aplicat o forță constantă egală cu 700 pN și respectiv, 1400 pN timp de 100 ps. În acest caz, se fixează regiunea de atașare a motorului molecular la microtubuli (reziduurile 255-285), iar atomului SMD, reprezentat prin atomul C_{α} din ultimul reziduu al acestei molecule (reziduuul 349) i s-a aplicat o forță constantă în direcția definită de către vectorul care leagă regiunea fixată și atomul SMD (Fig. 2.5).

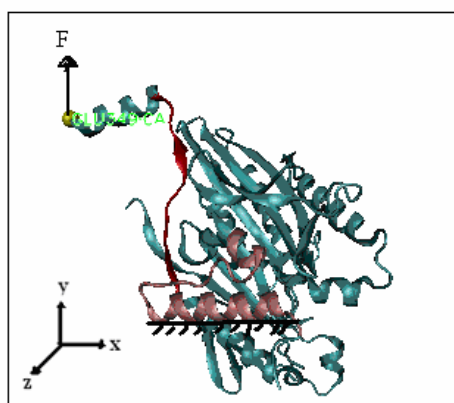


Fig. 2.5. Structura kinezinei convenționale cu forța aplicată în direcția definită de către vectorul care leagă regiunea fixată și atomul SMD

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Monitorizarea legăturilor de hidrogen

Pentru monitorizarea legăturilor de hidrogen se folosește programul VMD 1.8.7. Se va utiliza opțiunea pentru dispunerea moleculei sub formă de CPK, selectând atomii N și O din proteină și apelând opțiunea de reprezentare a legăturilor de hidrogen. Parametrii considerați în această reprezentare sunt: "Distance Cutoff": 4,0, "Angle Cutoff": 95 și "Line Thickness": 10.

În cazul structurii de "neck linker" din kinezina convențională, evoluția legăturilor de hidrogen a fost evaluată după aplicarea unor forțe constante de tracțiune ($F_1 = 700$ pN, $F_2 = 1400$ pN) timp de 100 ps, folosind metoda de dinamică moleculară direcționată. Inițial structura de "neck linker" conține în total 7 legături de hidrogen și două straturi de tip beta (Fig. 2.6), însă după aplicarea celor două forțe constante, F_1 și F_2 , aceste legături se distrug aproape în întregime. După aplicarea unei forțe constante de 700 pN, din cele 7 legături de hidrogen mai rămân doar 5, fiind distrus doar unul din straturi de tip beta. În cazul aplicării unei forțe constante, $F_2 = 1400$ pN se pot identifica un număr total de 4 legături de hidrogen și un strat de tip beta: β_9 în structura "neck linker"-ului. Așadar, prin dublarea valorii forței nu s-au identificat schimbări conformaționale semnificative în structura de "neck linker".

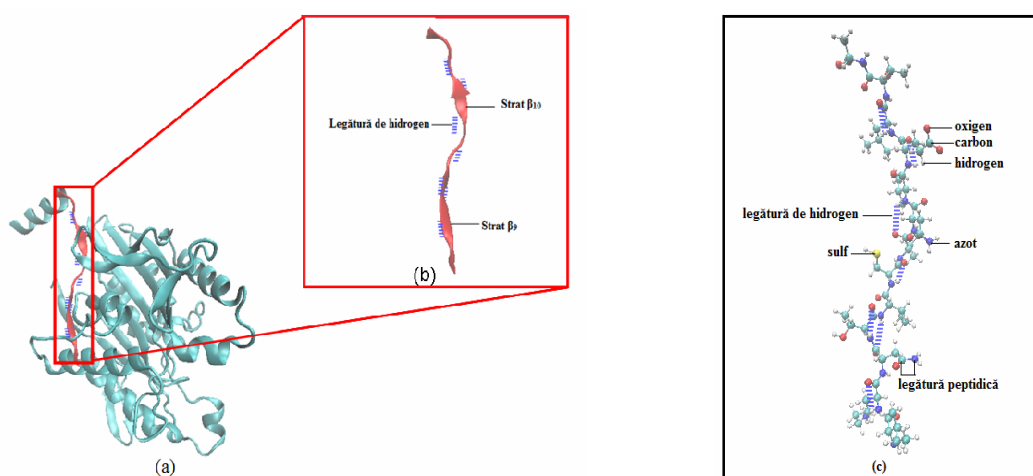


Fig. 2.6. (a). Molecula monomerică de kinezină convențională reprezentată în VMD; (b). Structura de "neck linker" formată din 7 legături de hidrogen și două straturi de tip beta: β_9 și β_{10} ; (c).Reprezentarea structurală a atomilor (Azot – N: bilele albastre; Carbon – C: bilele roșii; Hidrogen – H: bilele albe; Sulf – S: bilele galbene) și a legăturilor componente din lanțul polipeptidic a structurii de "neck linker"

În comparație cu metoda de dinamică moleculară direcționată folosind condițiile de tracțiune la viteză constantă utilizată pentru a studia procesul de depiere și pliere a moleculei de

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

ubiquitin prin analiza evoluției legăturilor de hidrogen [Banu et al., 2011], această metodă oferă posibilitatea de a investiga dependența dintre forța aplicată ”neck linker”-ului și răspunsul acestuia prin monitorizarea legăturilor de hidrogen din componența acestei structuri proteice.

2.3.2. Modelarea testului de tracțiune a ”neck linker”-ului cu ajutorul metodei de dinamică moleculară direcționată (SMD)

În modelarea testului de tracțiune a ”neck linker”-ului cu ajutorul metodei de dinamică moleculară direcționată s-a folosit aceeași procedură de simulare de dinamică moleculară ca în cazul simulării pierderii stabilității ”neck linker”-ului. ”Neck linker”-ul a fost selectat între reziduurile 325 și 337 după procesul de tăiere din întreaga moleculă monomerică a kinezinei convenționale, PDB ID: 1MKJ (Fig. 2.7.a). Structura ”neck linker”-ului cu dimensiunile ($12 \times 39 \times 15 \text{ \AA}^3$) și lungimea inițială $L_0 = 35,56 \text{ \AA}$, a fost plasată în interiorul unei cutii de apă cu dimensiunile ($32 \times 59 \times 35 \text{ \AA}^3$) și grosimea stratului de apă egală cu 10 \AA , folosind aceleași condiții ca în cazul moleculei monomerice de kinezină convențională (Fig. 2.7. b).

Pentru a se obține o echilibrare optimă a structurii de ”neck linker” s-a efectuat o dinamică liberă pentru întreg sistemul timp de 2000 ps. Simulările de dinamică moleculară direcționată au fost realizate folosind condițiile de tracțiune constantă. În acest caz, o forță externă a fost aplicată în direcția +y a atomului de carbon alfa al ultimului reziduu (ALA337) și în direcția -y a atomului de carbon alfa al primului reziduu (ILE325) (Fig. 2.8).

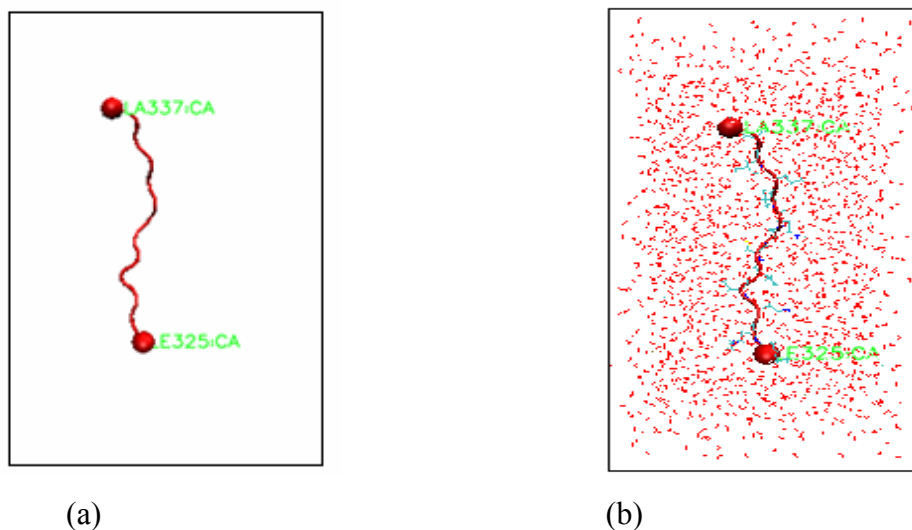


Fig. 2.7. Structura ”neck linker”-ului din kinezina convențională (a) după procesul de tăiere, (b) în cutia de apă

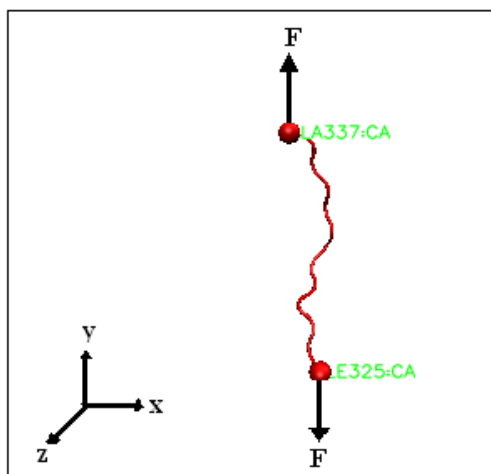


Fig. 2.8. Structura "neck linker"-ului din kinezina convențională cu forța aplicată axial

Pentru a realiza simulările de dinamică moleculară, s-a pregătit sistemul pentru condițiile de tracțiune constantă folosind aceleași condiții limită periodice ca în cazul etapei de echilibrare. S-a efectuat o simulare de dinamică moleculară direcționată timp de 16000 ps prin aplicarea unei forțe constante de tracțiune variind în intervalul 2-15 pN.

2.4. Optimizarea etapei de echilibrare la proteinele scurte

Optimizarea etapei de echilibrare la proteinele scurte poate fi analizată prin calcularea evoluției energiei totale, a celei potențiale și a energiei libere înmagazinate în aceste proteine în urma procesului de echilibrare, precum și prin calcularea deviației medii pătratice. Deviația medie pătratică oferă informații cu privire la stabilitatea proteinei, mai exact dacă această structură proteică se află într-o stare conformațională stabilă. Deviația medie pătratică (RMSD) este folosită pentru a măsura distanța dintre diferiți atomi ai proteinelor (atomii de $C\alpha$, C, N, O, $C\beta$). Prin măsurarea valorii lui RMSD ale coordonatelor atomice ale carbonului alfa după realizarea suprapunerii legăturilor rigide din structura proteinei, se pot măsura schimbările conformaționale apărute în această structură.

Deviația medie pătratică oferă informații despre cantitatea prin care o selecție dată a moleculei de proteină considerată deviază de la o poziție definită în spațiu. Prin reprezentarea grafică a evoluției lui RMSD în timp, echilibrarea structurii proteice în cutia de apă este realizată când este obținută o configurație geometrică caracterizată printr-un minim al energiei. Valoarea de saturare a lui RMSD pune în evidență starea de echilibru al structurii proteice, unde o etapă suplimentară de dinamică moleculară ar putea fi aplicată.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

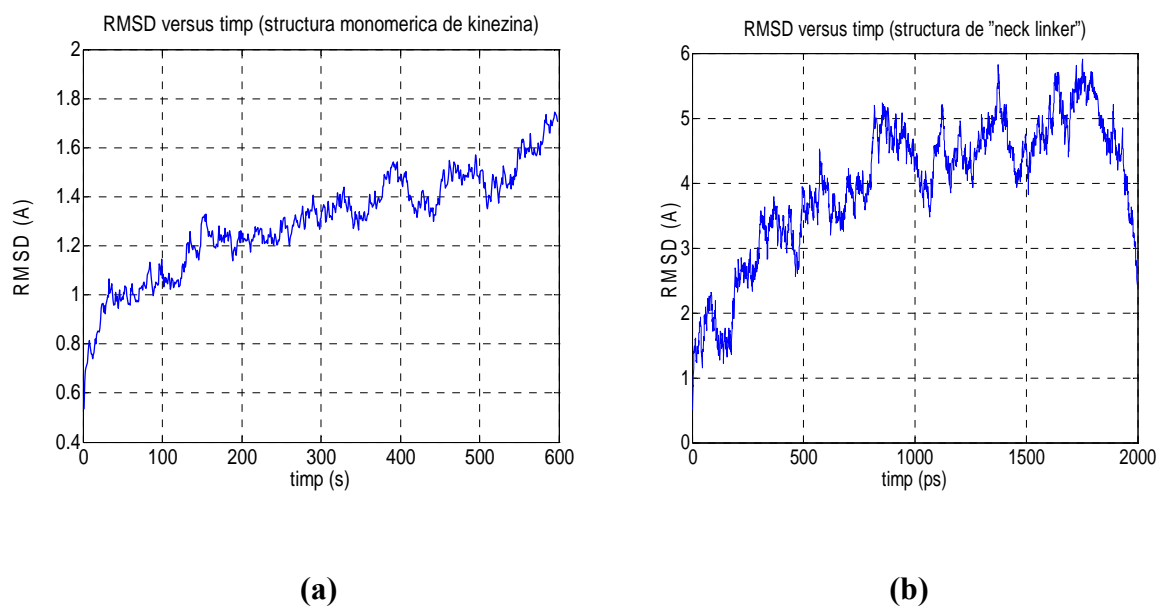


Fig. 2.9. RMSD versus timp pentru structurile proteice echilibrate folosite în simulările de dinamică moleculară. (a). Structura monomerică a kinezinei convenționale – valoarea de saturare pentru RMSD este obținută în jur de 500 ps. (b) Structura de "neck linker" – valoarea de saturare pentru RMSD este obținută în jur de 1800 ps.

Pentru a analiza extinderea la care sistemele proteice utilizate în simulările de dinamică moleculară au fost echilibrate, s-a reprezentat grafic deviația medie pătratică (RMSD) versus timp (Fig. 2.9. (a),(b)). Dacă în cazul structurii monomerice a kinezinei convenționale procesul de echilibrare se produce mai rapid în jur de 500 ps, pentru structura de "neck linker" găsirea unui minim local al energiei are loc într-un timp relativ destul de mare în jur de 1800 ps. Această comportare a structurii de "neck linker" în timpul procesului de echilibrare se datorează modificării frecvenței a stării conformaționale până la obținerea unei stări stabile, care va permite efectuarea simulărilor de dinamică moleculară direcționată folosind condițiile de tracțiune la forță constantă.

2.5. Concluzii

În acest capitol a fost conceput, realizat și utilizat un algoritm de simulare a încercărilor mecanice aplicate kinezinei. Astfel, s-au realizat 9 simulări de dinamică direcționată prin aplicarea forțelor constante, $F = 700$ pN, $F = 1400$ pN, atomului SMD, C_{α} din ultimul reziduu al acestei molecule (reziduu 349) în direcția definită de către vectorul care leagă regiunea fixată (reziduurile 255-285 - regiunea de atașare a motorului molecular la microtubuli) și atomul SMD și respectiv, prin aplicarea unei forțe externe ($F = 1$ pN, $F = 2$ pN, $F = 5$ pN, $F = 8$ pN, F

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

($F = 10$ pN, $F = 12$ pN, $F = 15$ pN) în direcția +y a atomului de carbon alfa al ultimului reziduu (ALA337) și în direcția -y a atomului de carbon alfa al primului reziduu (ILE325). Timpul de calcul mediu pentru o simulare a fost de 12 h/etapa compus din etapa de inițiere, echilibrare și simulare. S-a folosit metoda de tracțiune direcționată (SMD) și metoda ABF (Adaptive Biasing Force). Criteriul de oprire în evoluția proteinei în etapa de echilibrare a fost obținerea unui factor de regresie RMSD constant pentru o perioadă mai mare de 500 ps, ceea ce corespunde la o poziție de echilibru temporar al proteinei. Pentru această configurație corespunzătoare acestei etape de echilibrare s-a aplicat, succesiv, forța de 700 pN, 1400 pN pentru 100 ps și 2-15 pN pentru 16000 ps.

Din tabelul 2.1 se poate observa că în urma aplicării unor forțe constante de 700 pN și respectiv, 1400 pN moleculei monomerică de kinezină convențională, dintr-un număr total de 7 legături de hidrogen au mai rămas 4-5 legături de hidrogen în structura acestei molecule. Prin ruperea acestor legături de hidrogen, "neck linker"-ul devine mai flexibil, ceea ce va determina o îmbunătățire a procesului de deplasare a acestui motor molecular de-a lungul microtubulilor.

Tabelul 2.1. Cazurile simulate în funcție de forțele aplicate celor două structuri proteice analizate

Structura proteică	Valorile forțelor aplicate (pN)	Valoarea medie a lui RMSD (Å)	Nr. legăturilor de hidrogen din structura de "neck linker"
Molecula monomerică de kinezină convențională	0 pN	1,2964 Å	7
Molecula monomerică de kinezină convențională	700 pN	1,2964 Å	5
Molecula monomerică de kinezină convențională	1400 pN	1,2964 Å	4
Structura de "neck linker"	2-15 pN	3,9857 Å	0

Prin tăierea structurii de "neck linker" din molecula monomerică de kinezină convențională, cele două straturi de tip beta conținând un număr total de 7 legături de hidrogen sunt complet distruse și prin urmare, în această structură nu mai poate fi identificată nicio legătură de hidrogen. În concluzie, datorită faptului că se rup legăturile de hidrogen, acestea crează noi configurații care restabilesc echilibrul și care determină comportarea neliniară a acestei structuri de "neck linker".

Capitolul 3. Identificarea rigidității kinezinei în cazul deformațiilor constante

3.1. Introducere

Pentru a înțelege în detaliu mecanismul de deplasare al kinezinei convenționale de-a lungul microtubulilor transportând diverse încărcări celulare este necesar să identificăm factorii mecanici, ce influențează dinamica acestui motor molecular. Astfel, în cadrul acestui capitol este prezentată analiza cantitativă ale modificărilor structurale ale subsistemului kinezinei convenționale, "neck linker"-ul, ce constituie elementul cheie ce participă la tracțiunea unei încărcări. Această analiză a fost realizată considerând mișcările longitudinale ale "neck linker"-ului, ce sunt mișcările structurale esențiale ale acestui subsistem. În cele ce urmează este prezentată analiza schimbărilor structurale și respectiv, cea a rigidității caracteristice "neck linker"-ului în funcție de deformarea proteinei.

3.2. Identificarea rigidității "neck linker"-ului în cazul deformațiilor mici

Elongația "neck linker"-ului este datorată fluctuațiilor termice și poate fi exprimată ca o funcție de $k_B T$ folosind legea echipartiției energiei. În ciuda faptului că direcția de aplicare a forței este axială, fluctuațiile termice sunt dominante în timpul transportului, conducând la apariția unor elongații, rotații precum și contracții în timpul acestui mecanism de deplasare. Astfel, lungimea instantanee a "neck linker"-ului $L(t)$ poate fi exprimată cu ajutorul ecuației (3.1):

$$L(t) = L_0 + \frac{F_L(t)}{k} + \bar{L} . \quad (3.1)$$

Legea echipartiției energiei este definită de următoarea ecuație (3.2):

$$\frac{1}{2} k \bar{L}^2 = \frac{1}{2} k_B T , \quad (3.2)$$

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

unde k este rigiditatea "neck linker"-ului, L reprezintă fluctuațiile termice ale "neck linker"-ului, k_B este constanta lui Boltzmann, T este temperatura absolută, F_L este forța de-a lungul "neck linker"-ului, L_0 este lungimea inițială a "neck linker"-ului.

Prin înlocuirea lui $L(t)$, ecuația (3.2) devine:

$$\frac{1}{2}k \left\langle \left[L(t) - L_0 - \frac{F_L(t)}{k} \right]^2 \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T, \quad (3.3)$$

unde,

$$L_0 = \langle L(t) \rangle - \left\langle \frac{F_L(t)}{k} \right\rangle. \quad (3.4)$$

Cu ajutorul unui algoritm secvențial este obținut un polinom de ordinul doi, ce este utilizat în determinarea valorii rigidității pentru un timp de simulare egal cu 16000ps (ecuația 3.5):

$$k^2 \langle \delta L^2 \rangle_{\Delta t} - k [2 \langle \delta L \delta F_L \rangle_{\Delta t} + k_B T] + \langle \delta F_L^2 \rangle_{\Delta t} = 0, \quad (3.5)$$

unde,

$$\delta L = L(t) - \langle L(t) \rangle_{\Delta t}, \quad (3.6)$$

$$\delta F_L = F_L(t) - \langle F_L(t) \rangle_{\Delta t}, \quad (3.7)$$

și forța de-a lungul "neck linker"-ului este definită cu ajutorul ecuației (3.8):

$$F_L(t) = F_x n_x + F_y n_y + F_z n_z, \quad (3.8)$$

unde n_x , n_y , n_z sunt componentele vectorului normalizat al forțelor aplicate; normele sunt calculate pe baza coordonatelor instantanee, $x_1(t)$, $y_1(t)$, $z_1(t)$, a centrului de masă a atomului de carbon alfa al primului reziduu și $x_2(t)$, $y_2(t)$, $z_2(t)$ sunt coordonatele atomului de carbon alfa al ultimului reziduu.

Pentru a evalua dependența rigidității "neck linker"-ului de încărcare se folosește ecuația (3.5). Această dependență este reprezentată în Fig. 3.1 pentru șase cazuri a alungirii "neck linker"-ului de la 1000 ps la 6000 ps și unde k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , k_6 reprezintă valorile rigidității "neck linker"-ului când s-a aplicat o forță constantă de tracțiune F_y ($F_{y1} = 2$ pN, $F_{y2} = 5$ pN, $F_{y3} = 8$ pN, $F_{y4} = 10$ pN, $F_{y5} = 12$ pN, $F_{y6} = 15$ pN).

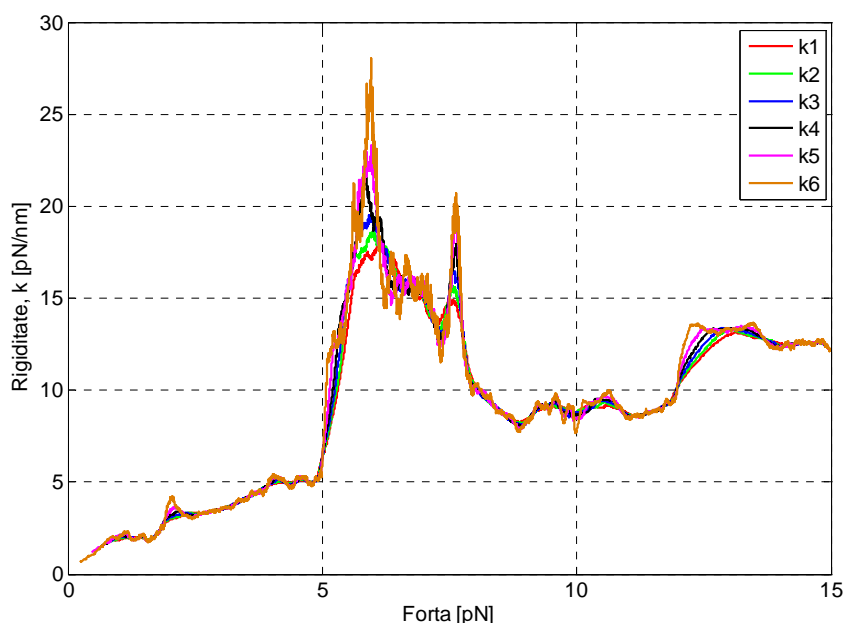


Fig. 3.1. Dependența rigidității „neck linker”-ului de încărcare

Valorile rigidității au fost calculate folosind algoritmul prezentat mai sus, unde $k_B T = 4,142 \text{ pN}\cdot\text{nm}$ și forța de-a lungul „neck linker”-ului, $F_L(t)$ încorporează de asemenea componentele x și z , dincolo de forța aplicată în direcția $+y$ a atomului de carbon alfa al ultimului reziduu și în direcția $-y$ a atomului de carbon alfa al primului reziduu, deoarece în anumite cazuri forța este compresivă [Patriche et al., 2011].

3.3. Identificarea rigidității „neck linker”-ului în cazul deformațiilor mari

Pentru a identifica rigiditatea „neck linker”-ului kinezinei convenționale în funcție de deformațiile mari ale acestei structuri proteice s-a utilizat același algoritm ca și în cazul deformațiilor mici. Modelul de variație al rigidității „neck linker”-ului în cazul deformațiilor mari a fost obținut prin aproximarea cu un polinom de gradul trei a celor două curbe rigiditate versus forța de tracțiune aplicată, $F_1 = 700 \text{ pN}$ și $F_2 = 1400 \text{ pN}$. Dependența rigidității față de forța de tracțiune aplicată este reprezentată grafic în Fig. 3.2 și 3.3. Creșterea valorii rigidității pentru perioade scurte de timp se datorează limitării de a captura fluctuațiile structurale pentru întreaga structură proteică analizată. În consecință, fluctuațiile înregistrate în evoluția rigidității în funcție de forța de tracțiune aplicată sunt o consecință a alungirii structurii de „neck linker”, urmată de comprimări și rotiri succesive ale acestei structuri.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

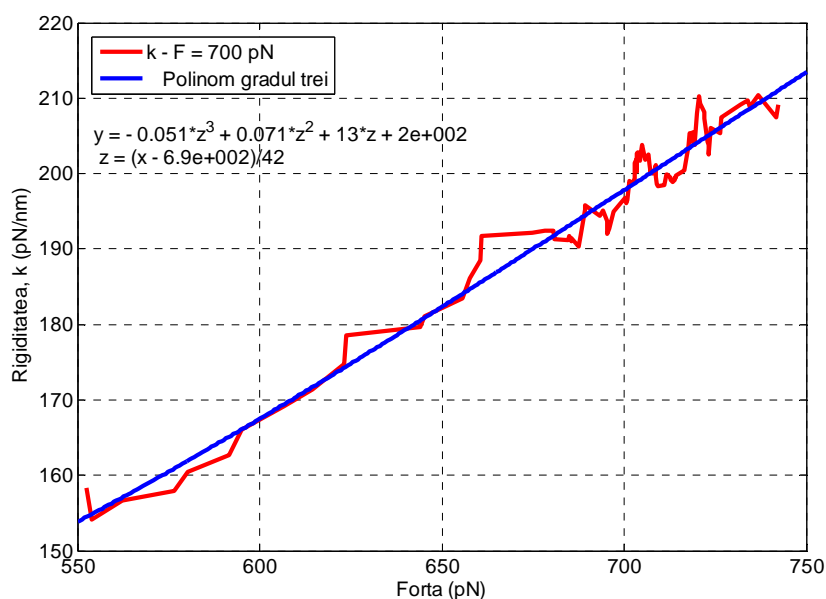


Fig. 3.2. Dependența rigidității față de forța de tracțiune aplicată, $F_1 = 700 \text{ pN}$

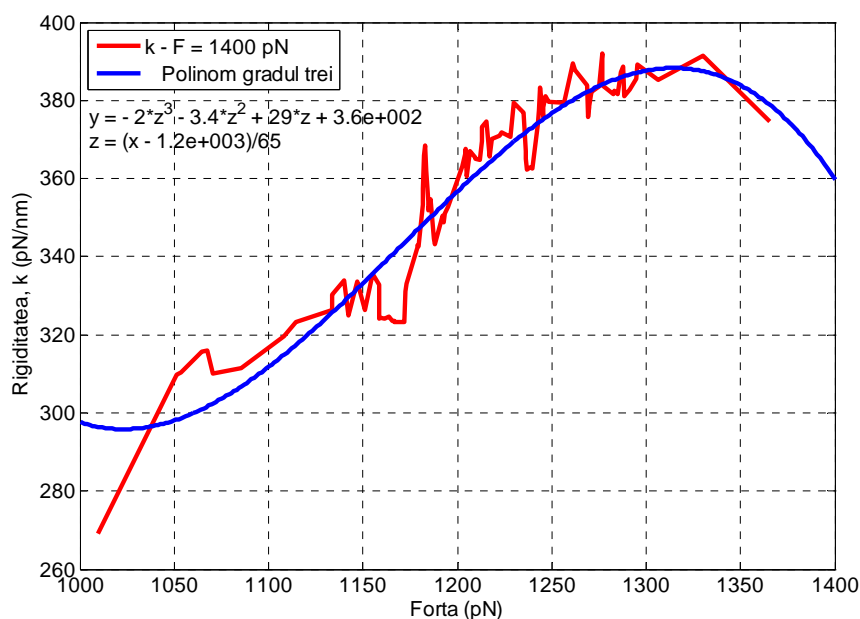


Fig. 3.3. Dependența rigidității față de forța de tracțiune aplicată, $F_2 = 1400 \text{ pN}$

Din Fig. 3.2 și 3.3 se observă că odată cu dublarea forței de tracțiune s-a dublat și valoarea rigidității. Astfel, pentru o valoare a forței de tracțiune egală cu 700 pN s-a măsurat o valoare medie a rigidității de $195,37 \pm 13,61 \text{ pN/nm}$ și respectiv, $357,09 \pm 30,51 \text{ pN/nm}$ pentru $F = 1400 \text{ pN}$.

3.4. Concluzii

În acest capitol a fost utilizat un algoritm secvențial de măsurare a rigidității caracteristice celor două structuri de "neck linker" evaluate. Astfel, s-au identificat modificările din lungimea "neck linker"-ului în funcție de cele două tipuri de deformație (deformațiile mici și cele mari) din structura proteică analizată. Aceste fluctuații structurale identificate pentru fiecare tip de "neck linker" studiat au fost utilizate pentru a caracteriza dependența rigidității în funcție de forța de tracțiune aplicată.

În tabelul 3.1 sunt centralizate valorile medii ale lungimii și a rigidității caracteristice structurii de "neck linker" obținute pentru fiecare forță de tracțiune aplicată. Din acest tabel se observă că în cazul deformațiilor mici ($F = 2-15$ pN) fluctuațiile din lungime și rigiditate sunt mai însemnate decât pentru deformațiile mari ($F = 700-1400$ pN). Aceste fluctuații sunt datorate succesiunii de comprimări și rotații pe care le suferă structura de "neck linker" în timpul procesului de tracțiune prin aplicarea unor forțe constante ce au variat în intervalul 2-15 pN.

Tabelul 3.1. Valorile lungimii și rigidității caracteristice structurii de "neck linker" în funcție de forța de tracțiune aplicată

Forța (pN)	$\langle L(t) \rangle \pm SD$ (Å)	Rigiditatea $\pm SD$ (pN/nm)
2	$25,86 \pm 4,38$	$2,12 \pm 0,09$
5	$30,34 \pm 2,93$	$3,77 \pm 0,55$
8	$19,41 \pm 5,21$	$4,12 \pm 2,65$
10	$31,87 \pm 4,92$	$8,96 \pm 0,29$
12	$28,66 \pm 2,83$	$8,53 \pm 0,16$
15	$29,34 \pm 2,31$	$11,70 \pm 0,07$
700	$35,43 \pm 0,86$	$195,37 \pm 13,61$
1400	$33,89 \pm 2,01$	$357,09 \pm 30,51$

În urma acestui studiu de identificare a rigidității a structurii de "neck linker" în funcție de deformarea acesteia, s-a observat că această proteina difuzează și componenta forței de-a lungul proteinei fluctuează semnificativ în timp determinând în anumite cazuri ca forța aplicată să fie compresivă. Elasticitatea proteinei variază semnificativ, în special pentru forțele din intervalul 5-8 pN. În concluzie, comportamentul "neck linker"-ului este neliniar în raport cu forța aplicată.

Capitolul 4. Identificarea rigidității kinezinei în cazul deformațiilor instantanee

4.1. Introducere

Kinezina se deplasează pe un ansamblu celular cunoscut sub numele de microtubuli, care produce o serie de obstacole (deformații instantanee) prin apariția unor boli. Datorită implicației sistemului kinezină-microtubuli în bolile neurodegenerative, Alzheimer și Parkinson, în ultimul timp, din ce în ce mai mulți cercetători atât din domeniul medical cât și al ingineriei sunt interesați de înțelegerea în detaliu a mecanismului de deplasare a kinezinei de-a lungul microtubulilor în cazul apariției unor obstacole (deformații instantanee). Cunoașterea exactă a structurii și a proprietăților mecanice ale microtubulilor are un rol defenitoriu în înțelegerea acestui mecanism de deplasare.

În cele ce urmează sunt prezentate cercetările experimentale și numerice privind caracterizarea structurală și identificarea rigidității microtubulilor în cazul deformațiilor instantanee. Cercetările experimentale au la bază microscopia de forță atomică, iar cele numerice, simulările de dinamică moleculară realizate cu ajutorul softului NAMD.

4.2. Cercetări experimentale privind caracterizarea structurală și identificarea rigidității microtubulilor

4.2.1. Principiul metodei

Sistemul experimental utilizat este sistemul Nanowizard III BioAFM (JPK Instruments Berlin, Germany). Caracteristicile acestui sistem sunt următoarele: microscopul inversat prezintă o bună rezoluție atomică, având un sistem de detecție a cantileverului (nivel scăzut al zgomotului 0,1 Hz – 1 kHz) și respectiv, unul de detecție IR a unghiului de deviație a sursei de lumină cu o bună coerență pentru măsurătorile libere de interferență. Proba de microtubuli atașată pe un substrat din sticlă (supus unui tratament de silanizare) va fi plasată pe stativul unui microscop inversat (IX71, Olympus, Tokyo, Japan) și va fi supusă analizei. În Fig. 4.1., este prezentată schema experimentului realizat folosind tehnica de microscopie cu forță atomică pentru a caracteriza structural și a măsura valoarea rigidității caracteristice microtubulilor.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

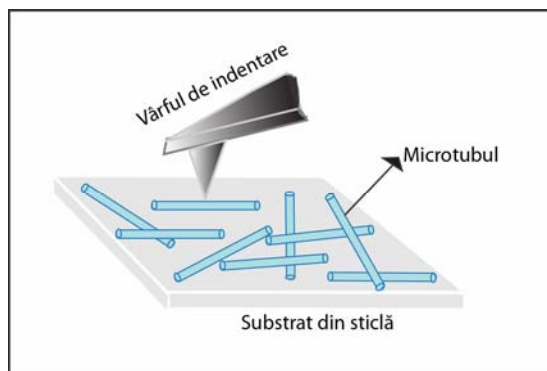


Fig. 4.1. Schema experimentului AFM efectuat cu ajutorul sistemului NanoWizard III BioAFM

Principiul metodei experimentale utilizate în cadrul acestui capitol pentru a caracteriza structural și a măsura valoarea rigidității corespunzătoare microtubulilor, folosind microscopia cu forță atomică este prezentat schematic în Fig. 4.2.

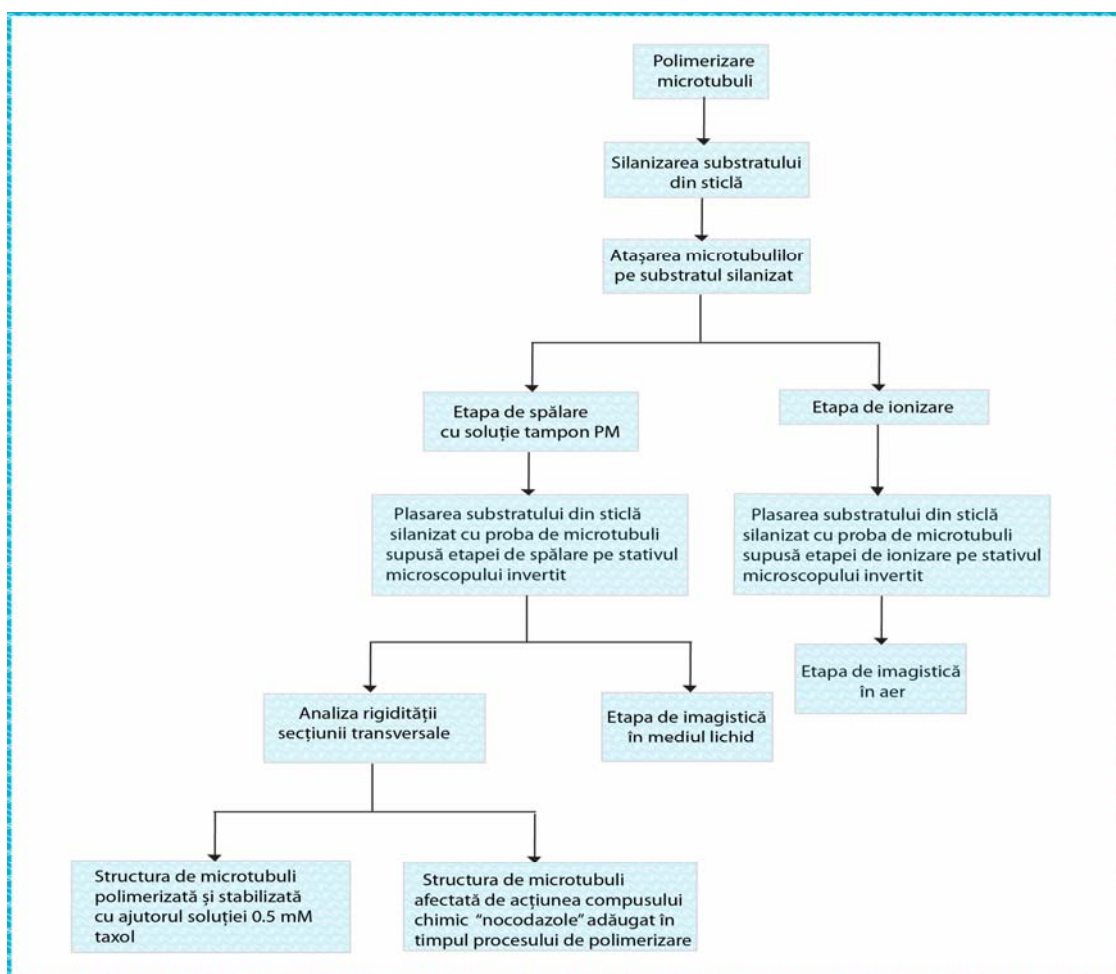


Fig. 4.2. Schema principiului metodei experimentale de caracterizare structurală și de măsurare a rigidității filamentelor de citoscheletal de tip microtubuli

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Caracterizarea structurală a acestor filamente de citoscheletal s-a realizat cu ajutorul etapelor de imagistică efectuate atât în aer cât și în mediul lichid. Identificarea rigidității caracteristică microtubulilor a fost posibilă prin evaluarea modulului lui Young obținut în urma determinării curbelor de tip forță versus indentare cu ajutorul soft-ului JPK IP processing și approximate folosind modelul lui Hertz.

4.2.2. Caracterizarea structurală a microtubulilor folosind etapa de imagistică în aer și mediul lichid

Proprietățile structurale au fost puse în evidență cu ajutorul imaginilor obținute în aer și mediul lichid folosind sistemul NanoWizard III BioAFM. Pentru a genera imaginile AFM în aer s-a folosit AC mode, efectuat cu ajutorul unui cantilever rectangular din silicon, având constanta de elasticitate egală cu 0,22 N/m. În timp ce pentru obținerea imaginilor AFM în mediul lichid s-a utilizat Contact mode pentru scanarea suprafeței topografice folosind un cantilever triunghiular, ascuțit confecționat din nitrură de silicon, cu o constantă de elasticitate egală cu 0,2445 N/m. În Fig. 4.3 și 4.4 sunt prezentate structurile topografice dimensionale (2D) și secțiunile transversale corespunzătoare acestora obținute în urma proceselor de imagistică realizate în aer și în mediul lichid pentru proba de microtubuli supuse analizei.

În urma analizei secțiunii transversale obținute din imaginile topografice 2D atât în aer cât și în mediul lichid aceste filamente de citoscheletal au prezentat structuri cu înălțimi cuprinse în intervalul 6,5 – 8 nm.

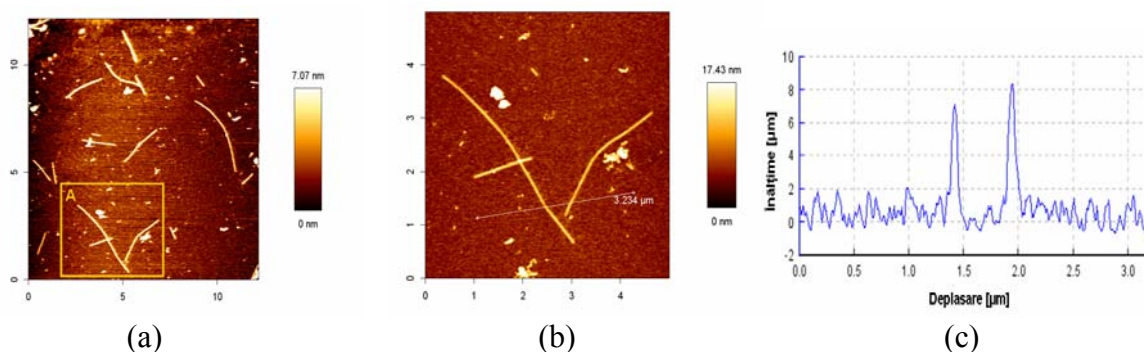


Fig. 4.3. Imagini AFM în aer ale filamentelor de citoscheletal de tip microtubuli. (a) Imagine topografică 2D, aria scanată 15 μm x 15 μm ; (b) Zoom în regiunea A - imagine topografică 2D, aria scanată 5 μm x 5 μm ; (c) Secțiunea transversală de-a lungul liniei din panoul (b).

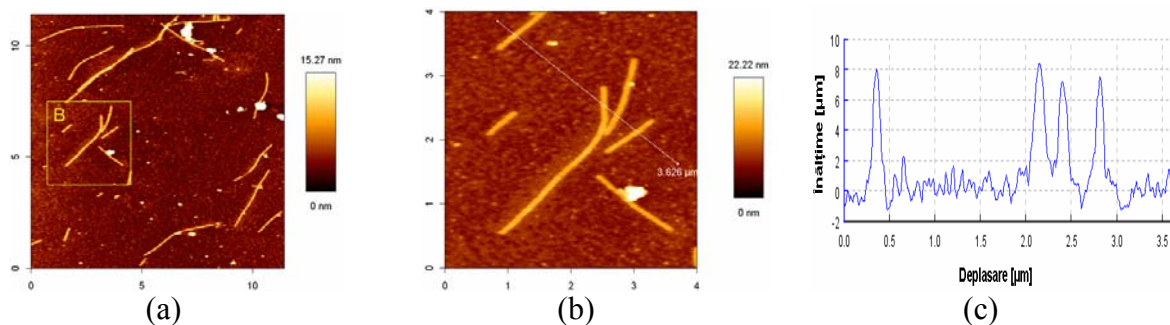


Fig. 4.4. Imagini AFM în mediul lichid ale filamentelor de citoscheletal de tip microtubuli. (a) Imagine topografică 2D, aria scanată 15 μm x 15 μm; (b) Zoom în regiunea B - imagine topografică 2D, aria scanată 4 μm x 4 μm; (c) Secțiunea transversală de-a lungul liniei din panoul (b).

4.2.3. Măsurarea rigidității caracteristice microtubulilor în mediul lichid

Măsurătorile rigidității microtubulilor au fost efectuate în mediul lichid folosind sistemul NanoWizard III BioAFM. Pentru a obține curbele forță versus distanță utilizate în calculul modulului lui Young, s-a realizat etapa de spectroscopie folosind modul contact cu ajutorul unui cantilever triunghiular, ascuțit, confecționat din nitrură de silicon, cu o constantă de elasticitate egală cu 0,2445 N/m. Pentru a analiza curbele forță versus distanță s-a folosit modelul lui Hertz. Acest model este utilizat pentru obținerea modulului lui Young, ce este o proprietate elastică a materialului și este definit ca raportul dintre tensiunea materialului și deformare (ecuația 4.1).

$$E = \frac{F}{A} \cdot \frac{dL}{L}, \quad (4.1)$$

unde, E = modulul lui Young; F = forța de tracțiune; A = secțiunea transversală; dL = alungirea specifică; L = lungimea inițială.

În cadrul acestui capitol s-a realizat un studiu comparativ de evaluare a rigidității măsurate pentru structura de microtubuli polimerizată și stabilizată cu ajutorul taxolului și cea afectată de acțiunea compusului chimic "nocodazole" adăugat în timpul procesului de polimerizare. Taxolul este un medicament utilizat pentru tratarea diferitelor forme de cancer. Taxolul se atașează la structurile de tubulină în timpul proceselor de hiperstabilizare și formare de fascicule de microtubuli. S-a demonstrat faptul că adăugarea taxolului în timpul procesului de ansamblare a tubulinelor, acestea sunt cu 0,15 nm mai lungi decât structurile de tubulină din rețeaua GDP a microtubulilor standard. În timp ce adăugarea taxolului după procesul de

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

ansamblare determină o mai mică modificare a lungimii longitudinale în rețeaua de microtubuli obținută (în jur de 0,04 nm) [Arnal et al., 1995]. Compusul chimic "nocodazole" este un medicament anti-mitotic, care se atașează la structura de microtubului. Acest medicament are rolul de a reduce instabilitatea dinamicii acestor filamente de citoscheletal la o valoare mică a concentrației și de a depolimeriza aceste filamente la o valoare mai mare atât în vivo cât și în vitro. La o valoare a concentrației cuprinsă în ordinul de mărime nM până la mM, "nocodazole" interacționează cu majoritatea proteinelor de tip tubulină din structura microtubulilor [Marx et al., 2007].

Datele experimentale obținute în urma măsurătorilor AFM au fost supuse unui proces de aproximare realizat cu ajutorul opțiunii AFM ImageProcessing din soft-ul JPK IP processing. Geometria indentării pentru curbele forță versus indentare obținute experimental este de tip sferic. Ecuația matematică utilizată pentru calculul modulului lui Young în urma procesului de aproximare este prezentată mai jos:

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \left[\frac{a^2 + R_s^2}{2} \ln \frac{R_s + a}{R_s - a} - aR_s \right], \quad (4.2)$$

$$\delta = \frac{a}{2} \ln \frac{R_s + a}{R_s - a}, \quad (4.3)$$

unde, F = forța; E = modulul lui Young; ν = coeficientul lui Poisson; δ = adâncimea de indentare; a = raza cercului de contact. Parametrii folosiți în etapa de aproximare sunt: forma vârfului de indentare (sferă), raza vârfului de indentare (10,0 μm) și coeficientul lui Poisson (0,50). În Fig. 4.5 și 4.6 sunt prezentate curbele tipice forță versus distanță obținute pentru procesul de indentare a structurii de microtubuli polimerizată și stabilizată cu taxol și respectiv, pentru cel al structurii de microtubuli stabilizată cu taxol și afectată de acțiunea compusului chimic "nocodazole".

Din cele două figuri, se poate observa că adâncimea de indentare în cazul structurii de microtubuli afectată de acțiunea "nocodazole"-ului este mult mai mare decât cea neafectată de acest medicament.

În Fig. 4.7 este prezentată evoluția valorii modulului lui Young corespunzătoare celor două structuri de microtubuli supuse analizei: structura de microtubuli polimerizată și stabilizată cu soluția de 0,5 mM taxol și respectiv, structura de microtubuli stabilizată cu soluția de 0,5 mM taxol, însă afectată de acțiunea compusului chimic "nocodazole" (0,1 mM).

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

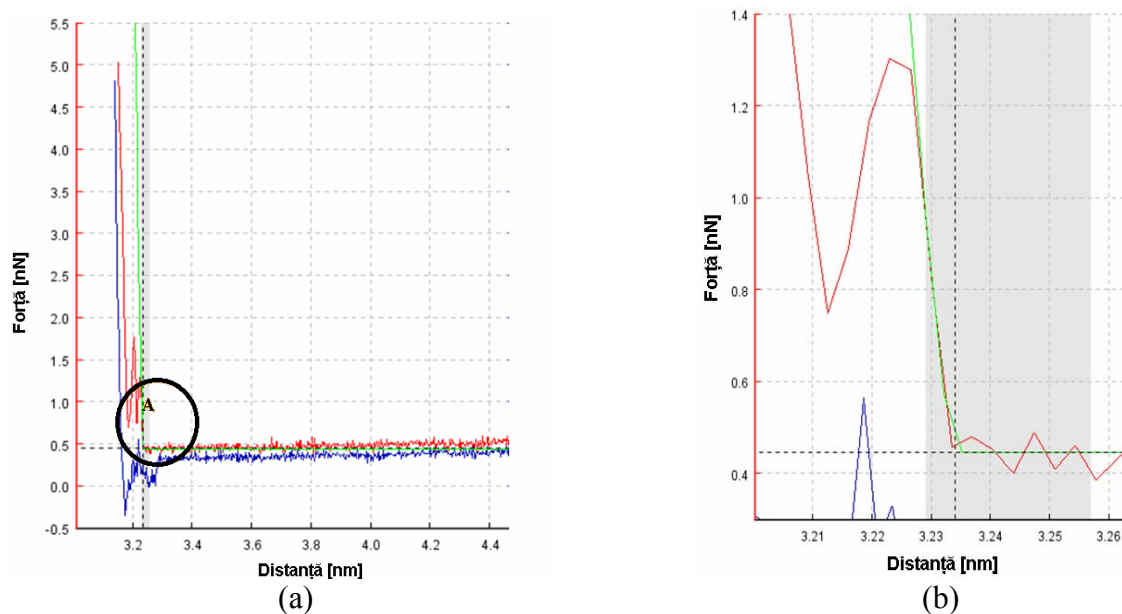


Fig. 4.5. (a) Curba forță versus distanță în cazul procesului de indentare a structurii de microtubuli polimerizată și stabilizată cu taxol; (b) Zoom în regiunea A – zona din curba forță versus distanță ce va fi folosită în etapa de aproximare folosind modelul lui Hertz pentru a determina valoarea modulului lui Young

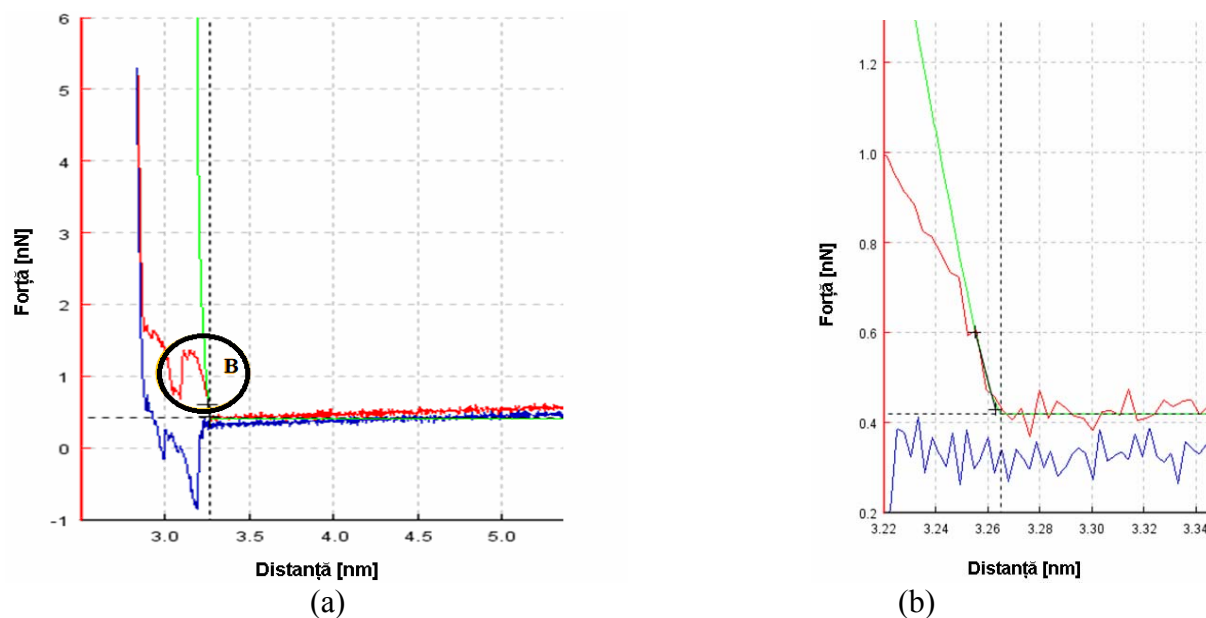


Fig. 4.6. (a) Curba forță versus distanță în cazul procesului de indentare a structurii de microtubuli stabilizată cu taxol și afectată de acțiunea compusului chimic "nocodazole"; (b) Zoom în regiunea B – zona din curba forță versus distanță ce va fi folosită în etapa de aproximare folosind modelul lui Hertz pentru a determina valoarea modulului lui Young

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

În urma analizei valorii modulului lui Young în cazul celor două structuri de microtubuli supuse evaluării, s-a constatat că rigiditatea microtubulilor se modifică drastic în cazul adăugării compusului chimic "nocodazole" în procesul de polimerizare acestor filamente de citoscheletal. Valoarea modulului lui Young (E) în cazul structurii de microtubuli afectată de acțiunea acestui medicament este de 4,5 ori mai mică decât structura de microtubuli neafectată. Această tendință poate fi observată și din reprezentarea grafică a evoluției valorii modulului lui Young corespunzătoare celor două structuri de proteină supuse analizei: $E_{\text{Taxol}} = 7,56 \pm 3,33$ MPa și $E_{\text{Nocodazole}} = 1,69 \pm 1,43$ MPa (valoarea lui fiind determinată cu ajutorul formulei $E = E_{\text{mediu}} \pm SD$ (MPa), SD = deviația standard) [Han et al., 2012].

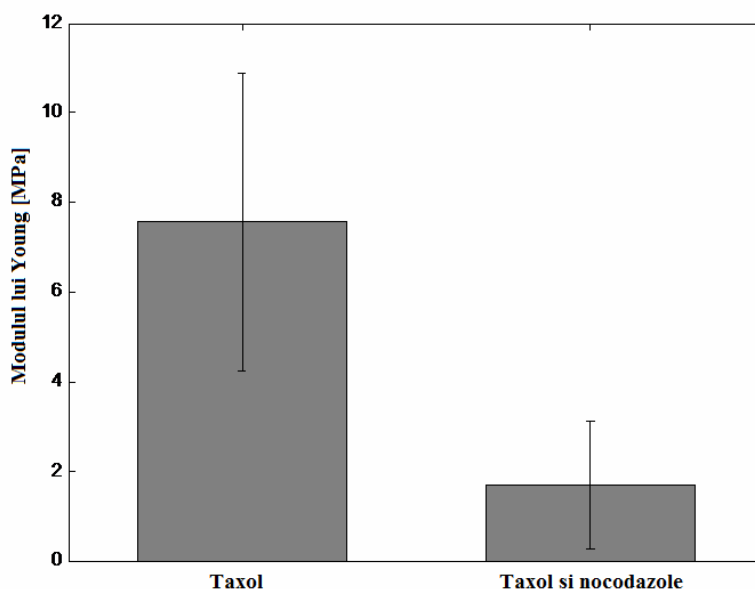


Fig. 4.7. Evoluția valorii modulului lui Young corespunzătoare celor două structuri de proteină supuse analizei: Taxol - structura de microtubuli polimerizată și stabilizată cu soluția de 0,5 mM taxol; Nocodazole - structura de microtubuli stabilizată cu taxol și afectată de acțiunea compusului chimic "nocodazole" (0,1 mM). Barele de eroare reprezintă deviația standard a valorii medii a modulului lui Young

4.3. Cercetări numerice privind identificarea rigidității microtubulilor în cazul deformațiilor instantanee

Identificarea rigidității microtubulilor în cazul deformațiilor instantanee a fost realizată investigând mecanismul implicat în depolimerizarea structurii microtubulilor cu ajutorul simulărilor de dinamică moleculară. Acest mecanism este dependent de timp și contribuie la

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

deteriorarea transportului neuronal realizat de către kinezină și microtubuli, conducând la insuccesul transportului ionilor de Ca^{2+} la sinapsele nervoase. Cu ajutorul simulărilor de dinamică moleculară, monitorizarea stării de funcționalitate a microtubulilor este realizată prin măsurarea evoluției rigidității, ce caracterizează integritatea microtubulilor și capacitatea lor de a fi transportatori pentru semnalele neuronale. În cele urmează este prezentat un studiu comparativ între rigiditatea caracteristică structurii dimerice de microtubuli și cea afectată de rotenonă, care este un pesticid foarte utilizat în agricultură și are un efect devastator asupra sănătății umane, conducând la apariția bolilor neurodegenerative.

4.3.1. Algoritm utilizat în investigațiile privind efectul rotenonei asupra structurii microtubulilor

Algoritmul folosit pentru a măsura proprietățile mecanice ale proteinelor afectate de către efectul nociv al pesticidelor are la bază simulările numerice efectuate la nivel atomistic (simulările de dinamică moleculară) și schema acestui algoritm este prezentată în Fig.4.8.

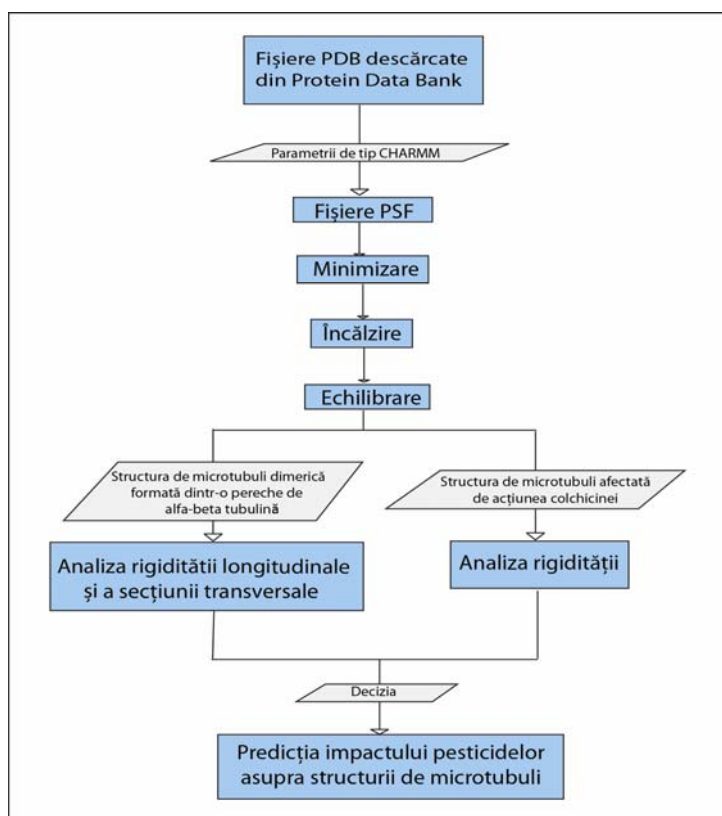


Fig. 4.8. Schema algoritmului propus pentru predicția impactului nociv al pesticidelor asupra stării de funcționalitate a microtubulilor prin intermediul procesului de monitorizare a secțiunii transversale și a rigidității longitudinale ca o măsură a procesului de dezintegrare a microtubulilor.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Pentru a realiza aceste simulări de dinamică moleculară s-au utilizat lanțuri proteice obținute dintr-o bancă de proteine, cunoscută sub numele de RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB). Structura proteinelor descărcate din această bancă de proteine este reprezentată prin coordonatele și distanțele dintre reziduurile componente. Pentru a evidenția interacția între reziduuri, s-au folosit parametrii de tip CHARMM. Pentru a analiza rigiditatea structurii de microtubuli atât în absența cât și prezența pesticidelor, s-au folosit două lanțuri proteice în simulările de dinamică moleculară: structura dimerică de microtubuli formată dintr-o pereche de alfa-beta tubulină și cea afectată de acțiunea pesticidelor alcătuită din două perechi alfa-beta tubulină, dintr-o moleculă de colchicină și un domeniu de tip "stathmin" (Fig. 4.9. (a), (b)). Structura dimerică alfa-beta tubulină este alcătuită din 874 amino-acizi (440 de tip alfa-tubulină și 427 de tip beta-tubulină) și respectiv, 7406 legături de tip C-C. Cea de-a doua structură analizată, conține un număr total de reziduuri egal cu 1934 aminoacizi (902 de tip alfa-tubulină, 890 de tip beta-tubulină și 142 de tip "stathmin") și respectiv, 14394 legături de tip C-C.

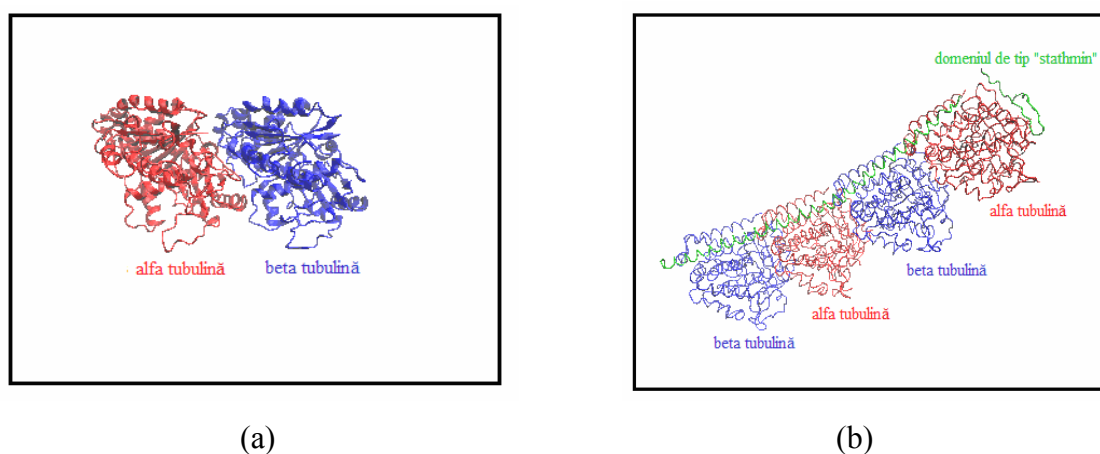


Fig. 4.9. Structurile proteice folosite în simulările NAMD reprezentate grafic folosind editorul VMD. (a). Structura dimerică de microtubuli; (b). Structura de microtubuli afectată de acțiunea compusului chimic, colchicina.

Rigiditatea structurii de microtubuli reprezintă unul dintre cei mai importanți parametri mecanici, ce ne poate furniza informații privind cauzele procesului de depolimerizare a structurii de microtubuli. Pentru a evalua rigiditatea structurilor proteice folosite în realizarea simulărilor de dinamică moleculară, inițial s-a efectuat procesul de echilibrare timp de 100 ps pentru fiecare structură în parte. Analiza rigidității structurii dimerice de microtubuli s-a realizat folosind

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

simulările de dinamică moleculară efectuate cu ajutorul soft-ului NAMD 2.8 [Phillips et al., 2005].

4.3.2. Evaluarea stării de funcționalitate a structurii de microtubuli

Evaluarea stării de funcționalitate a structurii de microtubuli ar putea fi realizată prin măsurarea rigidității acestei biomolecule ca o măsură a integrității microtubulilor. Când pesticidele atacă structura microtubulilor, legăturile chimice din această biomoleculă sunt afectate și astfel, valoarea rigidității este modificată. Pentru a determina valoarea rigidității, o nouă metodă de calcul a fost dezvoltată pe baza modelului propus de [Matsushita et al., 2010], pentru a determina valoarea rigidității pentru filamentele de actină. Deformația structurii de microtubuli poate fi determinată prin mai multe moduri, însă cea mai reprezentativă este cea de-a lungul axei microtubulilor. Energia cauzată de această deformație este egală cu energia Boltzmann, așa cum este prezentat în ecuația de mai jos:

$$\frac{1}{2} k_{\text{ext}}^{\Delta t}(t) \langle (L(t) - \langle L(t)_{\Delta t} \rangle)_{\Delta t}^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T, \quad (4.4)$$

unde, k_B = constanta lui Boltzmann; T = temperatura absolută; $\langle \rangle_{\Delta t}$ = media fluctuațiilor în timp în cazul unei forțe egale cu zero; $\Delta t = 10, 20, 40, 60, 80, 100$ ps; $k_{\text{ext}}^{\Delta t}(t)$ = constanta de elasticitate la extinderea structurii de microtubuli.

Lungimea structurii dimerice de alfa-beta tubulină, $L(t)$ este definită ca fiind diferența dintre poziția pe coordonata x a centrului de masă a lanțului beta la capătul plus al microtubulilor ($x_{\text{plus}}(t)$) și poziția pe coordonata x a centrului de masă a lanțului alfa la capătul minus al microtubulilor ($x_{\text{minus}}(t)$).

$$L(t) = x_{\text{plus}}(t) - x_{\text{minus}}(t) . \quad (4.5)$$

În timp ce, lungimea structurii de microtubuli afectată de acțiunea compusului chimic colchicină este definită cu ajutorul relației matematice prezentată mai jos :

$$L(t) = \sqrt{(x_{\text{plus}}(t) - x_{\text{minus}}(t))^2 + (y_{\text{plus}}(t) - y_{\text{minus}}(t))^2 + (z_{\text{plus}}(t) - z_{\text{minus}}(t))^2} , \quad (4.6)$$

unde, $x_{\text{plus}}(t)$ este poziția pe coordonata x a centrului de masă a lanțului alfa la capătul plus al microtubulilor, $x_{\text{minus}}(t)$ - poziția pe coordonata x a centrului de masă a lanțului beta la capătul

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

minus al microtubulilor, $y_{\text{plus}}(t)$ - poziția pe coordonata y a centrului de masă a lanțului alfa la capătul plus al microtubulilor, $y_{\text{minus}}(t)$ - poziția pe coordonata y a centrului de masă a lanțului beta la capătul minus al microtubulilor, $z_{\text{plus}}(t)$ - poziția pe coordonata z a centrului de masă a lanțului alfa la capătul plus al microtubulilor, $z_{\text{minus}}(t)$ - poziția pe coordonata z a centrului de masă a lanțului beta la capătul minus al microtubulilor.

Analiza rigidității structurii de microtubuli s-a realizat cu ajutorul simulărilor de dinamică moleculară (efectuate timp de 100 ps), folosind constanta de elasticitate a structurii de microtubuli din ecuația (4.4) și unitățile de măsură convenționale. Rigiditatea structurii de microtubuli la extindere a fost calculată ca o valoare raportată la o lungime egală cu $1\mu\text{m}$. Astfel, rigiditatea la extindere caracterizată printr-o lungime aparentă de $1\mu\text{m}$, $K_{\text{ext}}^{\Delta t}(t)$ raportată la lungimea structurii de microtubuli este calculată folosind ecuația de mai jos:

$$K_{\text{ext}}^{\Delta t}(t) = \frac{\langle L(t) \rangle_{\Delta t}}{1\mu\text{m}} k_{\text{ext}}^{\Delta t}(t) . \quad (4.7)$$

În cadrul acestui studiu au fost analizați doi parametri mecanici esențiali ai structurii de microtubuli: rigiditatea de extindere și modulul lui Young, E , folosind o estimare aproximativă redată prin ecuația de mai jos:

$$E = \frac{k_{\text{ext}}L}{A} , \quad (4.8)$$

unde, k_{ext} = constanta de elasticitate la extinderea structurii de microtubuli; L = lungimea medie a structurii de microtubuli; A = secțiunea transversală echivalentă a structurii de microtubuli ($\sim 25 \text{ nm}^2$).

După 100 ps de simulare dinamică moleculară, structura dimerică de microtubuli formată dintr-o pereche de alfa-beta tubulină este caracterizată printr-o lungime medie de $39,3547 \text{ \AA}$, o rigiditate de extindere în jur de $0,0290 \text{ N/m} \pm 0,0164$ și valoarea modulului lui Young în jur de $1,79 \times 10^9 \text{ N/m}^2$, care este apropiată de valoarea obținută de Sept și MacKintosh, 2010 (pentru structura de tubulină $E = 2,2 \times 10^9 \text{ N/m}^2$). Rigiditatea celor două structuri de microtubuli supuse analizei a fost calculată cu ajutorul ecuației (4.8), folosind evoluția lungimii structurii de microtubuli din simulările de dinamică moleculară în timp. În urma acestei analize, valorile rigidității obținute pentru structurile de microtubuli au fost: $0,0290 \text{ N/m} \pm 0,0164$, $E = 1,79 \times 10^9 \text{ N/m}^2$ (structura de microtubuli dimerică) și respectiv, $0,0147 \text{ N/m} \pm 0,0085$, $E = 0,958 \times 10^9 \text{ N/m}^2$ (structura de microtubuli afectată de colchicină) [Patriche et al., 2011].

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

4.4. Concluzii

În acest capitol, au fost studiate proprietățile structurale și mecanice ale microtubulilor folosind microscopia de forță atomică și simulările de dinamică moleculară. În tabelul 4.1 sunt prezentate valorile rigidității caracteristice microtubulilor înregistrate atât în urma cercetărilor experimentale cât și a celor numerice.

Tabelul 4.1. Valorile rigidității caracteristice structurilor proteice analizate. $\langle E \rangle$ - valoarea medie a modului lui Young, SD_1 – deviația standard a valorii medii a modului lui Young, $\langle k \rangle$ - valoarea medie a rigidității, SD_2 – deviația standard a valorii medii a rigidității

Structura proteică	Tipul cercetării	$\langle E \rangle \pm SD_1$ (N/m ²)	$\langle k \rangle \pm SD_2$ (N/m)
Structura de microtubuli polimerizată și stabilizată cu soluția de 0,5 mM	Cercetări experimentale efectuate cu ajutorul microscopiei de forță atomică	$7,5 \pm 3,33 \times 10^6$	
Structura de microtubuli stabilizată cu taxol și afectată de acțiunea compusului chimic ”nocodazole”	Cercetări experimentale efectuate cu ajutorul microscopiei de forță atomică	$1,69 \pm 0,93 \times 10^6$	
Structura dimerică de alfa-beta tubulină	Cercetări numerice efectuate cu ajutorul softului de dinamică moleculară, NAMD	$1,79 \pm 0,32 \times 10^9$	$0,0290 \pm 0,0164$
Structura de microtubuli afectată de acțiunea colchicinei	Cercetări numerice efectuate cu ajutorul softului de dinamică moleculară, NAMD	$0,958 \pm 0,15 \times 10^9$	$0,01487 \pm 0,0085$

Microscopia de forță atomică este una dintre metodele experimentale ce oferă posibilitatea de a caracteriza structural (cu o rezoluție de ordinul nm) și de a identifica proprietățile mecanice caracteristice filamentelor de citoscheletal. Astfel, proba de microtubuli a fost fixată pe substratul din sticlă folosind soluții de aminopropil-trimetoxi-silan și aminopropil-

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

trietoxi-silan și cu ajutorul celor două etape de imagistică în aer și mediu lichid a fost posibil să identificăm structura microtubulilor, ce a prezentat înălțimi cuprinse între 6,5 și 8 nm. Valorile rigidității microtubulilor polimerizați și stabiliți cu taxol 0,5 mM, obținute în urma măsurătorilor AFM efectuate în mediul lichid cu ajutorul sistemului NanoWizard III BioAFM sunt în conformitate cu valorile obținute de către [Vinckeir et al., 1996]. În urma acestei analize, s-a constatat că adăugarea unei soluții de 0,1 mM nocodazole în soluția de microtubuli polimerizată determină o reducere semnificativă a valorii modului lui Young. Așadar, valoare scăzută a modului lui Young este un indicator a începerii procesului de depolimerizare a structurii de microtubuli, chiar dacă aceasta a fost stabilizată inițial cu o soluție de 0,5 mM taxol.

Cercetările numerice realizate cu ajutorul simulărilor de dinamică moleculară au contribuit la analiza valorii rigidității ca un indicator al procesului de dezintegrare a structurii de microtubuli.

Capitolul 5. Validarea experimentală a comportării kinezinei la deplasarea sub sarcină constantă

5.1. Introducere

Alături de simulările de dinamică moleculară, studiul procesivității motorului molecular de tip kinezină cu ajutorul tehnicilor "single-molecule", are un rol esențial în identificarea și înțelegerea în detaliu a principiului biomimetic caracteristic acestui motor molecular. În cadrul acestui capitol sunt prezentate cercetările experimentale realizate cu ajutorul tehnicii "optical tweezers" pentru a identifica dinamica și mecanismul de generare a forței caracteristice motoarelor moleculare de tip kinezină. Acest lucru a fost posibil prin măsurarea parametrilor de procesivitate (viteza medie și distanța medie de deplasare) și respectiv, forța de stagnare în timpul deplasării de-a lungul axonemei (fascicul de microtubuli orientați).

5.2. Principiul metodei

Obiectivul principal al cercetărilor experimentale prezentate în cadrul acestui capitol îl reprezintă studiul procesivității motoarelor moleculare de tip kinezină (kinezina convențională și motorul proteic, Tea2), folosind tehnica "optical tweezers". Identificarea parametrilor procesivității caracteristice celor două motoare proteice (kinezina convențională și motorul proteic, Tea2) s-a realizat prin acoperirea unei bile din polistiren cu aceste motoare moleculare și

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

atașarea lor la lor la axonemă folosind sistemul experimental "optical tweezers". Apoi, deplasarea motorului molecular de-a lungul axonemei a fost înregistrată și folosită pentru a calcula parametrii procesivității: viteza medie și respectiv, distanța medie de deplasare de-a lungul filamentului de citoscheletal corespunzător înaintea de detașarea completă a motorului proteic de la acesta.

Dinamica și mecanismul de generare a forței caracteristice kinezinei, Tea2 au fost studiate cu ajutorul unui sistem experimental "optical tweezers", ce conține un program de aplicare a forței constante (cunoscut sub numele de "force-feedback program"). Acest program a fost dezvoltat în cadrul grupului de cercetare "Bio-assembly &-organization" de la FOM Institute AMOLF – Amsterdam, Olanda și constă în menținerea unei bile din polistiren captate la un anumit punct de referință în interiorul captatorului optic. Acest lucru poate fi realizat prin deplasarea laserului de captare după ce s-a observat o deplasare a bilei. Însă, acest program oferă posibilitatea de a menține fix laserul de captare într-o anumită poziție, iar stativul cu proba de analizat este deplasat pentru a aduce bila la punctul de referință. Acest punct de referință poate fi în centrul captatorului optic sau la o anumită poziție de la centru, ce va determina exercitarea unei forțe de ordinul piconewtonilor asupra bilei de către captatorul optic. În acest fel, este posibil să se aplice o forță constantă asupra bilei din polistiren acoperită cu motorul molecular supus analizei.

5.3. Studiul procesivității kinezinei convenționale

Procesivitatea kinezinei convenționale a fost studiată folosind doi parametri esențiali: viteza medie și distanța medie de deplasarea de-a lungul axonemei, ce au fost măsurați în timpul experimentelor realizate cu tehnica "optical tweezers". S-au supus analizei patru probe cu următoarele concentrații: 34 μM (soluția stoc), 3,4 μM (1:10 diluție), 1,7 μM (1:20 diluție) și 1,132 μM (1:30 diluție). Pentru a identifica cei doi parametri ai procesivității s-au considerat numai bilele cu o clară istorie a deplasării de-a lungul axonemei, numărul acestor bile variind între 6 și 8. Deplasările bilelor din polistiren acoperite cu kinezina convențională de-a lungul axonemei dispuse orizontal au fost înregistrate folosind programul "Bead_Tracking" și sistemul video încorporat în sistemul experimental "optical tweezers". Aceste măsurători au fost realizate prin eliberarea captatorului optic, după ce s-a putut observa o vizibilă atașare între bila din polistiren și axonemă. Valorile vitezei medii de deplasare pentru concentrațiile 34 μM , 3,4 μM și 1,7 μM au variat între 47,55 și 104,40 nm/s. Aceste valori corespund comportamentului caracteristic mai multor motoare moleculare atașate de bilele din polistiren supuse analizei.

În cazul diluției 1:30, viteza medie de deplasare a fost egală cu 452,19 nm/s, iar distanța medie de deplasare cu 0,1 μm . Aceste rezultate sunt o dovadă că în soluția supusă analizei poate

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

fi identificat comportamentul caracteristic unui singur motor proteic atașat de bila din polistiren. Toate aceste valori obținute experimental sunt în acord cu cele obținute de [Svoboda et al., 1993] pentru parametrii procesivității kinezinei conveționale monomoleculare studiate cu ajutorul tehnicii "optical tweezers".

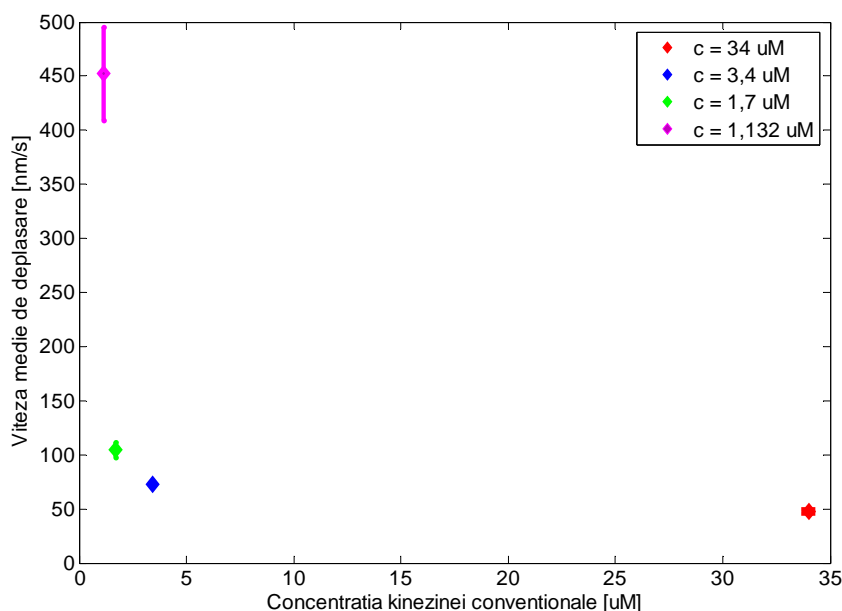


Fig. 5.2. Viteza medie de deplasare a kinezinei conveționale versus concentrația motorului proteic. Barele de eroare reprezintă eroarea standard a valorii medii (SEM) a vitezei de deplasare.

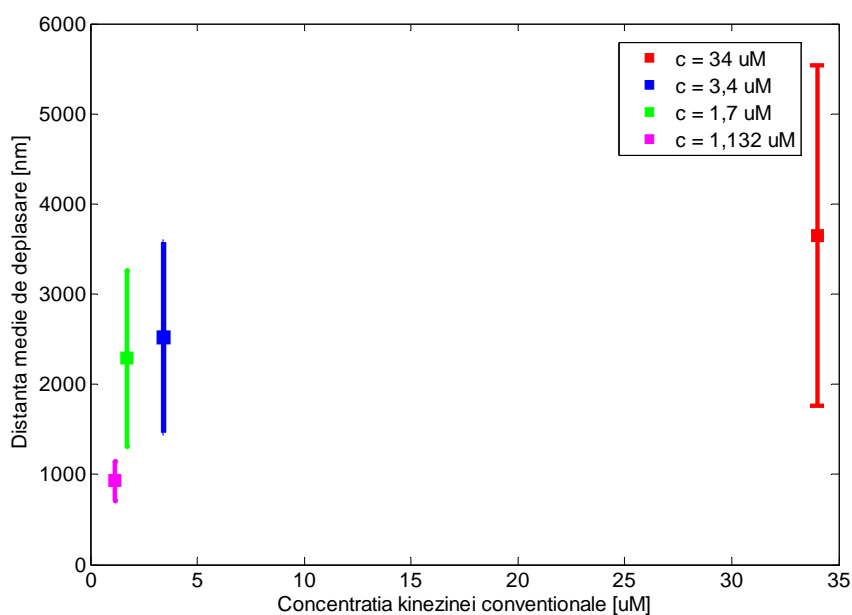


Fig. 5.3. Distanța medie de deplasare a kinezinei conveționale versus concentrația motorului proteic. Barele de eroare reprezintă deviația standard a distanței medii de deplasare

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Prin reprezentarea grafică a vitezei medii și respectiv, a distanței medii de deplasare în funcție de concentrația motorului proteic utilizată, s-a observat că kinezina convențională monomoleculară se deplasează numai câțiva pași de-a lungul axonemei, în timp ce motoarele moleculare multiple fac mai mulți pași (Fig. 5.2, Fig. 5.3). În timp ce viteza medie de deplasare descrește cu mărirea concentrației motorului proteic, distanța medie de deplasare crește cu micșorarea concentrației [Patriche et al., 2012].

5.4. Analiza parametrilor procesivității motorului proteic, Tea2 atât în absența cât și în prezența proteinelor, Mal3 și Tip1

În analiza parametrilor procesivității motorului proteic, Tea2 în absența și în prezența celor două proteine, Mal3 și Tip1, s-a folosit aceeași procedură de identificarea a acestor parametri ca și în cazul kinezinei convenționale. În cazul motorului proteic, Tea2 s-au supus analizei șase probe cu diferite concentrații: soluția stoc (60 μM), 1:2 diluție (30 μM), 1:4 diluție (15 μM), 1:8 diluție (7,5 μM), 1:12 diluție (5 μM) și complexul Mal3-Tip1-Tea2 (1:12 diluție, 5 μM). În urma acestor experimente, numărul bilelor din polistiren acoperite cu motorul proteic, Tea2 utilizate în analiza parametrilor procesivității au variat între 8 și 15.

Cea mai simplă metodă de a identifica parametrii procesivității motorului proteic, Tea2 o reprezintă realizarea experimentelor prin eliberarea captatorului optic și în acest fel se poate observa o deplasare vizibilă a motorului proteic cu ajutorul programului "Bead_Tracking" și a sistemului video. Ca și în cazul kinezinei convenționale, acest motor molecular la o concentrație mare este caracterizat de o valoare mică a vitezei medii de deplasare și una mare a distanței medii de deplasare. Astfel, pentru concentrațiile 60 μM , 30 μM , 15 μM și 7,5 μM viteza medie de deplasare a variat între 9,33 și 50,32 nm/s, iar distanța medie de deplasare între 1975,4 și 1096,3 nm.

Prin diluarea soluției stoc (60 μM) din aproape în aproape, la o diluție de 1:12 corespunzătoare unei concentrații de 5 μM s-a putut identifica comportamentul caracteristic unui motor monomolecular atașat de bila din polistiren. La această concentrație, motorul proteic, Tea2 se deplasează cu o viteză medie de 80,96 nm/s pe o distanță medie de 328 nm. Aceste valori sunt apropiate de cele măsurate de [Bieling et al., 2007]. Prin adăugarea proteinelor Mal3 și Tip1 în soluția ce conține bile din polistiren acoperite cu un singur motor proteic, Tea2 (5 μM), s-a observat o dublare a distanței medii de deplasare (635,35 nm). În acest fel, cele două proteine ajută acest motor proteic monomolecular să se deplaseze mai departe de-a lungul axonemei cu o viteză medie de deplasare egală cu cea obținută în experimentele realizate la o concentrație de 5 μM a acestui motor proteic.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

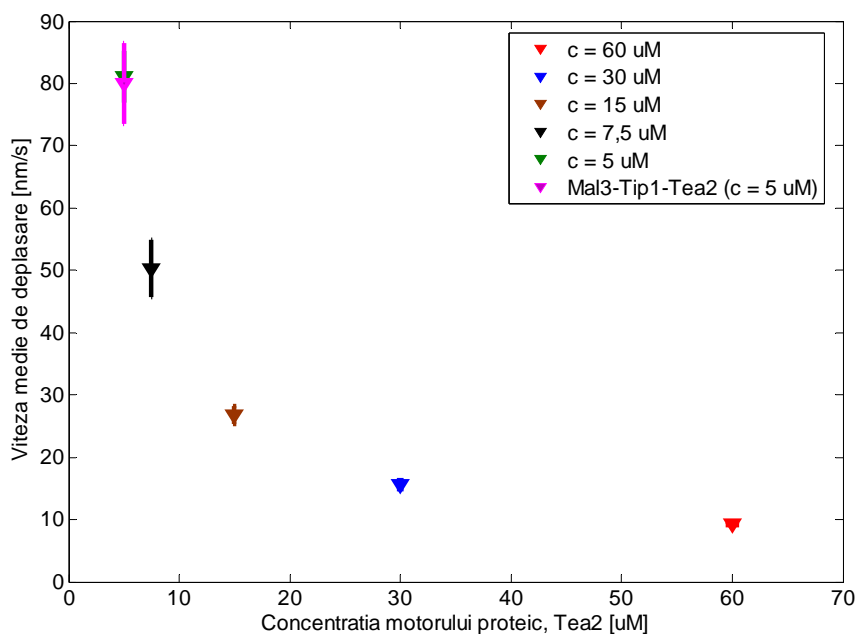


Fig. 5.4. Viteza medie de deplasare a motorului proteic, Tea2 versus concentrația acestuia. Barele de eroare reprezintă eroarea standard a valorii medii (SEM) a vitezei de deplasare

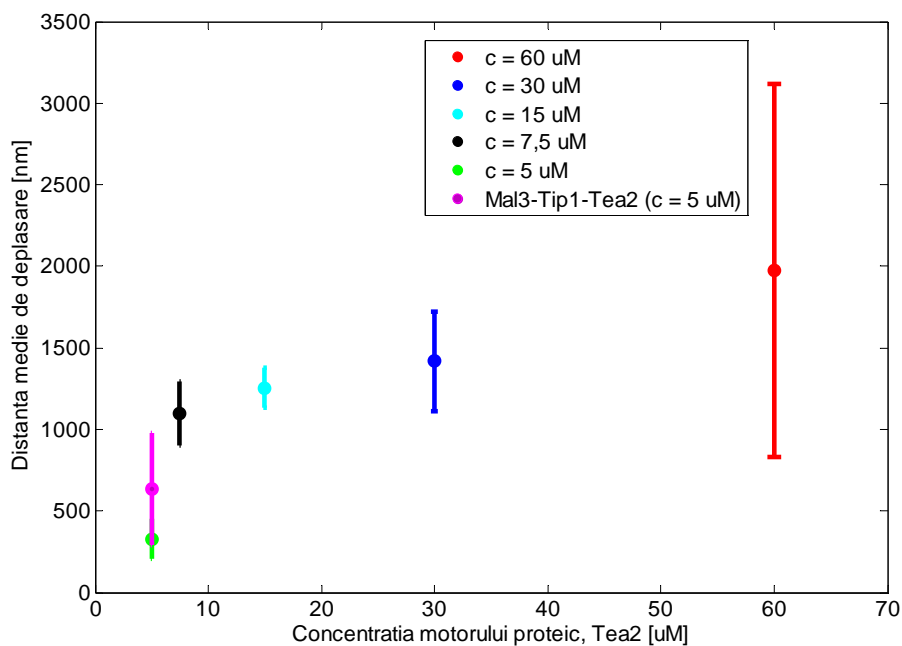


Fig. 5.5. Distanța medie de deplasare a motorului proteic, Tea2 versus concentrația acestuia. Barele de eroare reprezintă deviația standard a distanței medii de deplasare

Studii privind comportamentul cooperativ al motoarelor proteice, Tea2 s-au realizat prin analiza soluțiilor cu diferite concentrații, ce au variat între 60 și 50 μM . Prin reprezentarea grafică a vitezei medii și respectiv, a distanței medii de deplasare a motorului proteic, Tea2 ca o

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

funcție de concentrație s-a observat aceeași tendință ca și în cazul kinezinei convenționale de a face câțiva pași la o concentrație mică a motorului molecular și pași multipli la o concentrație mare (Fig. 5.4 și Fig. 5.5). Valoarea vitezei medii de deplasare a motorului proteic monomolecular, Tea2 a fost aceeași atât în absența cât și în prezența celor două proteine, Mal3 și Tip1, în jur de 80 nm/s.

5.5. Investigații privind mecanismul de generare a forței caracteristice motorului proteic monomolecular, Tea2 folosind tehnica "optical tweezers" cu sistemul "force-feedback"

Pentru a studia comportamentul mecanic al motorului proteic monomolecular, Tea2 (5 μM) în prezența diferitelor forțe constante, s-a schimbat poziția de referință în intervalul 0-100 nm. Forța aplicată asupra bilei este calculată prin multiplicarea distanței de la centrul captatorului optic (obținută din semnalul QPD înregistrat) cu rigiditatea captatorului (obținută din spectrul puterii). Apoi, semnalul QPD este calibrat pe direcțiile x și z pentru a fi în regim liniar corespunzător graficului intensitatea semnalului – poziție. După aceste etape de calibrare, bila din polistiren acoperită cu motorul proteic, Tea2 este plasată pe o axonemă dispusă orizontal. Din semnalul înregistrat cu ajutorul programului QPD tracking se poate observa în ce direcție de deplasează bila. După ce se observă o deplasare vizibilă a bilei captate, programul FF este activat. La începutul experimentului, poziția de referință este setată la o valoare de 0 nm și dacă bila va continua să se deplaseze, poziția de referință se va schimba în aceeași direcție cu deplasarea motorului proteic. În acest fel, se va aplica o forță de reacțiune asupra bilei din polistiren acoperite cu motorul proteic monomolecular, Tea2.

Prin reprezentarea grafică a vitezei medii de deplasare a stativului versus forța aplicată asupra bilei acoperite cu motorul proteic, Tea2, se poate observa că descreșterea valorii vitezei se datorează creșterii valorii forței aplicată asupra bilei (Fig. 5.6, Fig. 5.7). La o poziție de referință, $x = 0$ nm, viteza medie deplasare a motorului proteic monomolecular, Tea2 a fost în jur 62,31 nm/s în prezența unei forțe constante de 0,13 pN și respectiv, 23,68 nm/s pentru $F = 0,84$ pN. Același comportament s-a identificat și în experimentele realizate în prezența complexului proteic, Mal3-Tip1-Tea2. În momentul adăugării celor două proteine, Mal3 și Tip1 în soluția ce conținea motorul proteic monomolecular, Tea2, la o valoare scăzută a forței, $F = 0,14$ pN, viteza medie de deplasare a fost în jur de 76,80 nm/s și la o valoare mai mare, $F = 1,03$ pN a fost de 14,22 nm/s.

Pentru a determina valoarea forței de stagnare a motorului proteic, Tea2 din reprezentarea grafică viteza stativului versus forța constantă aplicată asupra bilei, s-a utilizat metoda propusă de [Svoboda et al., 1994] pentru a măsura forța de stagnare caracteristică kinezinei convenționale (în jur de $5,1 \pm 0,5$ pN). S-a aplicat o aproximare liniară la punctele din

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Fig. 5.6 și Fig. 5.7 pentru a găsi intersecția cu axa x. Rezultatul acestei aproximări prezice că forța de stagnare a motorului proteic Tea2 în absența celor două proteine, Mal3 și Tip1 este de 1,3 pN și respectiv, 1,2 pN în prezența acestora.

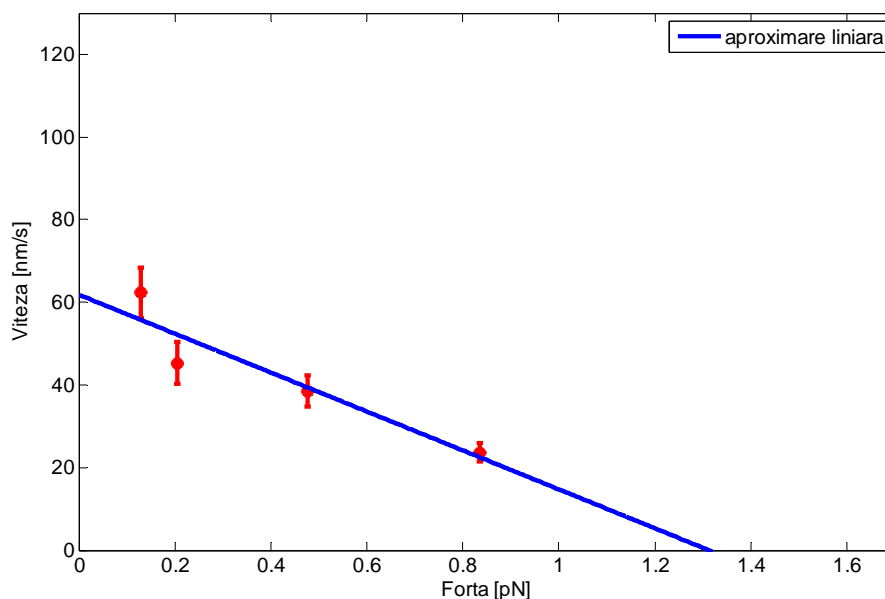


Fig. 5.6. Viteza stativului versus forța constantă aplicată asupra bilei acoperite cu motorul proteic, Tea2. Barele de eroare reprezintă eroarea standard a valorii medii (SEM) a vitezei de deplasare.

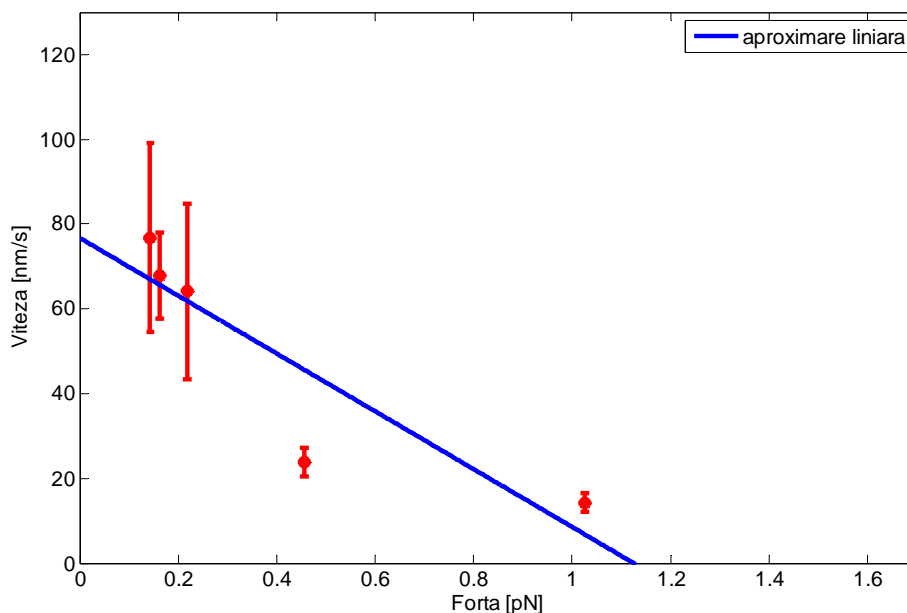


Fig. 5.7. Viteza stativului versus forța constantă aplicată asupra bilei acoperite cu motorul proteic, Tea2 în prezența celor două proteine, Mal3 și Tip1. Barele de eroare reprezintă eroarea standard a valorii medii (SEM) a vitezei de deplasare

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Chiar dacă predicțiile ne spun că motorul proteic, Tea2 ar trebui să se oprească la o forță de 1,3 pN, din deplasarea stativului obținută din semnalul elementului piezo se poate observa că după un eveniment scurt de deplasare acest motor proteic se oprește la o valoare a forței în jur de 1 pN atât în absența cât și în prezența proteinelor, Mal3 și Tip1.

5.6. Concluzii

Validarea experimentală a comportamentului kinezinei la deplasarea sub sarcină constantă s-a realizat prin investigarea parametrilor procesivității și a mecanismului de generare a forței caracteristice celor două motoare proteice supuse analizei (kinezina convențională și motorul proteic, Tea2) cu ajutorul tehnicii "optical tweezers". În tabelul 5.1. sunt prezentate încercările experimentale realizate cu ajutorul acestei tehnici pentru a valida comportamentul kinezinei la deplasarea sub sarcină constantă. Tehnica "optical tweezers" oferă posibilitatea de a studia proprietățile micro-mecanice ale motoarelor proteice de tip kinezină, ce au importante aplicații în transportul intracelular. Prin dezvoltarea unui protocol favorabil realizării experimentelor la nivel monomolecular, a fost posibil să măsurăm procesivitatea kinezinei convenționale monomoleculare și respectiv, a motorului proteic monomolecular, Tea2 în prezența celor două proteine, Mal3 și Tip1. Prezența acestor două proteine în soluția de motor proteic monomolecular, Tea2 a determinat dublarea distanței medii de deplasare, ajutând în acest fel ca motorul proteic să se deplaseze pe o distanță mai lungă cu aceeași viteză medie de deplasare, în jur de 80 nm/s.

Mecanismul de generare a forței caracteristice motorului proteic monomolecular, Tea2 a fost studiat folosind sistemul experimental, ce are încorporat un program de aplicare a forței constante cunoscut sub numele "force-feedback" program. Folosind, acest sistem experimental s-a putut identifica forța de stagnare caracteristică motorului proteic monomolecular, Tea2 atât în absența cât și în prezența celor două proteine, Mal3 și Tip1. Valoarea forței de stagnare caracteristică acestui motor proteic a fost în jur de 1 pN. În comparație cu kinezina convențională, motorul proteic, Tea2 se deplasează cu o viteză de 5 ori mai mică (viteza medie de deplasare pentru kinezina convențională este egală cu 452,19 nm/s, iar pentru motorul proteic, Tea2 este 80 nm/s) și sarcina maximă transportată este de 4 ori mai mică (forța de stagnare pentru kinezina convențională este în jur de 5,1± 0,5 pN, în timp ce pentru motorul proteic Tea2 este egală cu 1 pN). Aceste valori scăzute pentru viteza medie de deplasare și a forței de stagnare caracteristice motorului proteic, Tea2 se datorează prezenței celei de-a doua zone de atașare la microtubuli, cunoscută sub numele zona de interacțiune cu proteina Mal3.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Tabelul 5.1. Parametrii de procesivitate și forța de stagnare caracteristice celor două motoare moleculare de tip kinezină supuse analizei. c – concentrația motorului molecular; $\langle d \rangle$ - distanța medie de deplasare; SD_1 – deviația standard a distanței medii de deplasare; $\langle v \rangle$ - viteza medie de deplasare; SD_2 – deviația standard a vitezei medii de deplasare; SEM – eroarea standard a valorii medii a vitezei de deplasare; F – forța de stagnare

Tipul motorului molecular	c [μm]	$\langle d \rangle$ [nm]	SD_1 [nm]	$\langle v \rangle$ [nm/s]	SD_2 [nm/s]	SEM [nm/s]	F [pN]
Kinezina convențională	34	3650	1892,1	47,55	5,87	2,17	5,1± 0,5 [Svoboda et al., 1994]
	3,4	2520	1062,2	72,68	7,23	4,07	
	1,7	2294,3	973,58	104,40	10,54	7,02	
	1,132	931,33	211,95	452,19	50,71	43,21	
Motorul proteic, Tea2	60	1975,4	1142,1	9,33	0,68	0,30	0,84
	30	1420	305,33	15,66	0,92	0,71	
	15	1254	121,35	26,77	2,47	1,41	
	7,5	1096,3	195,58	50,32	6,32	4,66	
	5	328	121,13	81,01	6,11	4,15	
Mal3-Tip1-Tea2	5	635,55	343,69	80	8,91	6,57	1,03

Valorile mari ale deviației standard ale distanței medii de deplasare caracteristice celor două motoare proteice, kinezina convențională și motorul proteic Tea2, se datorează atât perioadelor scurte de stagnare cât și tendinței de a se deplasa înapoi ca urmare a prezenței diferitelor obstacole pe structura axonemei, de-a lungul căreia aceste motoare moleculare se deplasează. La o concentrație mare a motoarelor proteice, procesivitatea bilei ce are atașat motorul molecular este redusă, fiind caracterizată printr-o valoare mică a vitezei medii de deplasare și o valoare mare a distanței medii de deplasare. În timp ce, la o valoare scăzută a concentrației, procesul de disociere a motorului proteic de la filamentele de citoscheletal este mult mai rapid datorită parcurgerii unei distanței medii de deplasare mai mici cu o viteză medie de deplasare mai mare. Cea mai plauzibilă explicație pentru ceea ce se întâmplă la aceste valori ridicate ale concentrației constă în faptul că excesul de motoare proteice neatașate la bilele din polistiren interferă cu deplasarea bilei supuse analizei. O valoare mare a distanței medii de deplasare caracteristică bilelor transportate de mai multe motoare proteice poate avea o serie de aplicații ale transportul

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

biomimetic al sistemelor cu particularități ale motoarelor moleculare în bionanotehnologie, unde mărimea tipică a echipamentului nu depășește câțiva microni.

Capitolul 6. Concluzii și contribuții personale

6.1. Concluzii

În urma cercetărilor realizate în cadrul acestei teze de doctorat, pot fi enunțate următoarele concluzii generale:

1. Algoritmul de modelare a solicitării mecanice la tracțiune aplicată proteinelor dezvoltat în cadrul acestei teze de doctorat are la bază modelarea structurală a comportării domeniilor componente kinezinei sub influența solicitărilor mecanice. Această modelare s-a efectuat cu ajutorul simulărilor de dinamică moleculară folosind soft-ul NAMD, realizat de către University of Illinois, USA.

2. Rezultatele numerice obținute în urma acestei modelări structurale au fost analizate cu ajutorul unui algoritm secvențial dezvoltat în Matlab folosit în identificarea dinamicii neliniare și respectiv, în măsurarea rigidității caracteristice structurii de "neck linker" aflată sub influența forțelor fluctuante, ce au variat în intervalul 2-15 pN (deformații mici) și respectiv, 700-1400 pN (deformații mari). Acest comportament neliniar al structurii de "neck linker" se datorează acțiunii a diverselor câmpuri prezente (termic, chimic, mecanic), ce va determina în anumite situații ca elasticitatea acestei structuri să varieze semnificativ.

3. Caracterizarea structurală și mecanică a microtubulilor (filamente de citoscheletal cu un rol esențial în realizarea transportului intracelular) realizată pe baza cercetărilor experimentale (efectuate cu ajutorul microscopiei de forță atomică) și a celor numerice (realizate cu ajutorul simulărilor de dinamică moleculară) a contribuit la identificarea rigidității kinezinei în cazul deformațiilor instantanee. Aceste deformații sunt asociate cu obstacolele prezente în structura microtubulilor datorate acțiunii nocive a unor compuși chimici, cum ar fi "nocodazole" și colchicina.

4. De asemenea, aceste cercetări numerice și experimentale au contribuit la analiza mecanismului implicat în depolimerizarea structurii microtubulilor prin identificarea valorii rigidității afectate de acțiunea nocivă a acestor compuși chimici. Studiarea acestui mecanism de depolimerizare a acestor filamente de citoscheletal are un rol esențial în determinarea

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

principalelor cauze ale apariției bolilor neurodegenerative și constituie o provocare în realizarea diversilor biosenzori folosiți pentru tratarea acestor boli.

5. Validarea experimentală a comportării kinezinei sub sarcină constantă s-a realizat prin determinarea parametrilor de procesivitate (viteza medie de deplasare și distanța medie de deplasare) și a forței de stagnare caracteristice motorului molecular de tip kinezină cu ajutorul tehnicii "optical tweezers". S-au supus analizei două tipuri de motoare moleculare: kinezina convențională și motorul proteic, Tea2 cu importante aplicații în transportul intracelular. Parametrii de procesivitate mășurați pentru cele două motoare proteice analizate au contribuit la înțelegerea principiului biomimetic al motorului molecular de tip kinezină. Motorul proteic, Tea2 în timpul deplasării de-a lungul microtubulilor a prezentat o forță de stagnare în jur de 1 pN, ce reprezintă încărcarea maximă ce poate fi transportată de acest motor molecular în interiorul celulei. În comparație cu kinezina convențională, sarcina maximă transportată de motorul proteic, Tea2 este de 4 ori mai mică ca urmare a prezenței celei de-a doua zone de atașare la microtubuli, cunoscută sub numele de zona de interacțiune cu proteina Mal3.

6. În concluzie, aceste micro-proprietăți (parametrii de procesivitate și forța de stagnare) caracteristice motorului molecular de tip kinezină măsurate cu ajutorul tehnicii "optical tweezers" și comportamentul dinamic neliniar al structurii de "neck linker" constituie elemente cheie în realizarea bio-nano-dispozitivelor și a dispozitivelor cu rigiditate variabilă, cum ar fi: amortizoare de vibrații, izolatoare de vibrații, dispozitive cu structuri inteligente de variere a rigidității, nanopompe și nanoarcuri.

6.2. Contribuții personale

Studiile numerice și experimentale dezvoltate în cadrul acestei teze de doctorat au condus la o serie de contribuții originale privind cercetările modelării mecano-chimice a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigidități variabile, ce sunt prezentate în cele ce urmează.

1. Conceperea unui algoritm de modelare și simulare a încercărilor mecanice aplicate kinezinei.
2. Modelarea structurală a structurii de "neck linker" sub influența forțelor fluctuante s-a realizat cu ajutorul simulărilor de dinamică moleculară precum și modelarea fenomenului dinamic neliniar caracteristic acestui element de legătură între capătul globular și domeniul de răsucire în α -helix al kinezinei, ce are un rol definitoriu în mecanismul de deplasare al acestui motor proteic de-a lungul microtubulilor.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

3. Extragerea principiului de variere a rigidității pentru dispozitivele la care rigiditatea trebuie să fie variabilă prin analiza comportamentului structurii de "neck linker" sub influența diverselor solicitări mecanice. Această analiză s-a realizat prin identificarea rigidității structurii de "neck linker" în cazul deformațiilor constante, folosind simulările de dinamică moleculară direcționată prin aplicarea unor forțe de tracțiune cuprinse în intervalul 2-15 pN (deformații mici) și respectiv, 700-1400 pN (deformații mari).
4. Îmbunătățirea principiului de funcționare a dispozitivelor cu rigiditate variabilă (acest principiu se bazează pe sistemul de arcuri liniare din componența lor) s-a realizat prin preluarea caracteristicilor dinamicii neliniare a structurii de "neck linker" în cazul forțelor fluctuante. Așadar, cantitatea de vibrații înmagazinate în diverse mașini rotative (motoare, pompe) va fi redusă prin introducerea unui dispozitiv ce prezintă un principiu de variere a rigidității identic cu cel al structurii de "neck linker".
5. Identificarea rigidității kinezinei în cazul deformațiilor instantanee s-a realizat prin prisma analizei proprietăților structurale și mecanice ale microtubulilor și respectiv, a procesului de depolimerizare a structurii acestora prin acțiunea unor factori nocivi, cum ar fi medicamentele de tratare a cancerului sau pesticidele. Această analiză a avut la bază cercetările numerice efectuate cu ajutorul simulărilor de dinamică moleculară și cele experimentale realizate folosind microscopia de forță atomică.
6. Investigarea mecanismului de depolimerizare a microtubulilor folosind dinamica moleculară.
7. Investigarea dinamicii și mecanismului de generare a forței caracteristice celor două motoare moleculare, kinezina convențională și motorul proteic, Tea2 în timpul deplasării lor de-a lungul microtubulilor, cu ajutorul tehnicii experimentale "optical tweezers".
8. Măsurarea forței de stagnare caracteristice motorului proteic, Tea2 atât în prezența cât și în absența celor două proteine, Mal3 și Tip1 în timpul deplasării motorului molecular de-a lungul microtubulilor. Împreună cele trei proteine, Mal3, Tip1 și Tea2 formează un complex ce are rolul de a regla mecanismul de funcționare a microtubulilor și astfel, se va asigura o funcționare optimă a transportului intracelular.
9. Investigarea principiului biomimetic caracteristic motorului molecular de tip kinezină. Alături de simulările de dinamică moleculară, cercetările experimentale realizate în cadrul acestei teze de doctorat cu ajutorul celor două tehnici "single-molecule" (microscopia de forță atomică și "optical tweezers") au contribuit la identificarea și înțelegerea în detaliu a principiului biomimetic caracteristic kinezinei.

6.3. Direcții viitoare de cercetare

Datorită complexității acestui domeniu de cercetare a transportului intracelular realizat de către sistemul kinezină-microtubuli s-au identificat o serie de direcții viitoare de cercetare:

- Investigarea dinamicii kinezinei în cazul aplicării unor forțe oscilante cu ajutorul tehnicii experimentale ”optical tweezers”.
- Modelarea cooperativității motoarelor de tip kinezină atunci când sunt transportate diverse sarcini variabile.
- Proiectarea nanopompelor, ce au încorporate un element de acțiune, ce prezintă caracteristicile kinezinei.
- Elaborarea unui principiu de funcționare a unui biosenzor cu interogare activă.

Bibliografie selectivă

[A]

1. Alzberg, P.J., Peskin, C.S., *A Brownian Dynamics model of kinesin in three dimensions incorporating the force-extension profile of the coiled-coil cargo tether*, Bull. Math. Biol., vol. 68, no. 1, 131-160, 2006.
2. Arnal, I.,m Wade, R.H., *How does taxol stabilize microtubules?*, Current Biology, vol. 5, no. 8, 900-908, 1995.

[B]

3. Banu, M., **Patriche, S.**, Coman, M., Matsushita, S., Tofan, A., Epureanu, A., *Investigation of ubiquitin deformation mechanism under induced stretch-compression loads*, Romanian Journal of Morphology and Embryology, Suppl. 1, vol. 52, 449-454, 2011.

[C]

4. Case, R.B., Rice, S., Hart, C.L., Ly, B., Vale, R.D., *Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility*, Curr. Biol, vol. 10, 157-160, 2000.
5. Czövek, A., Szöllösi, G.J., Derényi, I., *The relevance of neck linker docking in the motility of kinesin*, Biosystems, vol. 93, 23-29, 2008.

[D]

6. Darden, T., York, D., Pederson, L., *Particle mesh ewald-an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems*, J. of Chemical Physics, vol. 98, 10089-10092, 1993.
7. Duerr, K., Tesfamarian, S., Wickramasinghe, V., Grewal, A., *Variable stiffness smart structure systems to mitigate seismic induced building damages*, Earthquake Engineering & Structural Dynamics, 1-17, 2012.

[H]

8. Han, S. W., **Patriche, S.**, Banu, M., Adachi, T., *Real-time Monitoring of Changes in Microtubule Mechanical Properties in Response to Microtubule-Destabilizing Drug Treatment*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Special Section on „Nanotechnology in Green Science and Engineering, 1-13, 2012 (accepted).
9. Hariharan, V., Hancock, W.O., *Insights into Mechanical Properties of the Kinesin Neck Linker Domain from Sequence Analysis and Molecular Dynamics Simulations*, Cellular and Molecular Bioengineering, vol. 2, no. 2, 177-189, 2009.
10. Hendricks, G.A., Epureanu, B.I., Meyhöfer, E., *Mechanistic mathematical model of kinesin under time and space fluctuating loads*, Nonlinear Dyn, vol. 53, 303-320, 2008.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

11. Hoover, W.G., *Canonical dynamics-equilibrium phase-space distributions*, Physical Review A., vol. 31, 9-48, 1999.
12. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., *VMD – Visual Molecular Dynamics*, Journal of Molecular Graphics 1.4.1, 33-38, 1996.
13. <http://www-personal.umich.edu/~epureanu/>
14. <http://www.ac.tut.fi/aci/courses/ACI-51406/mat/pdf/Mechanical%20Micropumps.pdf>

[L]

15. Lipomi, D.J., Vosgueritchian, M., Tee, B., C.K., Hellstrom, S.L., Lee, J.A., Fox, C.H., Bao, Z., *Skin-like pressure and strain sensors based on transparent elastic films of carbon nanotubes*, Nature Nanotechnology, vol. 6, 788-792, 2011.

[M]

16. Mackerell, A.D., Bashford, D., Bellot, M., Dumbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchner, L., Kuczera, K., Lau, F. T.K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D.T., Prodhom, B., Reither, W.E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J.C., Store, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M., *All atom empirical potential for molecular modelling and dynamics studies of proteins*, Journal of Chemical Physics, vol. 97, 2635-2643, 1992.
17. Martyna, G.J., Klein, M.L., Tuckerman, M., *Nosé-Hoover chains – the canonical ensemble via continuous dynamics*, J. of Chemical Physics, vol. 97, 2635-2643, 1992.
18. Marx, A.K., Zhou, T., Montrone, A., McIntosh, D., Braunhut, S.J., *A comparative study of the cytoskeleton drugs nocodazole and taxol with a mammalian cell quartz crystal microbalance biosensor: different dynamic responses and energy dissipation effect*, Analytical Biochemistry, vol. 361, no. 1, 77-92, 2007.
19. Matsushita, S., Adachi, T., Inuoue, Y., Hojo, M., Sokabe, M., *Evaluation of extensional and torsional stiffness of single actin filaments by molecular dynamics analysis*, J. of Biomechanics, vol. 43, no. 16, 3162-3167, 2010.
20. Mogilner, A., Fisher, A.J., Baskin, R.J., *Structural changes in the neck linker of kinesin explain the load dependence of the motor's mechanical cycle*, J. theor. Biol., vol. 211, 143-157, 2001.

[P]

21. **Patriche, S.**, Matsushita, S., Banu, M., Epureanu, B.I., Adachi, T., *Atomistic Mechano-Chemical Modeling of Kinesins*, PROC. OF SPIE, vol. 7975, 797519-(1-6), 2011.
22. **Patriche, S.**, Banu, M., Onisor, C., Musat, C.L., *Harmful effect of chemical compounds used in agriculture on the human health*, THE ANNALS OF „DUNAREA DE JOS”

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

UNIVERSITY OF GALATI, Fascicle V, Technologies in Machine Building, vol. 2, 129-134, 2011.

23. Patriche, S., Banu, M., Matsushita, S., Han, S.W., *Experimental and atomistic computational studies of mechano-chemical transport processes involved in neurodegenerative diseases*, THE ANNALS OF „DUNAREA DE JOS” UNIVERSITY OF GALATI, Fascicle V, Technologies in Machine Building, Special edition: Towards Mechanical Engineering Applications to Medicine and Biology, 9-14, 2012.

24. Peskin, C. S., Oster, G., *Coordinates hydrolysis explains the mechanical behavior of kinesin*, Biophysical Journal, vol. 68, 202S-211S, 1995.

25. Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, D.R., Kale, L., Schulten, K., *Scalable molecular dynamics with NAMD*, Journal of Computational Chemistry, vol. 26, 1781-1802, 2005.

[S]

26. Sclick, T., Skeel, R.D., Brunger, A.T., Kalek, L.V., Board, J.A., Hermanes, J., Schulten, K., *Algorithmic challenges in computational molecular biophysics*, J. of Computational Physics, vol. 151, 9-48, 1999.

27. Sindelar, C.V., Budny, M.J., Rice, S., Naber, N., Fletterick, R., Cooke, R., *Two conformations in the human kinesin power stroke defined by X-ray crystallography and EPR spectroscopy*, Nat. Struct. Biol., vol. 9, 844-848, 2002.

28. Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J., Block, S.M., *Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry*, Nature, vol. 365, 721-727, 1993.

29. Svoboda, K., Block, S.M., *Force and Velocity Measured for Single Kinesin Molecules*, Cell, vol. 77, 773-784, 1994.

[T]

30. Tentor, L. B., *Characterization of an electromagnetic tuned vibration absorber*, PhD Thesis, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, SUA, 2001.

[V]

31. Vale, R.D., *The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport*, Cell, vol. 112, 467-480, 2003.

[W]

32. Wang, W., Yang, K., Gaillard, J., Bandaru, P.R., Rao, A.M., *Rational Synthesis of Helically Coiled Carbon Nanowires and Nanotubes through the Use of Tin and Indium Catalysts*, Adv. Mater. vol. 20, 179-182, 2008.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

[Z]

33. Zhou, Y., Wang, X., Zhang, X., Li, W., *Variable stiffness and damping magnetorheological isolator*, Front. Mech. Eng. China, vol. 4, no. 3, 310-315, 2009.

LISTA LUCRĂRILOR SUSȚINUTE ȘI PUBLICATE

Lucrări publicate în jurnale ISI

1. Han, S. W., **Patriche, S.**, Banu, M., Adachi, T., *Real-time Monitoring of Changes in Microtubule Mechanical Properties in Response to Microtubule-Destabilizing Drug Treatment*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Special Section on Nanotechnology in Green Science and Engineering, 1-13, 2012 (accepted) (Factor de impact: 1.351; Scor relativ de influență: 1.09971).
2. Han, S.W., Morita, K., **Patriche, S.**, Kihara, T., Miyake, J., Banu, M., Adachi, T., *Probing actin filament and binding protein interaction using an atomic force microscopy*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 1-5, 2012 (accepted) (Factor de impact: 1.351; Scor relativ de influență: 1.09971).
3. Banu, M., **Patriche, S.**, Coman, M., Matsushita, S., Tofan, A., Epureanu, A., *Investigation of ubiquitin deformation mechanism under induced stretch-compression loads*, ROMANIAN JOURNAL OF MORPHOLOGY AND EMBRYOLOGY, Suppl. 1, VOLUME: 52, Pages: 449-454, Published: 2011 (Factor de impact: 0.381; Scor relativ de influență: 0).

Lucrări publicate în volume indexate ISI

4. **Patriche, S.**, Matsushita, S., Banu, M., Epureanu, B.I., Adachi, T., *Atomistic Mechano-Chemical Modeling of Kinesins*, PROC. OF SPIE, Volume: 7975, Pages: 797519-(1-6), Published: 2011.

Lucrări publicate în volume jurnale BDI

5. **Patriche, S.**, Banu, M., Matsushita, S., Han, S.W., *Experimental and atomistic computational studies of mechano-chemical transport processes involved in neurodegenerative diseases*, THE ANNALS OF „DUNAREA DE JOS” UNIVERSITY OF GALATI, Fascicle V, Technologies in Machine Building, Special edition: Towards Mechanical Engineering Applications to Medicine and Biology, Pages: 9-14, Published: 2012.
6. **Patriche, S.**, Banu, M., Onisor, C., Musat, C.L., *Harmful effect of chemical compounds used in agriculture on the human health*, THE ANNALS OF „DUNAREA

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

DE JOS” UNIVERSITY OF GALATI, Fascicle V, Technologies in Machine Building, VOLUME: 2, Pages: 129-134, Published: 2011.

Lucrări comunicate

1. **Patriche, S.,** Banu, M., Dogterom, M., Epureanu, B., *Insight into the single-molecule behavior of kinesin Tea2 using optical tweezers technique*, International Conference on Nanoscience+Technology, Location: Paris, FRANTA, Date: 23-27 July, 2012.
2. **Patriche S.,** Banu, M., *Analiza proprietăților micro-mecanice ale sistemului motor protein Tea2-axonemes folosind tehnica "optical tweezers"*, Sesiunea națională de comunicări științifice "Anghel Saligny" pentru elevi, studenți, masteranzi și doctoranzi, Ediția IV, Location: Galați, ROMANIA, Date: MAI 18-21, 2012.
3. **Patriche, S.,** Banu, M., Dogterom, M., Epureanu, B.I., *Experimental and atomistic computational studies of mechano-chemical transport processes involved in neurodegenerative diseases*, „The PhD Student Symposium”, Location: Galati, ROMANIA, DEC 7, 2011.
4. **Patriche, S.,** Banu, M., Epureanu, B.I., *Harmful effect of chemical compounds used in agriculture on the human health*, International Conference "Environmental Capacity Building", Bucharest, Romania, November 11-13, 2011.
5. **Patriche, S.,** Banu, M., Epureanu, B.I., *Atomistic Computational Models of Mechano-Chemical Transport Process Involved in Alzheimer's Disease*, Global Alzheimer's Research Summit - Present and Future of Alzheimer's Research, Madrid, Spain, September 22-23, 2011.
6. **Patriche, S.,** Banu, M., Afteni, M., *Biomimetics of MT-kinesin system used for biosensors applications*, International Workshop "Research quality in doctoral school, increased industrial and international visibility", Galati, Romania, July 13-14, 2011.
7. **Patriche, S.,** Banu, M., Afteni, M., *Schimbările conformaționale ale moleculei de imunoglobulin în condiții de tracțiune*, Sesiunea națională de comunicări științifice studențești "Anghel Saligny", Ediția III, Location: Galati, ROMANIA, MAI 18-20, 2011.
8. **Patriche, S.,** Matsushita, S., Banu, M., Epureanu, B.I., Adachi, T., *Atomistic Mechano-Chemical Modeling of Kinesins*, SPIE Smart Structure/NDE – Conference 7975: Bioinspiration, Biomimetics, and Bioreplication, San Diego, California, USA, March 6-10, 2011.

Modelarea mecano-chimică a transportului intracelular cu aplicații în proiectarea dispozitivelor cu rigiditate variabilă

Curriculum vitae

Informații personale

Nume / Prenume: Patriche Simona

Adresă: Str. Ovidiu, nr 11, Bl. M10, Ap. 31, Galați, România

Telefon: 0040742901261

E-mail(uri): s_patriche@yahoo.com, simona.patriche@ugal.ro

Data nașterii: 15 august 1985

Educație și formare

- Master. Specializarea : Monitorizarea și Managementul Mediului, Facultatea de Științe, Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați, 2008 – 2010;
- Licență. Profilul : Fizică. Specializarea : Fizică – chimie, Facultatea de Științe, Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați;
- Liceu. Profilul : Științe ale naturii, Liceul teoretic ”Emil Racoviță”, Galați, 2000 – 2004.

Limbi străine cunoscute: Engleză (nivel mediu), Italiană (nivel începător).

Competențe și aptitudini de utilizare a calculatorului: Utilizator experimentat a pachetului Microsoft Office (Word, Excel and PowerPoint) și a programelor de dinamică moleculară: VMD si NAMD); Aplicația grafică "Adobe Illustrator", soft-ul de programare "Matlab".

Stagii de formare profesională

- Bursa Erasmus - University of Camerino (Department of Chemistry), 1 S.Agostino Street, 62032 Camerino (Italy) - 01/10/2006 - 15/02/2007;
- Summer school "Advanced Catalysis and Organometallic Chemistry" - University of Camerino (Department of Chemistry), 1 S.Agostino Street, 62032 Camerino (Italy) - 16/08/2009 - 28/08/2009;
- IPA student - Molecular Dynamics Simulations and Atomic Force Microscopy - RIKEN Innovation Center - Computational Cell Biomechanics Team (VCAD System Research Program) 351-0192 Wako, Saitama (Japan) - 04/06/2010 - 17/03/2011;
- Biophysics - Optical Tweezers Technique Internship - FOM Institute AMOLF (Bio-assembly &-organization); Science Park 104, 1098 XG Amsterdam (The Netherlands) - 25/06/2011 - 25/10/2011, 09/01/2012 - 09/05/2012.