

Molekylære motorer: Små systemer langt fra ligevægt

Af Natalia Golubeva, Institut for Fysik og Astronomi, Aarhus Universitet

Inden i vores kroppe opererer de såkaldte molekylære motorer langt fra termodynamisk ligevægt, hvor deres opførsel på grund af deres lille størrelse ultimativt er bestemt af termiske fluktuationer. Helt ny fysik er nødvendig for i detaljer at studere energiprocesser i disse små biologiske maskiner.

Indledning

En lang række biologiske systemer, der udfører vigtige opgaver inden i kroppen som fx kopiering af DNA og transport af molekyler inden i cellen, hører til i kategorien af små systemer, der opererer langt væk fra ligevægt. Motivationen for at studere disse systemer har derfor ikke manglet, men det er først for 20 år siden, da teknologiske landvindinger gjorde det muligt, at studere de små systemer eksperimentelt, at forskningen i ikke-ligevægtstermodynamik af små systemer for alvor tog fart. En særlig klasse små systemer er de såkaldte molekylære motorer. Vi vil se på, hvad de er for nogle størrelser, og vise hvordan nye resultater indenfor ikke-ligevægtstermodynamik kan bruges til at studere energiprocesser i disse biologiske motorer.

Molekylære motorer

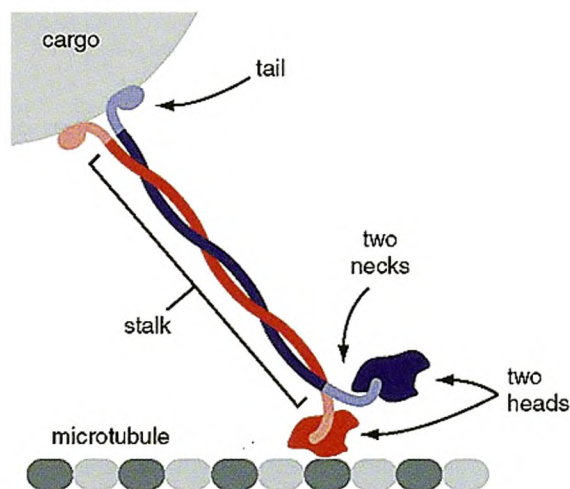
Molekylære motorer er fællesbetegnelsen for biologiske komplekser, der opererer ved at omdanne kemisk energi, som oftest ved hydrolyse, til brugbart mekanisk arbejde. Hydrolyse er en kemisk reaktion, hvor et organisk molekyle, dvs. et kemisk stof, der indeholder kulstofatomer, bliver spaltet til to organiske molekyler under vandoptagelse. Disse molekylære maskiner udfører et utal af forskellige opgaver i cellen såsom transport af store molekyler, reparation af DNA eller kopiering af DNA og RNA. RNA består ligesom DNA af kæder af nukleotider, og har forskellige funktioner i cellen. Én slags RNA bruges til at transportere aminosyrer hen til ribosomerne, cellens proteinfabrikker, under den naturlige proteinsyntese, mens en anden slags RNA er et midlertidigt budbringermolekyle, der bringer en gensekvens lagret i DNA ud til cellens cytoplasma, hvor sekvensen oversættes til protein.

Et af de mere kendte eksempler på en molekylær motor er kinesin-motoren (se figur 1), der netop transporterer større livsnødvendige molekyler rundt i cellen, idet disse er for store til selv at diffundere til deres destinationer, dvs. at nå frem på egen hånd i deres tilfældige vandring rundt i cellen. Disse molekylære motorer kunne fx være vesikler, der er en slags beholdere, som cellen bruger til at lagre, transportere eller fordøje diverse materialer. Kinesin-motoren bruges også til at transportere større organeller, dvs. strukturer i cellen, der er omgivet af en membran, og som spiller en rolle i cellens stofskifte. Et eksempel herpå er de såkaldte mitokondrier, der er cellens energifabrikker. Motoren bevæger sig langs de

såkaldte mikrotubuli, der har form af små rør opbygget af proteinet tubulin med en diameter på ca. 24 nm, hvorimod længden kan variere fra et par mikrometer helt op til en millimeter. Selve motoren består af to hoveder, der via en stilk er forbundet til halen, hvorpå molekylet, der skal transporteres, er fastgjort. Denne motor er drevet af den frigjorte energi i hydrolysen af ATP (adenosintrifosfat), som er cellens primære brændstof. Reaktionskemaet for processen kan skrives



hvor produkterne er ADP (adenosindifosfat) og fosfat, P_i . Motoren hydrolyserer ét ATP-molekyle per skridt, dvs. hver gang et af de to hoveder flyttes, hvorved den bevæger sig 8 nm frem. Den kemiske energi, der bliver frigivet under hydrolysen, er omkring $20 k_B T$. Når vi snakker om små systemer, er den termiske energi $k_B T$, hvor k_B er Boltzmanns konstant, og T er temperaturen, en bekvem enhed for energi. Det udførte arbejde er til gengæld $12 k_B T$, hvormed effektiviteten af motoren bliver ca. 60 %.



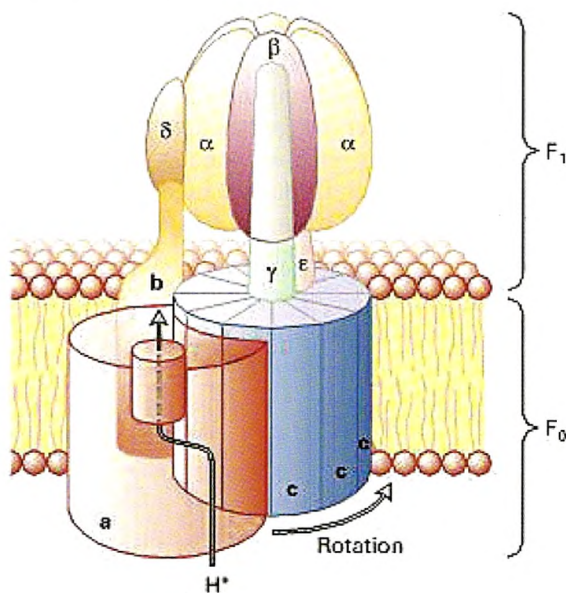
Figur 1. Illustration af hvordan kinesin-motoren opererer. Motoren kommer fremad ved skiftevis at flytte et af de to hoveder i en "hånd-over-hånd"-fremgangsmåde.

Et andet centralt eksempel er F_1 -ATPase-motoren. Denne roterende motor er under naturlige forhold en del af enzymet ATP-syntase (se figur 2). Dette enzym befinder sig i mitokondrierne og forsyner cellen med energi ved at syntetisere ATP fra ADP og fosfat, altså ved den modsatte reaktion af den, vi betragtede ved hydrolysen. For at danne de energirige ATP-molekyler

må vi derfor tilføre en mængde energi, som oftest er i form af protoner, der bevæger sig i en elektrokemisk gradient. Enzymet er omsluttet af en membran, og det er koncentrationsforskelle henover membranen, der giver anledning til gradienten.

ATP-syntase består af en F_0 - og en F_1 -del. Den førstnævnte er en protonpore, der er placeret i mitokondriemembranen. F_1 -delen (også kaldet F_1 -ATPase) er den roterende del, der befinder sig henover membranen, og består af et γ -skaft, der roterer inden i en ring af tre α -enheder og tre β -enheder. Syntesen af ATP sker på aktive steder på β -enhederne og er drevet af formændringerne af de sidstnævnte. Disse er til gengæld forårsaget af rotationen af gammaskaftet, der roterer grundet energitilførslen fra protongradienten.

Som for andre enzymer, er virkningen af ATP-syntase reversibel, dvs. at store mængder af ATP kan forårsage en protongradient henover membranen. Dette bliver faktisk udnyttet af fx gærbakterier, der hydrolyserer ATP for at skabe en gradient, som de bruger til bl.a. at transportere næringsstoffer ind i cellen. I laboratoriet kan man også tvinge motoren til at operere baglæns ved blot at øge ATP-koncentrationen i opløsningen. Desuden fokuserer de fleste studier kun på det simple system F_1 -ATPase, der er den mindste bestanddel af det store enzymkompleks, der kan fungere som en selvstændig motor. Lad os derfor fra nu af snakke om F_1 -ATPase som en molekylær motor, der opererer ved at hydrolysere ATP-molekyler til at skabe mekanisk bevægelse i form af rotation af γ -skaftet.



Figur 2. Illustration af F_0F_1 -ATP-syntase-komplekset, hvoraf F_1 -ATPasen udgør den mindste selvstændige roterende motor.

Tre ATP-molekyler bliver hydrolyseret per omdrejning, så energien fra et enkelt ATP-molekyle bliver altså brugt til en 120° rotation. Inden for den eksperimentelle usikkerhed er denne motors effektivitet målt til 100%. Det er her værd at bemærke, at dette resultat ikke er i modstrid med termodynamikkens anden lov, som vi

kender den formuleret for Carnot-motorer, fordi molekylære motorer ikke opererer mellem to varmebade, hvilket er tilfældet for Carnot-maskiner.

Netop de høje effektiviteter er et af kendetegnene for molekylære motorer. For at forstå årsagen til dette er det vigtigt at studere de energiprocesser, der finder sted i motoren. Specielt er det udførte arbejde, og dermed effekten, samt varmen afsat til omgivelserne afgørende for motorens effektivitet. Vi vil senere se på, hvordan man ved brug af ny teori kan bestemme kraftmomentet, og dermed det udførte arbejde, af F_1 -ATPase eksperimentelt. Kraftmomentet beskriver populært sagt den "trækraft", der får roterende legemer til at dreje rundt.

Brug for ny teori

Klassisk termodynamik har vist sig at være et yderst succesfuldt værktøj til at beskrive energiudveksling i så vidt forskellige makroskopiske systemer som sorte huller, væsker og superledere. Disse systemers opførsel er reproducerbar, og fluktuationer, dvs. afvigelser fra den typisk observerede, gennemsnitlige opførsel, er neglige. I takt med at systemets størrelse bliver mindre og mindre, bliver fluktuationerne større og større, og i små systemer langt fra ligevægt kan termiske fluktuationer lede til væsentlige afvigelser fra systemets gennemsnitlige opførsel. I denne grænse er den velkendte termodynamik ikke længere en god beskrivelse, og ny teori skal til for at forstå disse systemers opførsel.

Små systemer er i denne sammenhæng systemer med en størrelse på omkring 100 nm eller mindre. Molekylære motorer har en størrelse på 2 – 100 nm og er dermed naturligvis inkluderet i denne klasse af systemer, men forskere er også interesseret i andre eksempler såsom magnetiske domæner i ferromagneter, kvanteprikker og små elektriske kredsløb.

Den store interesse for at forske i små ikke-ligevægtssystemer kom i 1990'erne, hvor moderne metoder til mikroskopisk manipulation kom til verden. Værktøjer som optiske og magnetiske pincetter har givet eksperimentalerne adgang til information omkring, hvordan systemerne udveksler varme og arbejde med sine omgivelser. Teoretikerne har fulgt efter med en lang række resultater, der i dag tilsammen går under navnet "stokastisk termodynamik". Vi vil se nærmere på en speciel type relationer kaldet "fluktuationssætninger", der netop kan fortælle os, hvordan sandsynligheden for at observere fluktuationer i energiudvekslinger opfører sig.

Fluktuationssætninger

Ligesom for makroskopiske systemer skelner man for mikroskopiske systemer mellem to forskellige slags tilstande, hvor systemets opførsel ikke ændrer sig med tiden: dels ligevægstilstande, og dels ikke-ligevægts stationære situationer, fx væskestrømning gennem et rør ved en konstant trykforskel. I ikke-ligevægts stationære situationer (ILSS) flyder der strømme igennem systemet, men deres tidsafhængighed er negligerbar. Kinesin-mikrotubulus-systemet er et eksempel,

hvor den tidsafhængige variabel er kinesins (gennemsnits)hastighed. Det kræver en konstant energitilførsel for at opretholde en ILSS, og der bliver konstant afsat energi i det omgivende medie.

Et motormolekyle, der vekselvirker med sin bane og med de andre molekyler i dets vandige omgivelser, er dermed i besiddelse af rigtig mange frihedsgrader. Heldigvis varierer de fleste af disse variable hurtigt og er tilnærmelsesvist i ligevægt sammenlignet med motorens bevægelse. Vi kan altså effektivt set beskrive deres indflydelse på motoren i form af et varmebad med temperaturen T , der vil påvirke bevægelsen gennem fluktuerende, stokastiske kræfter.

Termodynamikkens 1. lov for sådanne stokastiske systemer kan formuleres på følgende måde

$$\Delta U_\tau = W_\tau - Q_\tau, \quad (2)$$

hvor vi forestiller os, at vi observerer et system over et tidsrum τ og måler ændringen i løbet af dette tidsrum i dets totale energi, ΔU_τ , arbejdet udført på systemet, W_τ , og varmen, som systemet afsætter i omgivelserne, Q_τ . Fordi systemet er påvirket af fluktuerende kræfter som diskuteret ovenover, ville vi få forskellige resultater for hver gang, vi gentog ovenstående måling, fordi systemet altså følger en forskellig bane i faserummet hver gang. Med andre ord er ΔU_τ , W_τ og Q_τ stokastiske variable, og vi kan spørge om, hvilke sandsynlighedsfordelinger $P_\tau(\Delta U)$, $P_\tau(W)$ og $P_\tau(Q)$, vi ville få for dem, hvis vi målte et stort antal gange.

Utroligt nok viser det sig, at man kan sige noget meget generelt om fordelingerne i grænsen, hvor τ er tilstrækkelig stor. Lad os for eksempel betragte forholdet $P_\tau(Q)/P_\tau(-Q)$ mellem hhv. sandsynligheden for at måle varmen Q og $-Q$. I ligevægt er der netto set ingen varmeoverførsel mellem system og varmebad, så sandsynligheden for positive og negative varmeoverførsler er lige stor, altså er $P_\tau(Q)/P_\tau(-Q) = 1$. Væk fra ligevægt er dette ikke længere tilfældet. Under en række rimelige antagelser kan man vise, at følgende fluktuationssætningsrelation gælder for en ILSS:¹

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{P_\tau(Q)}{P_\tau(-Q)} = e^{Q/k_B T} \quad (3)$$

Her skal $\tau \rightarrow \infty$ grænsen forstås således, at τ skal være meget større end den tid, det tager systemet at vende tilbage til ILSS efter en lille perturbation.

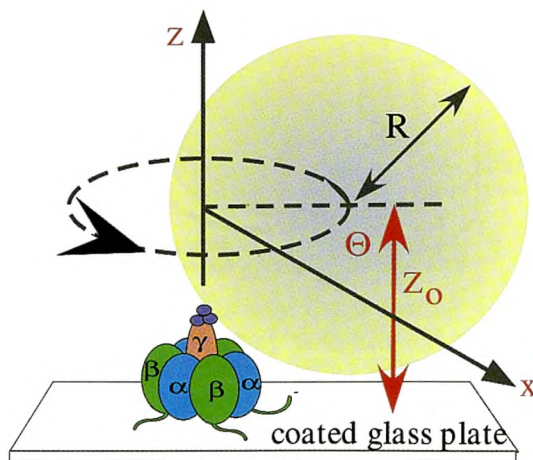
Der er flere ting at bemærke ved ovenstående relation. Først og fremmest siger den, at der er en endelig sandsynlighed for at observere negative værdier af Q , dvs. negative værdier af entropiproduktionen $\sigma = Q/\tau T$. Dette er umiddelbart i uoverensstemmelse med termodynamikkens anden lov. Hvordan kan det være? Bemærk dog, at middelværdien Q altid er positiv, så den 2. lov er altså opfyldt for middelværdier. Desuden fortæller (3), at sandsynligheden for at observere en hændelse, hvor Q er negativ, aftager eksponentielt med størrelsen af Q . Siden varmen og entropien er

ekstensive størrelser, dvs. at Q vokser proportionalt med systemets størrelse, er sandsynligheden for varmeabsorption fra varmebadet altså forsvindende lille for makroskopiske systemer. Dette forklarer, hvorfor vi aldrig observerer "overtrædelser" af termodynamikkens 2. lov i den klassiske termodynamik.

Der eksisterer lignende fluktuationssætninger for W_τ og for en række andre termodynamiske variable under forskellige antagelser. Fluktuationssætninger har en række vigtige konsekvenser og anvendelser, som fx den berømte Jarzynski-lighed, der gør det muligt at bestemme forskellen i Gibbs' frie energi mellem to makroskopiske tilstande ved at måle sandsynlighedsfordelingen for det udførte arbejde i en vilkårlig transformation mellem disse tilstande (se [2] for en detaljeret gennemgang). Man kan også ved hjælp af fluktuationssætninger udlede en fluktuations-dissipations-sætning for ILSS, der kan bruges til at forudsige, hvordan systemet vil reagere på en perturbation. Indtil videre har dette kun været muligt for systemer i ligevægt. Desuden kan man også bruge fluktuationssætninger til at måle gennemsnitlige værdier af det udførte arbejde og dermed effekten. Vi skal i næste afsnit se, hvordan dette er blevet brugt til at måle kraftmomentet af F_1 -ATPase.

Kraftmomentet af F_1 -ATPase

I 2010 publicerede en japansk forskningsgruppe en artikel i det anerkendte tidsskrift *Physical Review Letters*, hvor de beretter om, at de har bestemt kraftmomentet af motoren F_1 -ATPase ved brug af en fluktuationssætning [4]. Dette resultat er interessant af flere årsager. For det første er der endnu kun et fåtal af eksperimenter, der benytter fluktuationssætninger som den underliggende teori. For det andet er det første gang, at kraftmomentet af motoren er blevet målt så præcist, idet der normalt er store usikkerheder forbundet med "konventionelle" måder at bestemme kraftmomentet på, som vi skal se.



Figur 3. Den eksperimentelle opstilling til bestemmelse af kraftmomentet af F_1 -ATPase. En stor perle er fastgjort til motorens γ -skaft og følges med et mikroskop. [1].

¹Fluktuationssætninger er med succes blevet testet eksperimentelt. For en gennemgang se [1].

Eksperimentet er udført på følgende måde. Motoren er fastgjort til en glasplade ved hjælp af en passende belægning på overfladen af pladen. Idet motorens størrelse er få nanometer, er det ikke muligt at observere skaflets rotation i et almindeligt optisk mikroskop, så en probe i form af en stor perle med en størrelse på få hundrede nanometer bliver sat fast på rotoren. Perlen kan nu nemt følges med et mikroskop, og motorens position kan derved bestemmes som funktion af tiden (se figur 3).

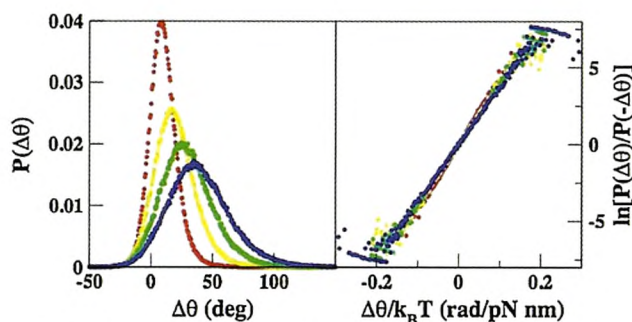
For lange tider kan vi beskrive motorens bevægelse ved den såkaldte Langevin-ligning,²

$$\Gamma\dot{\theta} = N + \xi. \quad (4)$$

Her er $\dot{\theta}$ motorens vinkelhastighed, og N er kraftmomentet. Desuden virker der en friktionskraft på motoren, der er proportional med vinkelhastigheden, hvor proportionalitetskonstanten er friktionskoefficienten Γ . Tilfældige kollisioner med molekyler i det omgivende medie er repræsenteret ved den hvide støj fra varmebadet, ξ . Der gælder derfor, at middelværdien er $\xi = 0$. Hvis vi tager middelværdier på begge sider i (4) får vi altså

$$N = \Gamma\dot{\theta}, \quad (5)$$

idet N er antaget tilnærmelsesvist konstant. Det virker tilsyneladende som om, at vi nemt kan finde N ud fra denne formel, men problemet ligger i bestemmelsen af Γ , som bl.a. afhænger af viskositeten af den omgivende væske, formen og størrelsen af proben samt dens afstand fra glaspladen. Især den sidstnævnte parameter er svær at bestemme i eksperimenter, hvilket betyder, at Γ , og dermed N , bliver behæftet med store usikkerheder ved denne fremgangsmåde.



Figur 4. Venstre: Sandsynlighedsfordelinger $P_\tau(\Delta\theta)$ for forskellige værdier af τ , hvor den mindste og den største værdi er hhv. $\tau = 2, 5$ ms (rød kurve) og $\tau = 10$ ms (blå kurve). Sandsynligheden for at observere negative fluktuationer for $\Delta\theta$ aftager med voksende τ . Højre: Kraftmomentet N kan findes som hældningen af den rette linje. For dette forsøg findes $N = 38$ pN·nm for $\tau = 10$ ms. [4].

Lad os nu se, hvordan vi kan undgå problemet med bestemmelse af Γ ved at bruge en fluktuationssætning. Arbejdet udført af motoren i tidsrummet τ er givet ved

$$W_\tau = \int_t^{t+\tau} N\dot{\theta}(t)dt = N(\theta(t+\tau) - \theta(t)) = N\Delta\theta_\tau, \quad (6)$$

idet N er konstant. Fluktuationssætningen for W_τ tager nu følgende form (jf. ligning (3) med Q erstattet med W)

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{P_\tau(\Delta\theta)}{P_\tau(-\Delta\theta)} = e^{N\Delta\theta/k_B T}. \quad (7)$$

Det følger, at vi kan finde N som hældningen af den rette linje, der fremkommer ved at plotte $\ln(P_\tau(\Delta\theta)/P_\tau(-\Delta\theta))$ som funktion af $\Delta\theta/k_B T$! Dette er netop blevet gjort af den japanske gruppe, og resultater fra en af deres målinger kan ses i figur 4. Kraftmomentet blev bestemt til omkring 40 pN·nm, men varierer dog lidt for de forskellige typer prober pga. systematiske usikkerheder. Ikke desto mindre er usikkerheden på resultatet for den enkelte type probe væsentligt reduceret i forhold til usikkerheden på resultatet opnået ved brug af ligning (5). Fluktuationssætningen (7) har altså muliggjort en præcis bestemmelse af kraftmomentet ved gentagne gange "blot" at observere ændringen i motorens position i løbet af et givet tidsrum.

Dette var blot et eksempel på, hvordan stokastisk termodynamik kan bruges til at studere egenskaber af molekylære motorer. Som nævnt tidligere er anvendelsen dog langt fra begrænset til molekylære motorer. Samtidig bliver der i dag forsket intenst i fundamentale aspekter af den nye teori om ikke-ligevægtssystemer, så den nærmeste fremtid vil uden tvivl bringe en masse interessante og revolutionerende resultater indenfor området af både teoretisk og eksperimentel karakter.

Litteratur

- [1] S. Ciliberto et al. (2010), *Journal of Statistical Mechanics*, december 2010, P12003
- [2] C. Bustamante et al. (2005), *Physics Today*, 2005, vol. **58**, s. 43
- [3] C. Bustamante et al. (2001), *Accounts of Chemical Research*, 2001, vol. **34**, s. 412
- [4] K. Hayashi et al. (2010), *Physical Review Letters*, 2010, vol. **104**, 218103



Natalia Golubeva er ph.d.-studerende, ved "Statistical Physics Group" ved Aarhus Universitet, indenfor emnet statistisk mekanik og ikke-ligevægtstermodynamik på biologiske systemer.

²En diskussion af modeller for motorernes bevægelse kan findes i [3].