



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko

MEHANIZMI REGULACIJE AKTIVNOSTI ENCIMA FOSFATAZE LAHKIH VERIG MIOZINA

Diplomski seminar na študijskem programu 1. stopnje Fizika

Karin Rajh

Mentor: doc. dr. Aleš Fajmut

Maribor, 2021

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Alešu Fajmutu za vso pomoč, usmerjanje, trud in potrpežljivost ob izdelavi diplomskega seminarja.

Iskrena hvala tudi vsem zaposlenim na Oddelku za fiziko, Fakultete za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru, za vsa nova znanja in kompetence, ki sem jih pridobila tekom študija.

Najlepša hvala pa tudi vsem mojim najbližjim, ki so me vsa leta vzpodbujali, verjeli vame in mi stali ob strani.

RAJH, K.: Mehanizmi regulacije aktivnosti encima fosfataze lahkih verig miozina
Diplomski seminar, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek
za fiziko, 2021.

POVZETEK

V diplomskem seminarju obravnavamo mehanizme regulacije aktivnosti encima fosfataze lahkih verig miozina. Zanima nas, kateri encimi in inhibitorji vplivajo na razvoj sile v gladki mišični celici. Osredotočimo se na drugo, počasnejšo fazo razvoja sile, kjer sila dodatno naraste za priližno 20% do maksimalne vrednosti. Nadgradimo že obstoječi fizikalno matematični model z bolj natančno kinetiko vezave in fosforilacije ter defosforilacije proteina CPI-17 na katalitično podenoto PP1c. Nadgradimo tudi inhibitorne učinke dveh treoninskih ostankov, T853 in T696. Predpostavimo, da CPI-17, T853 in T696 inhibirajo PP1c, ki je katalitična podenota encima MLCP. V modelu upoštevamo tudi učinek encima ROCK ter drugih fosfataz. Eksperimentalne meritve velikosti sile in koncentracije fosforiliranega miozina, nefosforiliranega miozina ter encimov MLCK in MLCP v odvisnosti od časa primerjamo s teoretičnimi napovedmi modela. Ugotovimo, da model deluje pravilno, če prilagodimo konstanti polovične zasičenosti v Hillovi funkciji (K_{6f} in K_{8f}), ki smo ju dobili tako, da smo Hillovo funkcijo prilagodili meritvam, ki so jih izvedli Muranyi in sodelavci [A. Murányi, D. Derkach, F. Erdodi, A. Kiss, M. Ito in D. J. Hartshorne, *Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on myosin phosphatase target subunit: Inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells*, FEBS Lett. A **579**, 6611 (2005)]. V modelu smo upoštevali 1000-krat večjo vrednost, kot izhaja iz eksperimentov.

Ključne besede: fosfataza lahkih verig miozina, gladka mišična celica, sila, model, CPI-17, razvoj sile, ROCK, T696, T853

ABSTRACT

In this seminar, we study the regulation mechanism of the enzyme myosin light chain phosphatase (MLCP) activity. We are interested in which enzymes and inhibitors influence the development of the force in a smooth muscle cell. The focus is on the second, slower phase of the force development, where the force increases by an additional 20% to its maximum value. In the seminar, we upgrade an already existing physical-mathematical model with a more precise kinetics of bonding, phosphorylation and dephosphorylation of the CPI-17 protein to the catalytic subunit PP1c. We also upgrade the inhibitory effect of two threonine residues, T853 and T696. We assume, that CPI-17, T696 and T853 inhibit PP1c, the catalytic subunit of MLCP. In the model, the effect of ROCK and other phosphatases is also considered. Experimental measurements of the force and concentration of phosphorylated myosin, unphosphorylated myosin, and enzymes MLCK and MLCP as a function of time are compared with the theoretical predictions of the model. The model works properly if we adjust the half-saturation constants in the Hill function (K_{6f} in K_{8f}), which were obtained by fitting the Hill function to the measurements performed by Muranyi et al. [A. Murányi, D. Derkach, F. Erdodi,

A. Kiss, M. Ito in D. J. Hartshorne, *Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on myosin phosphatase target subunit: Inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells*, FEBS Lett. A **579**, 6611 (2005)]. In the model, we considered a value 1000 times higher than the one derived from the experiments.

Key words: myosin light chain phosphatase, smooth muscle cell, force, model, CPI-17, force development, ROCK, T696, T853

KAZALO

1	<i>Uvod</i>	1
2	<i>Gladke mišice in proces njihovega krčenja</i>	2
2.1	Encim MLCP.....	5
2.2	Encim ROCK	6
2.3	Protein CPI-17	7
3	<i>Model krčenja gladkih mišic</i>	8
4	<i>Rezultati in razprava</i>	18
5	<i>Zaključek</i>	23

1 Uvod

V človeškem telesu se v grobem nahajajo tri vrste mišic: srčna mišica ter skeletne in gladke mišice. V diplomskem seminarju se bomo ukvarjali s slednjimi. Gladke mišice nam omogočajo dihanje, pretok krvi, prebavljanje itd. zaradi neprestanega krčenja (kontrakcije) in raztezanja (relaksacije). Ker nad gladkimi mišicami ljudje nimamo nadzora, se proces relaksacije in kontrakcije dogaja zaradi vpliva zunanjih dejavnikov, kot so hormoni, nevrotransmiterji, zdravila in drugi. Mišico sestavljajo mišična vlakna, v grobem so to debela miozinska in tanka aktinska vlakna. Ker ta vlakna drsijo druga ob drugem, se mišica skrči [1]. Osnovni proces, ki mišici omogoča skrčitev, je fosforilacija lahkih verig miozina na prečnih mostičkih miozinskih vlaknen. To pomeni, da se v procesu fosforiliranja lahkih verig miozina na vrat prečnega mostička veže fosfatna skupina (PO_4^{3-}), kar prečnemu mostičku omogoči, da se pripne na aktinsko vlakno [2].

Pomembno vlogo pri kontrakciji in relaksaciji gladkih mišic, oziroma pri razvoju sile v njih imata dva encima: encim kinaza lahkih verig miozina (MLCK – angl. myosin light chain kinase) in encim fosfataza lahkih verig miozina (MLCP – angl. myosin light chain phosphatase). Matematične analize nakazujejo, da so kinaze pomembne pri modulaciji amplitude signala, medtem ko fosfataze regulirajo trajanje odziva na signal [3]. V tem diplomskem seminarju se bomo osredotočili na delovanje in regulacijo encima MLCP. MLCP je sestavljen iz treh podenot: katalitične, ki jo označimo s PP1c, regulatorne, ki je daljša, in jo označimo z MYPT1, ter nekatalitične, ki jo označimo z M-20. Encim MLCP je holoencim, kar pomeni, da vsaka enota zase ne deluje. Encim je funkcionalen šele, ko so skupaj sestavljene vse podenote. Vsi encimi so proteini in so sestavljeni iz zaporedja aminokislin. Vsaka podenota encima ima svoje specifično aminokislinsko zaporedje. MYPT1 ima v aminokislinskem zaporedju štiri značilna mesta, ki se lahko fosforilirajo ter imajo zaporedna števila in oznako aminokislinske v sekvenci. Ta značilna mesta predstavljajo po dva treonina (T) in dva serina (S), ki so v aminokislinskem zaporedju podenote človeškega proteina označena kot T853, T696 in S852 ter S695 [4]. V diplomskem seminarju se med drugim osredotočimo na vpliv fosforilacije T853 in T696 na proces razvoja sile v gladki mišici. V splošnem, kadar je fosforiliran kateri od treoninov, to inhibira katalitično podenoto encima, kar pomeni, da se aktivnost MLCP zmanjša. Zmanjšana aktivnost MLCP ima pogosto negativno konotacijo, saj se zaradi upočasnjene delovanja MLCP miozini počasneje defosforilirajo, kar onemogoča relaksacijo mišic.

Na aktivnost MLCP močno vpliva tudi fosforilirana oblika proteina CPI-17, ki se veže na katalitično podenoto MLCP PP1c in jo inhibira. Z *in vivo* eksperimenti je bilo ugotovljeno, da v glavnem encima ROCK (angl. Rho-associated protein kinase, v literaturi pogosto označenem tudi kot RhoK ali ROK) in PKC (protein kinaza C) fosforilirata CPI-17. Tudi ta proces fosforilacije CPI-17 privede do okrnjene relaksacije gladke mišice, saj zmanjšuje aktivnost MLCP [5].

Časovni razvoj sile v gladki mišici dihalnih poti lahko v primeru dovolj dolge stimulacije razdelimo na dve fazi. V prvi fazi, ki se zgodi v velikostnem redu minute, sila v mišici naraste do približno 80% končne maksimalne vrednosti. Druga faza je počasnejša, saj v velikostnem redu nekaj 10 minut sila v mišici naraste še za dodatnih 20% do končne maksimalne vrednosti. Natančen mehanizem druge, počasnejše faze še ni popolnoma pojasnjen, predvideva pa se, da so zanj ključni predvsem procesi, ki vključujejo mehanizme regulacije MLCP [3].

Cilj diplomskega seminarja je modelirati procese, ki vplivajo na razvoj sile v počasnejši fazi, z drugimi metodami in pristopi, kot je to že bilo predstavljeno v magistrskem delu [1], kjer je avtorica obravnavala model regulacije encima fosfataze lahkih verig miozina v razvoju sile v gladkih mišicah. V tem delu bomo podrobneje opisali kinetiko vezave ter fosforilacijo in defosforilacijo proteina CPI-17 na katalitično podenoto *PP1c* ter nadgradili opis procesov na regulatorni podenoti MYPT1, pri čemer se bomo sklicevali na najpomembnejše meritve.

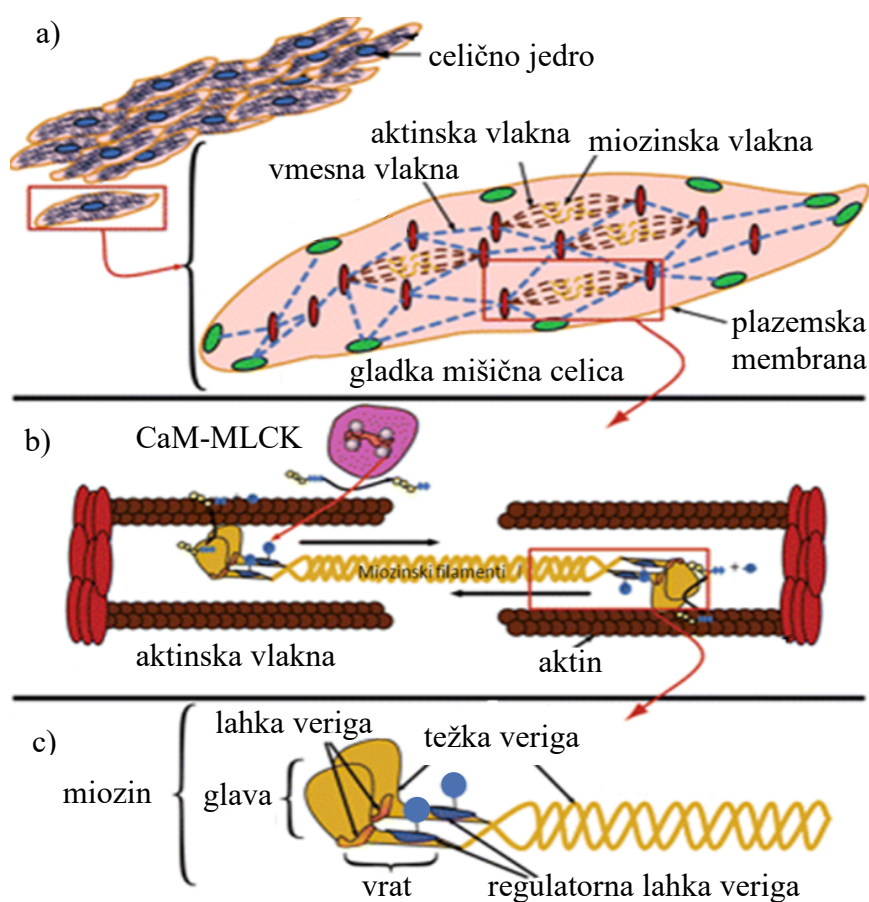
V diplomskem seminarju najprej predstavimo teoretično ozadje problema. Predstavimo osnovno sestavo gladkih mišic in proces njihovega krčenja (poglavje 2). Nadaljujemo z opisom nekaterih encimov in proteinov, ki so pomembni v procesu razvoja sile v gladki mišici: opišemo encim MLCP (poglavje 2.1), nato podamo še nekaj informacij o encimu ROCK (poglavje 2.2) ter proteinu CPI-17 (poglavje 2.3). Sledi podroben opis fizikalno-matematičnega modela procesa krčenja gladkih mišičnih celic (poglavje 3), ki vključuje regulacijo MLCP. Nato analiziramo dobljene rezultate (poglavje 4). V zaključku (poglavje 5) še enkrat povzamemo bistvene ugotovitve ter predlagamo možnosti za nadaljnje raziskovanje.

2 Gladke mišice in proces njihovega krčenja

Glede na kontraktilne lastnosti lahko gladke mišice razdelimo na dva tipa: tonične in fazične. Razlikujeta se v času vzdrževanja kontrakcije, kljub temu pa imata oba enake signalne in regulatorne poti [3]. Gladke mišice sestavljajo gladke mišične celice (GMC). Organele v GMC obdaja celična membrana, ki celico ščiti pred zunanjimi vplivi. Poleg tega se v njej nahajajo tudi proteini in receptorji. Naloga proteinov je prepuščanje hranilnih snovi in signalov za celico, kot so ioni, glukoza, fruktoza itd. Receptorji so biološke molekule, katerih namen je vezava točno določenih snovi, ki kasneje v celici sprožijo točno določene signalne poti in imajo fiziološke učinke. Organel, ki ima ključno vlogo pri shranjevanju Ca^{2+} in posledično pri njegovi signalizacijski verigi je sarkoplazemski retikulum. Zgoščine elipsoidne oblike, ki so povezane v mrežo, so del celičnega skeleta. Sosednji zgoščini celičnega skeleta imata pripeti aktinska vlakna, kot prikazuje slika 1a, med temi vlakni pa so pripeta tudi miozinska vlakna [6].

Skrčitev gladkih mišic je posledica razvoja sile, do katerega pride zaradi interakcije med vlakni miozina (M) in aktina (A) [3]. Aktinsko vlakno tvorijo med seboj povezane globularne proteinske molekule (slika 1b). Sestavljeno je iz dveh osnovnih delov: proteina aktina spiralne oblike in tropomiozina, ki se ovije okrog aktinskega vlakna. Spiralno verigo sestavljajo

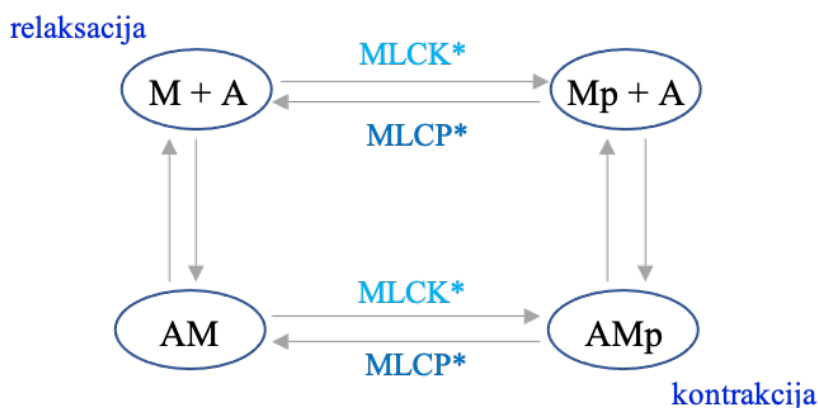
monomeri G-aktina, na katere se lahko vežejo miozinske glave, saj ima vsak od njih natanko eno prosto vezavno mesto [6]. Vlakna aktina so povezana tako, da tvorijo heksagonalno matriko, v kateri se miozinska vlakna vežejo na razpoložljiva mesta na vlaknu aktina. Vlakna miozina najdemo v vseh vrstah mišic, njihov osnovni gradnik je miozin [3]. Miozin je sestavljen iz šestih podenot: dve podenoti iz težkih verig miozina tvorita miozinski rep, ki se nadaljuje v vrat, kjer sta prisotna dva para lahkih verig miozina, od katerih je ena regulatorna in vsebuje mesto fosforilacije. Na koncu vrata sta miozinski glavi prečnega mostička, ki imata vezavno mesto za aktin in sta sestavljeni iz težkega miozina (slika 1C) [3, 7]. Za razvoj sile je potrebna vezava glav prečnega mostička na vezavna mesta na aktinu in njihova konformacijska sprememba ob vezavi in razgradnji ATP na glavi miozina. Da pa se miozinska glava sploh lahko veže na aktin, je potrebna fosforilacija regulatornih lahkih verig (MLC – angl. myosin light chain) [1].



Slika 1. Shema struktur, potrebnih za proces krčenja gladke mišične celice. a) Prikaz prostorske ureditve miozinskih in aktinskih vlaken v GMC. b) Razporeditev aktinskih vlaken in miozinskega filameta. c) Zgradba miozina. Povzeto po [1, 6].

Na sliki 2 je prikazana štiristanjska shema interakcije med miozinom (M) in aktinom (A). Encim MLCK, ki je aktiven le, če je v kompleksu s proteinom kalmodulinom (CaM), na katerega so vezani štirje ioni Ca^{2+} (slika 1B), fosforilira prej nefosforiliran miozin (M), ki ni

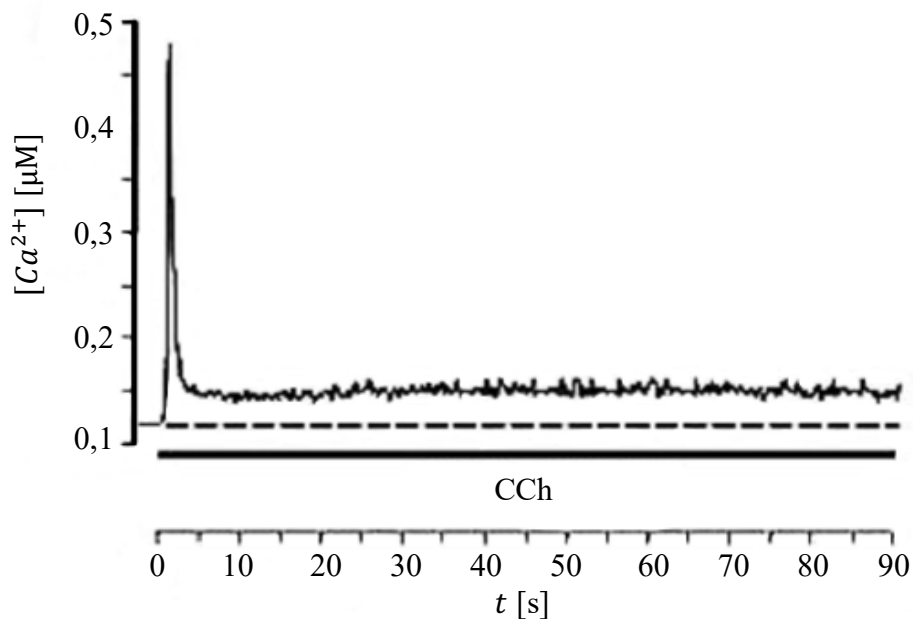
pripen na aktin. Z vezavo fosforiliranega miozina (Mp) na A nastane kompleks AMp, ki aktivno ustvarja silo. Aktivna oblika MLCP lahko defosforilira AMp in Mp. V prvem procesu nastane kompleks AM, kjer je nefosforiliran miozin pripen na aktin. Tako stanje pasivno vzdržuje silo in se imenuje zaskočeni prečni mostiček (angl. latch bridge). MLCK lahko fosforilira tako prost miozin (M) kot tudi tistega, ki je pripen z aktinom (AM) [8]. Proces vezave nefosforiliranega miozina na aktin je sicer možen, a je pogosto zanemarljiv, saj je verjetnost za to približno tisočkrat manjša kot v primeru fosforiliranega miozina.



Slika 2. Štiristanjska shema interakcije med miozinom (M) in aktinom (A). Stanje $A+M$ predstavlja nefosforiliran in nevezan miozin na aktin, kar predstavlja stanje relaksacije gladke mišice. $Mp+A$ je stanje, ko fosforiliran miozin (Mp) še ni pripen na aktin. Stanje AMp predstavlja na aktin pripen fosforiliran miozin ter stanje AM predstavlja na aktin pripen nefosforiliran miozin. $MLCP^*$ je aktivna oblika encima $MLCP$, $MLCK^*$ pa aktivna oblika encima $MLCK^*$. Povzeto po [9, 10].

Gladke mišice se med drugim nahajajo v naših dihalnih poteh. Če gladko mišico dihalnih poti stimuliramo s kontraktilnim agonistom, to sproži razvoj sile in posledično vodi do zožanja dihalnih poti. Pri nekaterih obolenjih dihalnih poti, kot je na primer astma, lahko pri takšni stimulaciji pride do resnega zmanjšanja premera dihalne poti v zelo kratkem času in s tem do zmanjšane pretoka zraka ter respiratorne disfunkcije. Znanstveniki se že nekaj časa ukvarjajo s študijem vloge $MLCP$ pri zožanju dihalnih poti [3]. V preteklosti je bila večina raziskav usmerjena v vlogo regulacije encima $MLCK$, preko katerega je posredovan ključni signal za kontrakcijo v obliki povišanja koncentracije ionov Ca^{2+} v citoplazmi GMC.

Koncentracija kalcijevih ionov Ca^{2+} v citoplazmi ($[Ca^{2+}]$) naraste, ko gladko mišično celico stimuliramo s kontraktilnim agonistom [3]. Časovni potek $[Ca^{2+}]$ v GMC dihalnih poti ima pri človeku obliko dvofaznega signala (slika 3) [11]. Zanj je značilno, da se koncentracija hitro poveča do vrednosti $0,5 \mu M$, nakar pa se tudi hitro zmanjša in doseže ravnovesje pri približno $0,15 \mu M$. Tej vrednosti pravimo vrednost platoja. Po končani stimulaciji se raven $[Ca^{2+}]$ vrne nazaj na mirovno raven, ki znaša med $0,05 \mu M$ in $0,1 \mu M$ [1].



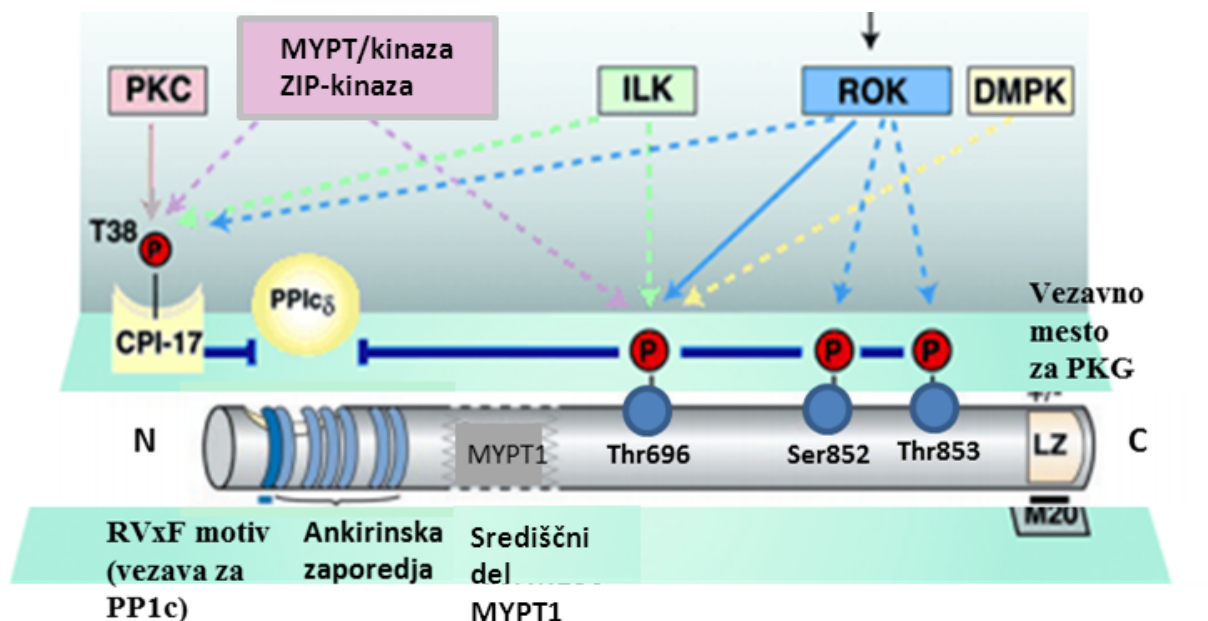
Slika 3. Tipični dvofazni signal koncentracije Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) v citoplazmi gladke mišične celice dihalnih poti človeka v odvisnosti od časa t po holinergični stimulaciji (CCh). Povzeto po [12].

Ob povišani koncentraciji kalcijevih ionov se zasedejo vezavna mesta za Ca^{2+} na proteinu CaM, kar omogoči nastanek kompleksa MLCK in $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, kar povzroči aktivacijo MLCK in posledično fosforilacijo lahkih verig miozina. Delež fosforiliranega miozina ni odvisen samo od aktivnosti MLCK, temveč tudi od aktivnosti MLCP. Povišana aktivnost MLCP desentitizira kontraktilni mehanizem za Ca^{2+} , kar pomeni, da se ob enakem signalu Ca^{2+} razvije nižja sila. Velja tudi obratno. Če je aktivnost MLCP manjša, to vodi v sentitizacijo kontraktilnega aparata [3]. V nadaljevanju si bomo podrobneje pogledali encim MLCP.

2.1 Encim MLCP

Encim MLCP je sestavljen iz treh podenot: regulatorne podenote MYPT1 (angl. myosin phosphatase target subunit 1), katalitične podenote PP1c in podenote M-20, katere funkcija še ni povsem znana (slika 4). Encim MLCP defosforilira lahke verige miozina (MLC). V celici proces defosforilacije MLC prevladuje, če je koncentracija Ca^{2+} nizka. Posledično je aktivnost MLCK znižana, kar pomeni, da defosforilacija poteka hitreje kot fosforilacija, kar privede do relaksacije gladkih mišičnih celic (GMC) [13]. Mehanizmi regulacije aktivnosti MLCP v gladkih mišičnih celicah so povezani s strukturo in interakcijo podenot PP1c in MYPY1. Na aktivnost MLCP lahko vpliva fosforilacija MYPT1. MYPT1 vsebuje več ustreznih mest za fosforilacijo, ki bodisi negativno, bodisi pozitivno regulirajo aktivnost MLCP. Najpomembnejša mesta fosforilacije na MYPT1 so mesta, ki jih v strukturi zasedajo serini (S) in treonini (T) (slika 4). V strukturi MYPT1 se najpogosteje preučujejo in opazujejo naslednja mesta v aminokislinskem zaporedju: S696 in S852 ter T853 in T696 [3]. Omenjena štiri mesta fosforilirajo različne kinaze. S696 in S852 fosforilira PKG (angl. protein kinaza gen), T853 in

T696 pa ILK, ROCK in ZIPK. Stanje fosforilacije omenjenih mest posredno vpliva na aktivnost podenote PP1c (slika 4) [14].



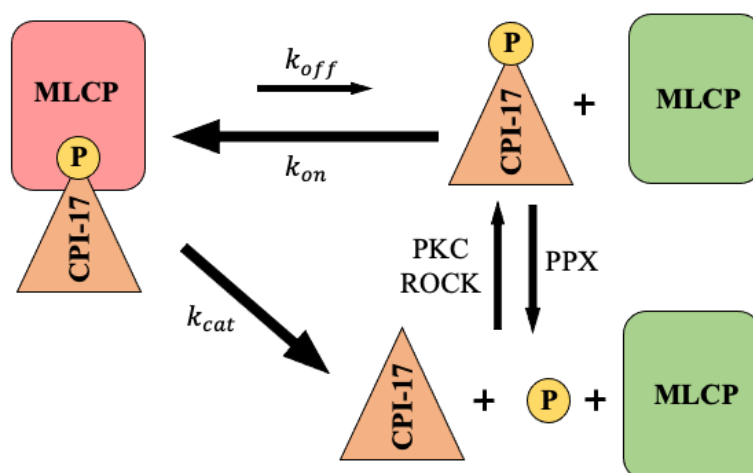
Slika 4. Shema strukturne zgradbe MLCP. Regulatorna podenota MYPT1, katalitična podenota PP1c, podenota M20. Encimi PKC, ZIP-kinaza, ILK, ROCK, DMPK fosforilirajo ali protein CPI-17 ali treonina z zaporednima številčkama 696 (T696, v literaturi označen tudi s Thr696) in 853 (T853, v literaturi označen tudi s Thr853), ali serin z zaporedno številko 852 (Ser852). Prekinjene črte predstavljajo mesta fosforilacije, ki so potrjena *in vitro*. Neprekinjene črte predstavljajo mesta fosforilacije, ki so bila potrjena *in vitro* in *in vivo* [1, 13, 14].

Fosforiliran protein CPI-17 se veže na MLCP in ga s tem inhibira (slika 4). Izkaže se, da je MLCP sam po sebi zadosten encim za defosforilacijo fosforiliranega in vezanega proteina CPI-17 na PP1c, s čimer pride do njegove odcepitve. Proces je sorazmerno počasen, kar je ključno za dolgotrajnejšo inhibirano stanje MLCP in posledično vzdrževanje kontrakcije (slika 5). Protein CPI-17 fosforilirajo mnoge kinaze. Najpogostejši sta ROCK in protein kinaza C (PKC) (slika 5). Učinek PKC naj bi bil zgolj enostranski, to je fosforilacija CPI-17, medtem ko je vloga ROCK še nepojasnjena. *In vitro* so potrdili fosforilacijo CPI-17, po drugi strani pa naj bi ROCK, ki ga bomo v nadaljevanju podrobno opisali, igral ključno vlogo tudi pri fosforilaciji T696 in T853 [1, 5].

2.2 Encim ROCK

Znanstveniki že dolgo preučujejo vpliv encima ROCK na kontrakcijo gladkih mišičnih celic dihalnih poti. ROCK lahko aktivira ali inhibira mnoge proteine, ki vplivajo tako na MYPT1 kot na aktivnost PP1c. Preko obeh mehanizmov se regulira aktivnost MLCP. ROCK je tako vpleten v fosforilacijo proteina CPI-17, ki je močno prisoten v gladkih mišičnih celicah dihalnih poti. V preteklosti se je izkazalo, da lahko ROCK fosforilira tudi MYPT1 na obeh

mestih, ki vplivata inhibitorno na delovanje MLCP. Ti mesti sta T696 in T853. ROCK naj bi bila tako edina znana kinaza, ki fosforilira T853 [3].



Slika 5. Modelni prikaz interakcije med CPI-17 in MLCP oziroma njeno katalitično podenoto PP1c. Proces so avtorji poimenovali »unfair competition«. Fosforiliran protein CPI-17 (pCPI-17) se odcepi z MLCP zaradi defosforilacije. Prost CPI-17 in nefosforiliran CPI-17 sta v ravnovesju, ki ga določajo relativne vrednosti vpletenih kinaz (PKC) in fosfatov (MLCP in PPX; PPX je v literaturi označena tudi s kratico PPU). Katalitična hitrostna konstanta je k_{cat} , k_{on} in k_{off} pa sta hitrostni konstanti vezave in disociacije CPI-17 z MLCP. Povzeto po [5].

2.3 Protein CPI-17

CPI-17 je fosfoprotein, ki pomembno vpliva na razvoj sile v mišici. Inhibira fosfataze, ki defosforilirajo serine in treonine. Ena takih fosfatov je tudi MLCP, kjer se CPI-17 veže na njeno katalitično podenoto PP1c in jo inhibira. Fosforilirana oblika CPI-17 naj bi povzročila konformacijsko spremembo PP1c, kar vodi do prehoda stanja MLCP iz aktivnega v neaktivno. Fosforilirana oblika CPI-17 v interakciji z MLCP lahko ima do tisočkrat večji inhibični učinek kot nefosforilirana oblika CPI-17. CPI-17 fosforilirata aktivni obliki encimov ROCK in PKC. V procesu inhibicije MLCP se fosforilirana oblika CPI-17 veže na katalitično podenoto PP1c, kar prepreči vezavo substrata, to je fosfatna skupina na S18 na lahki verigi miozina (MLC), hkrati pa tudi fosforiliranih treoninskih ostankov na MYPT1, kot sta T853 in T696, ki delujeta avtoinhibitorno, saj zmanjšujeta primarno vlogo MLCP. Primarna vloga MLCP je defosforilacija S18 na MLC [15]. Sedaj, ko smo natančneje spoznali proces krčenja gladkih mišic ter razumemo vpliv in delovanje encimov MLCP in ROCK ter proteina CPI-17 na kontrakcijo gladke mišice, lahko izgradimo model, ki skozi poglavje 2 opisane procese opiše matematično.

3 Model krčenja gladkih mišic

V diplomskem seminarju nadgradimo že obstoječi model [1] za razvoj sile v gladkih mišičnih celicah, tako da podrobneje opišemo kinetiko vezave in fosforilacije ter defosforilacije CPI-17 na katalitično podenoto MLCP PP1c. Nadgradimo tudi mehanizem avtoinhibitornih učinkov MLCP preko fosforilacij T696 in T853 na regulatorni podenoti MYPT1.

V modelu upoštevamo dvofazni časovno odvisni Ca^{2+} signal, ki je značilen za tipično holinergično stimulacijo gladke mišične celice dihalnih poti človeka [11]:

$$[Ca^{2+}](t) = \begin{cases} [Ca^{2+}]_r & ; t < t_1 \\ [Ca^{2+}]_r + ([Ca^{2+}]_{max} - [Ca^{2+}]_r) \frac{t - t_1}{t_1 - t_2} & ; t_1 \leq t \leq t_2 \\ [Ca^{2+}]_p + ([Ca^{2+}]_{max} - [Ca^{2+}]_p) e^{-k(t-t_2)} & ; t > t_2, \end{cases}$$

kjer so $[Ca^{2+}]_r$, $[Ca^{2+}]_p$, $[Ca^{2+}]_{max}$ koncentracije mirovnega stanja (r), platoja (p) in vrha (max), konstanta k pa določa hitrost padanja od vrha proti platoju. Čas ob začetku naraščanja koncentracije Ca^{2+} predstavlja t_1 , t_2 pa čas ob dosegu maksimuma (vrha). Začetni signal za mehanizem aktivacije MLCK predstavlja ravno dvofazni signal Ca^{2+} . Vrednosti, uporabljene v modelu, so zbrane v tabeli 1.

Parameter	Oznaka	Vrednost
mirovnna koncentracija Ca^{2+}	$[Ca^{2+}]_r$	0,1 μ M
koncentracija Ca^{2+} v fazi platoja	$[Ca^{2+}]_p$	0,15 μ M
konstanta hitrosti padanja koncentracije Ca^{2+}	k	0,5 s^{-1}
čas ob začetku naraščanja koncentracije Ca^{2+}	t_1	400 s
čas ob dosegu vrha v signalu Ca^{2+}	t_2	402 s

Tabela 1. Parametri dvofaznega signala Ca^{2+} ; ime parametra, oznaka in vrednost uporabljena pri modeliranju. Vrednosti so povzete po [12].

S povečanjem koncentracije Ca^{2+} ionov v citoplazmi celice se paroma vežeta po 2 Ca^{2+} iona na dva terminala (N in C) na CaM, ki je lahko prost ali že vezan z MLCK. Z zapolnitvijo vseh 4 vezavnih mest za Ca^{2+} na CaM in z vezanim Ca_4CaM je MLCK v aktivni obliki za fosforilacijo MLC. Ker ima CaM po tri različna vezavna mesta; eno za MLCK (M), drugi dve pa za po dva iona Ca^{2+} (N in C), je možnih 8 različnih stanj CaM, ki so na sliki 6 razporejena v oglišča kocke. Pri tem nezasedeno vezavno mesto označimo z $_$ [11].

Zapišemo dve ohranitveni enačbi:

$$[CaM_{_ _}] = [CaM_{tot}] - [CaM_{NC_}] - [CaM_{_ CM}] - [CaM_{_ C}] - [CaM_{_ M}] - [CaM_{N_}] - [CaM_{N_ M}] - [CaM_{NMC}] \quad (2)$$

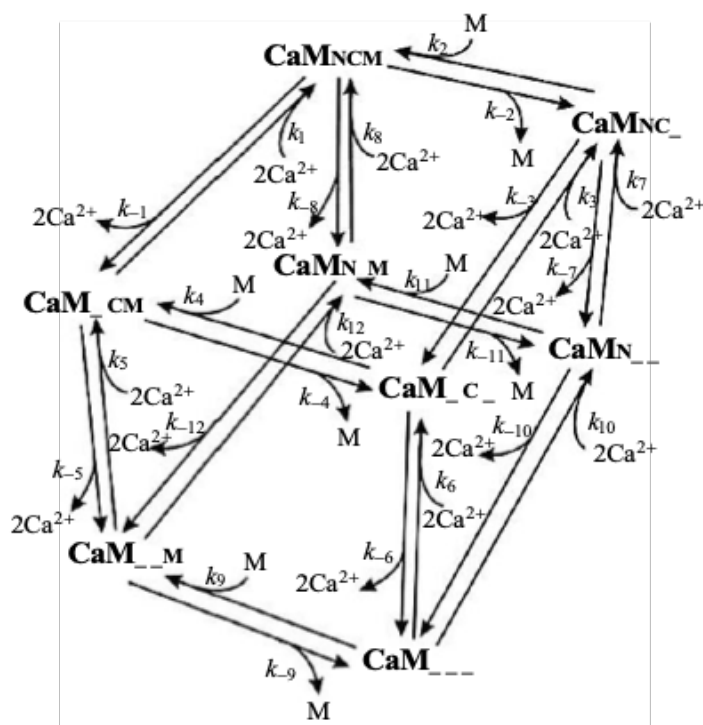
in

$$[MLCK] = [MLCK]_{tot} - ([CaM_{NMC}] + [CaM_{_CM}] + [CaM_{_M}] + [CaM_{N_M}]). \quad (3)$$

Prva ohranitvena enačba (enačba (2)) opisuje ohranitev skupne koncentracije CaM ($[CaM_{tot}]$), druga (enačba (3)) pa skupno koncentracijo encima MLCK ($[MLCK_{tot}]$) znotraj celice. Iz vsake ohranitvene enačbe je izražena po ena spremenljivka, za ostalih 7 neodvisnih spremenljivk zapišemo dinamični sistem s sedmimi diferencialnimi enačbami prvega reda. Tukaj predstavljamo zgolj eno:

$$\frac{d [CaM_{NCM}]}{dt} = k_1 [Ca^{2+}]^2 [CaM_{_CM}] - k_{-1} [CaM_{NCM}] + k_2 [MLCK] [CaM_{NC_}] - k_{-2} + k_8 [Ca^{2+}]^2 [CaM_{N_M}] + k_{-8} [CaM_{NCM}]. \quad (4)$$

Ostale enačbe so zapisane po enakem vzorcu. Izberemo si oglišče kocke ter sledimo puščicam, ki bodisi kažejo stran od oglišča ali pa v oglišče. Tiste parametre, ki pritekajo v oglišče kocke predznačimo pozitivno, tiste, ki odtekajo, pa negativno. Vrednosti vseh parametrov, uporabljenih v simulaciji interakcij med Ca^{2+} , CaM in MLCK so zbrane v tabeli 2.



Slika 6. Kinetična shema interakcij med Ca^{2+} , CaM in MLCK v obliki kocke. Hitrostne konstante so $k_{\pm i}$, kjer je $i = 1 \dots 12$. N in C predstavljata dve različni vezavni mesti na CaM za kalcijeve ione (domena N in C terminala), M pa predstavlja vezavno mesto za MLCK (domena M terminala). Podpisana črtica () predstavlja nezasedena vezavna mesta na CaM. CaM_{NCM} predstavlja aktivno obliko MLCK. Povzeto po [16].

Interakcijski parameter	Vrednost [arbitrarna enota]	Interakcijski parameter	Vrednost [arbitrarna enota]
k_1	30	k_{-1}	4
k_2	1000	k_{-2}	1
k_3	100	k_{-3}	800
k_4	1000	k_{-4}	60
k_5	20	k_{-5}	0,2
k_6	2,8	k_{-6}	6
k_7	2,8	k_{-7}	6
k_8	5	k_{-8}	0,2
k_9	910	k_{-9}	11700
k_{10}	100	k_{-10}	800
k_{11}	840	k_{-11}	45
k_{12}	120	k_{-12}	4
$[CaM]_{tot}$	$2 \mu M$	$[MLCK]_{tot}$	$2 \mu M$

Tabela 2. Parametri interakcij med Ca^{2+} , CaM in MLCK in njihove vrednosti, ki smo jih uporabili pri modeliranju. Vse vrednosti so povzete po [11].

Interakcije med aktinom (A) in miozinom (M) modeliramo s kinetično shemo, ki je nastala po vzoru modela Haia in Murphyja leta 1988 [17]. Model vsebuje 4 osnovna stanja, v katerih se nahajata miozin (M) in aktin (A). Oznaka M predstavlja prost, nefosforiliran miozin, oznaka Mp pa prost, fosforiliran miozin. Kompleksa AM in AMp zaporedoma predstavljata na aktin pripet nefosforiliran miozin in na aktin pripet fosforiliran miozin (slika 2).

Za štiristanjsko kinetično shemo lahko zapišemo tri diferencialne enačbe, ki opisujejo hitrost nastajanja kompleksov AM, AMp in Mp:

$$\frac{d[Mp]}{dt} = k_{m1}[M] - k_{m2}[Mp] - k_{m3}[Mp] + k_{m4}[AMp], \quad (5)$$

$$\frac{d[AMp]}{dt} = k_{m3}[Mp] - k_{m4}[AMp] - k_{m5}[AMp] + k_{m6}[AM] \quad (6)$$

in

$$\frac{d[AM]}{dt} = k_{m5}[AMp] - k_{m6}[AM] - k_{m7}[AM] + k_{m8}[M], \quad (7)$$

kjer $[Mp]$, $[M]$, $[AMp]$, $[AM]$ predstavljajo koncentracije že zgoraj omenjenih stanj, k_{m1} do k_{m8} pa so kinetične hitrostne konstante sistema. Uporabljeni parametri so zbrani v tabeli 3.

Kinetična hitrostna konstanta	Vrednost [s^{-1}]
k_{m3}	0,3
k_{m4}	0,1
k_{m7}	0,02
k_{m8}	0,001

Tabela 3. Kinetične hitrostne konstante in njihove vrednosti [2] v štiristanjski shemi interakcij med miozinom in aktinom.

V procesu defosforilacije na aktin pripetega in prostega fosforiliranega miozina pod vplivom aktivne oblike katalitične podenote encima MLCP ($[PP1c]$) lahko hitrostni konstanti k_{m2} in k_{m5} izrazimo z nadgrajeno Michaelis – Mentenino kinetiko [9]:

$$k_{m2} = k_{m5} = \frac{k_{catD} [PP1c]_A}{K_{mD} + [Mp] + [AMp]}, \quad (8)$$

kjer k_{catD} predstavlja katalitično hitrost defosforilacije in K_{mD} Michaelis – Mentenino konstanto encimske reakcije. Enačimo lahko tudi parametra k_{m1} in k_{m6} , ki sta premosorazmerna relativni koncentraciji aktivne oblike MLCK (f_{MLCK_A}) [2]:

$$k_{m1} = k_{m6} = k_0 f_{MLCK_A}, \quad (9)$$

kjer je k_0 kinetična hitrostna konstanta. Relativno koncentracijo aktivne oblike MLCK zapišemo kot [2]:

$$f_{MLCK_A} = \frac{[CaM_{NCM}]_A}{[MLCK]_{tot}}. \quad (10)$$

V modelu zapišemo tudi ohranitveno enačbo za skupno koncentracijo miozina ($[M]_{tot}$), v njej upoštevamo še kompleksa, kjer sta fosforilirani stanji miozina (Mp in AMp) v interakciji z aktivno obliko katalitične podenote encima MLCP ($PP1c_A$) ($[PP1c_A \cdot Mp]$, $[PP1c_A \cdot AMp]$):

$$[M]_{tot} = [M] + [Mp] + [AMp] + [AM] + [PP1c_A \cdot Mp] + [PP1c_A \cdot AMp]. \quad (11)$$

Spremenljivko $[M]$ izrazimo iz ohranitvene enačbe (11) in dobimo:

$$[M] = [M]_{tot} - ([Mp] + [AMp] + [AM] + [PP1c_A \cdot Mp] + [PP1c_A \cdot AMp]). \quad (12)$$

Ob upoštevanju Michaelis – Mentenine kinetike in pogoja ravnovesja dveh vzporednih encimskih reakcij se koncentraciji kompleksov $[PP1c_A \cdot Mp]$ in $[PP1c_A \cdot AMp]$ izražata kot:

$$[PP1c_A \cdot Mp] = \frac{[PP1c_A]_{tot} [Mp]}{K_{mD} + [AMp] + [Mp]}, \quad (13)$$

$$[PP1c_A \cdot AMp] = \frac{[PP1c_A]_{tot} [AMp]}{K_{mD} + [AMp] + [Mp]} \cdot \quad (14)$$

$[AMp]$ in $[Mp]$ v zgornjih izrazih (enačba (13) in (14)) nastopata kot substrata. Koncentracijo $[PP1c_A]$ lahko izrazimo z ohranitveno enačbo [5]:

$$[PP1c_A] = [PP1c]_{tot} - [PP1c_I], \quad (15)$$

kjer je $[PP1c_I]$ koncentracija inhibirane, neaktivne oblike katalitične podenote encima MLCP, na katero je vezan fosforiliran CPI-17, $[PP1c]_{tot}$ pa njena skupna koncentracija. Tako je $[PP1c_I]$ enaka koncentraciji vezane fosforilirane oblike proteina CPI-17 na PP1c ($[CPI-17_{Pvezan}]$):

$$[PP1c_I] = [CPI-17_{Pvezan}] \cdot \quad (16)$$

Silo F , ki se razvije v gladki mišični celici, definiramo kot razmerje med vsoto dejanskih koncentracij vseh možnih kompleksov miozina in aktina in med maksimalno možno koncentracijo vseh možnih kompleksov miozina in aktina pri največji možni koncentraciji Ca^{2+} v citoplazmi gladke mišične celice:

$$F = \frac{[AMp] + [AM] + [PP1c_A \cdot AMp]}{([AMp] + [AM] + [PP1c_A \cdot AMp])_{max}} \cdot \quad (17)$$

V enačbah (8) do (15) uporabljeni parametri so zbrani v tabeli 4.

Parameter	Oznaka	Vrednost
katalitična konstanta	k_{catD}	16 s^{-1} [12]
Michaelis-Mentenina konstanta	K_{mD}	$16 \text{ }\mu\text{M}$ [12]
skupna koncentracija katalitične podenote MLCP (PP1c)	$[PP1c]_{tot}$	$2,0 \text{ }\mu\text{M}$ [12]
skupna koncentracija miozina	$[M]_{tot}$	$30 \text{ }\mu\text{M}$ [9]
kinetična hitrostna konstanta	k_0	1 s^{-1} [2]

Tabela 4. Parametri v procesu defosforilacije miozina in njihove vrednosti.

S katalitično podenoto $PP1c$ se veže le fosforilirana oblika proteina CPI-17, časovno odvisnost njene koncentracije ($[CPI-17_P]$) pa določa delež aktivne oblike encima ROCK (f_{ROCK_A}). Encim ROCK se lahko nahaja v aktivni ($ROCK_A$) ali neaktivni ($ROCK_I$) obliki. Hitrost spreminjanja relativne koncentracije aktivne oblike encima ROCK (f_{ROCK_A}) opišemo z diferencialno enačbo [18]:

$$\frac{df_{ROCK_A}}{dt} = k_{+RK} - (k_{+RK} + k_{-RK})f_{ROCK_A}, \quad (18)$$

kjer sta k_{+RK} in k_{-RK} hitrostni konstanti, pri čemer je k_{+RK} odvisna od razlike trenutne

vrednosti koncentracije kalcija in mirovne vrednosti kalcija v celici ($[Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_r$) ter od sorazmernostnega faktorja p , kakor je bilo že predhodno modelirano [18] :

$$k_{+RK} = p ([Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_r) . \quad (19)$$

V tem delu smo nadgradili tisti del modela, ki v viru [1] opisuje fosforilacijo in defosforilacijo proteina CPI-17 ter njegovo interakcijo s PP1c. Dodatno upoštevamo še proces defosforilacije CPI-17, ki je posledica delovanja MLCP in njegovo sočasno disociacijo. Skupna koncentracija proteina CPI-17 ($[CPI-17_{tot}]$) je enaka vsoti skupne koncentracije fosforilirane oblike CPI-17 ($[CPI-17_{ptot}]$) in koncentraciji prostega, nefosforiliranega proteina CPI-17 ($[CPI-17]$):

$$[CPI-17_{tot}] = [CPI-17_{ptot}] + [CPI-17] . \quad (20)$$

Po drugi strani je koncentracija $[CPI-17_{ptot}]$ definirana kot vsota koncentracij na PP1c vezane fosforilirane oblike proteina CPI-17 ($[CPI-17_{pvezan}]$) in tiste, ki je nevezana ($[CPI-17_{pprost}]$):

$$[CPI-17_{ptot}] = [CPI-17_{pvezan}] + [CPI-17_{pprost}] . \quad (21)$$

Z združitvijo enačb (20) in (21) lahko izrazimo $[CPI-17_{pvezan}]$:

$$[CPI-17_{pvezan}] = [CPI-17_{tot}] - [CPI-17_{pprost}] - [CPI-17] , \quad (22)$$

pri čemer je $[CPI-17_{tot}]$ parameter. Hitrost spreminjanja koncentracije fosforilirane, proste oblike CPI-17 $[CPI-17_{pprost}]$ opišemo z diferencialno enačbo:

$$\begin{aligned} \frac{d[CPI-17_{pprost}]}{dt} = & \frac{k_{catP} [ROCK]_{tot} f_{ROCK_A} [CPI-17]}{K_{mP} + [CPI-17]} - \\ & - k_{1c} [CPI-17_{pprost}] PP1C_A - \\ & - \frac{k_{2c} [DF] [CPI-17_{pprost}]}{K_{mc} + [CPI-17_{pprost}]} , \end{aligned} \quad (23)$$

kjer prvi člen predstavlja hitrost nastajanja fosforilirane oblike CPI-17, ki je odvisna od aktivne oblike encima ROCK. Količina aktivne oblike ROCK je podana z enačbo (18). Drugi člen predstavlja hitrost vezave $CPI-17_{pprost}$ na $PP1C_A$. Tretji člen opisuje hitrost defosforilacije CPI-17 pod vplivom drugih fosfataz, ki jih v izrazu označimo z DF. Hitrostno konstanto katalitične aktivnosti aktivne oblike ROCK označimo s k_{catP} , Michaelis-Mentenini konstanti za posamezno encimsko reakcijo s K_{mP} in K_{mc} , hitrostni konstanti defosforilacije fosforilirane oblike CPI-17 pa s k_{1c} in k_{2c} . Iz izmerjene ravnovesne konstante K_I in hitrostne konstante defosforilacije CPI-17 (k_{3c}) izrazimo k_{1c} :

$$k_{1c} = \frac{k_{3c}}{K_I}. \quad (24)$$

Vrednost k_{3c} pridobimo iz modela, ki so ga objavili Filter in sodelavci [5], vrednost parametra K_I pa iz članka, ki so ga objavili Eto in sodelavci [18]. Vrednosti vseh parametrov so podane v tabeli 5.

Nastajanje proste in nefosforilirane oblike proteina CPI-17 opišemo s podobnimi procesi kot nastajanje fosforilirane proste oblike proteina CPI-17:

$$\frac{d[CPI-17]}{dt} = \frac{k_{2c} [DF] [CPI-17_{Pprost}]}{K_{mc} + [CPI-17_{Pprost}]} + k_{3c} [CPI-17_{Pvezan}] - \frac{k_{catP} [ROCK]_{tot} f_{ROCK_A} [CPI-17]}{K_{mP} + [CPI-17]}, \quad (25)$$

kjer prvi člen predstavlja hitrost defosforilacije prostega CPI-17 pod vplivom drugih fosfataz. Drugi člen predstavlja hitrost defosforilacije in disociacije CPI-17 s PP1c pod vplivom MLCP same. Hitrostna konstanta tega procesa je k_{3c} . Tretji člen, enako kot prvi v enačbi (23), opisuje hitrost tvorbe fosforilirane oblike CPI-17, s čimer se koncentracija nefosforilirane oblike zmanjšuje.

Parameter	Oznaka	Vrednost
skupna koncentracija <i>ROCK</i>	$[ROCK]_{tot}$	2 μM [1]
skupna koncentracija <i>CPI – 17</i>	$[CPI-17]_{tot}$	1 μM [1]
Michaelis-Mentenina konstanta v izrazu za katalitično aktivnost <i>ROCK</i> v procesu fosforilacije <i>CPI-17</i>	K_{mP}	2,5 μM [12]
hitrostna konstanta stopnje fosforilacije <i>CPI – 17</i>	k_{-RK}	0,1 s^{-1}
hitrostna konstanta katalitične aktivnosti $ROCK_A$	k_{catP}	2,5 s^{-1} [12]
hitrostna konstanta defosforilacije fosforilirane oblike <i>CPI-17</i>	k_{1c}	3,5 $\mu M s^{-1}$ [Izračunano, 5, 18]
hitrostna konstanta defosforilacije fosforilirane oblike <i>CPI-17</i> pod vplivom drugih fosfataz	k_{2c}	41 s^{-1} [5]
hitrostna konstanta defosforilacije <i>CPI-17</i> pod vplivom MLCP	k_{3c}	0,01 s^{-1} [5]
Michaelis-Mentenina konstanta v izrazu za katalitično aktivnost <i>DF</i> v procesu defosforilacije <i>CPI-17</i>	K_{mc}	15 μM [5]
koncentracija drugih fosfataz	$[DF]$	1,5 μM [5]
ravnovesna konstanta	K_I	0,00282 μM [18]

Tabela 5. Vrednosti parametrov, ki nastopajo v enačbah (18) do (25). Vrednost parametra k_{1c} smo izračunali (enačba (24)) iz vrednosti, ki so bile podane v referencah [5] in [18].

Inhibitorja katalitične aktivnosti MLCP predstavljata tudi fosforilirani mesti T853 in T696 na regulatorni podenoti MYPT1 na MLCP. Inhibicija nastopi, ker katalitična podenota PP1c ne defosforilira MLC, temveč ti dve fosforilirani mesti na MYPT1, saj naj bi bila vsa tri mesta fosforilacije fizično blizu PP1c, ko se encim MLCP ovije okrog vrata prečnega mostička. Ker fosforilacija MYPT1 zmanjšuje aktivnost PP1c in s tem lastno aktivnost encima MLCP kot celote, govorimo o avtoinhibiciji. Vhodni signal za fosforilacijo T853 in T696 je posredovan preko povišane aktivnosti encima ROCK. Časovno odvisnost fosforilacije na obeh mestih so z *in vitro* eksperimentom izmerili Muranyi in sodelavci [19], na proteinu izvzetem iz kokoši, ki se zgolj malo razlikuje od človeškega. Meritve za posamezen primer so bile pridobljene tako, da so mutirali protein MLCP na enem specifičnem mestu in opazovali stopnjo fosforilacije na drugem specifičnem mestu [19]. Izmerjena odvisnost fosforilacije od časa na obeh mestih je prikazana na sliki 7. Graf prikazuje, koliko molov fosfatne skupine je vezano na en mol MYPT1. Ker ima fosfatna skupina dve vezavni mesti, sta lahko na 1 mol MYPT1 vezana maksimalno 2 mola fosfatne skupine. Če gledamo vsako mutirano mesto posebej, opazimo, da vsako zase naraste do približno $0,75 \frac{\text{mol P}}{\text{mol MYPT1}}$. Točke v obliki trikotnika predstavljajo mutant $MYPT1^{T850A}$, kar ustreza stopnji fosforilacije T696 v človeški sekvenci, točke v obliki kroga pa mutant $MYPT1^{T695A}$, kar ustreza stopnji fosforilacije T853 v človeški sekvenci [19]. Z grafa lahko razberemo, da je v obeh primerih časovna odvisnost enaka, izmerjene vrednosti se prilegajo matematični funkciji oblike:

$$x(t) = x_0(1 - e^{-k_f t}), \quad (26)$$

kjer $x(t)$ predstavlja trenutno stopnjo fosforilacije na T853 oziroma T696, x_0 maksimalni delež fosforilacije, k_f pa hitrostno konstanto. Koncentracijo fosforiliranih mest izračunamo tako, da delež fosforiliranih mest pomnožimo s skupno koncentracijo MLCP, s čimer dobimo časovno odvisnost koncentracij $[T853](t)$ in $[T696](t)$:

$$[T853](t) = x(t) [MLCP]_{tot} \quad (27)$$

in

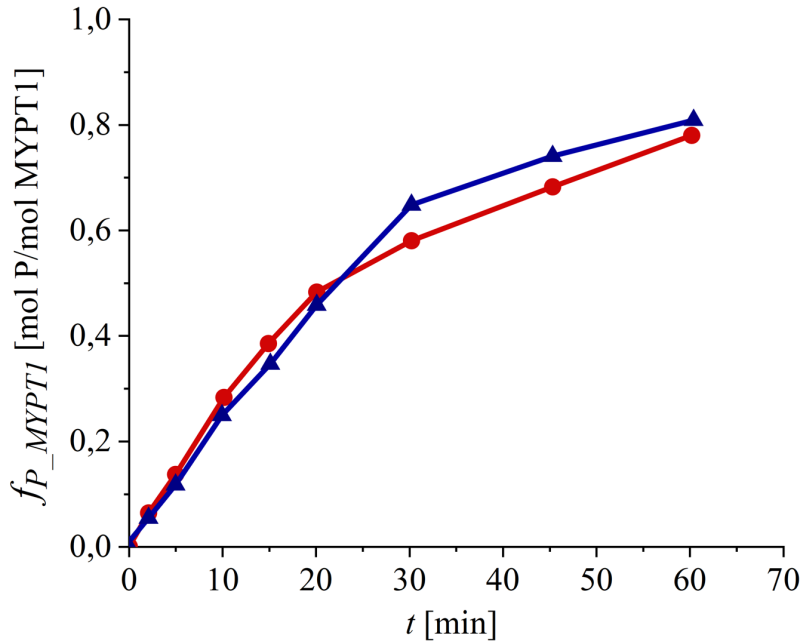
$$[T696](t) = x(t) [MLCP]_{tot}. \quad (28)$$

Vpliv fosforilacije T853 in T696 na aktivnost MLCP modeliramo tako, da nadgradimo enačbo (8). To storimo tako, da aktivnost MLCP (k_{m2} in k_{m5}) pomnožimo z utežnostnima funkcijama f_6 in f_8 , ki jih določimo s prilagajanjem Hillove funkcije meritvam, ki so jih izvedli Muranyi in sodelavci [19]. Izmerjenim vrednostim (slike številka 2 v viru [19]) prilagodimo Hillovo funkcijo oblike:

$$f_H = 1 - f \frac{x^n}{k^n + x^n}, \quad (29)$$

kjer je f_H vrednost spremenljivke med 0 in 1, f je razlika med maksimalno in minimalno vrednostjo Hillove funkcije, n je Hillov koeficient in k je Hillova konstanta. Digitalizirane meritve (slika številka 2 v viru [19]) s prilagojeno Hillovo funkcijo so prikazane na sliki 8.

Avtorji [19] so originalno merili stopnjo fosforilacije na mutiranem MLCP kokoši na mestu T695 (slika 8a) in T850 (slika 8b).



Slika 7. Delež fosforilacije MYPT1 ($f_{P_{MYPT1}}$), to je število molov fosfatne skupine na en mol MYPT1, v odvisnosti od časa (t); rdeči krogi predstavljajo izmerjeno stopnjo fosforilacije T853, modri trikotniki pa stopnjo fosforilacije T696. Vse točke meritev so bile pridobljene z digitalizacijo slike številka 1 v viru [19].

Za faktorja f_6 in f_8 lahko po zgledu enačbe (29) zapišemo izraza:

$$f_6 = 1 - f_{6D} \frac{[T696]^{n_6}}{K_{6f}^{n_6} + [T696]^{n_6}} \quad (30)$$

in

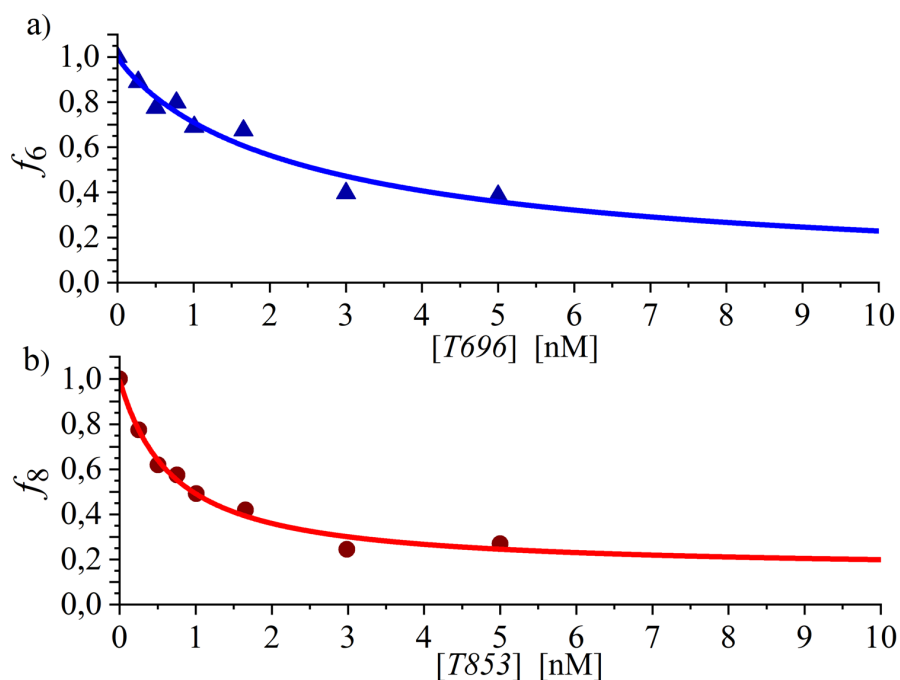
$$f_8 = 1 - f_{8D} \frac{[T853]^{n_8}}{K_{8f}^{n_8} + [T853]^{n_8}}, \quad (31)$$

kjer f_{6D} in f_{8D} predstavljata razliko med maksimalno in minimalno vrednostjo stopnje fosforilacije T696 in T853, n_6 in n_8 sta Hillova koeficienta, K_{6f} in K_{8f} pa sta konstanti polovične zasičenosti v Hillovi funkciji za opisan proces. Vrednosti parametrov f_{6D} , f_{8D} , n_6 , n_8 , K_{6f} in K_{8f} so pridobljene s prilagajanjem funkcije podane z enačbo (29) meritvam, ki so jih izvedli Muranyi in sodelavci [19] (slika 8) in so podane v tabeli 6. Nadgrajeno enačbo (8) zdaj zapišemo kot:

$$k_{m2} = k_{m5} = \frac{k_{catD}[PP1c]_{tot}}{K_{mD} + [MP] + [AMP]} f_6 f_8, \quad (32)$$

kjer za namen simulacije holinergične stimulacije, ob kateri se aktivira encim ROCK, v izrazih (30) in (31) za $[T696]$ in $[T853]$ vstavimo izraz za časovno odvisnost $[T696](t)$ in $[T696](t)$, ki sta podana z enačbama (27) in (28).

V tabeli 6 so podani parametri časovne odvisnosti stopnje fosforilacije treoninskih ostankov T696 in T853 na MYPT1 ter parametri prilagojene Hillove funkcije. V našem modelu smo uporabili nekoliko spremenjene vrednosti nekaterih parametrov. Da bi lahko ustrezno modelirali časovni razvoj sile v GMC dihalnih poti, smo morali uporabiti drugačne vrednosti nekaterih parametrov. Za K_{6f} in K_{8f} , smo uporabili vrednosti, ki so 1000-krat večje od eksperimentalno določenih [19]. V nasprotnem primeru, bi bil sistem izjemno močno odvisen od stopnje fosforilacije T696 in T853 in nikakor ne bi bilo moč simulirati časovnih odvisnosti kot so bile izmerjene [9]. Eksperimentalne vrednosti v tabeli 6 smo izračunali s prilagajanjem funkcij meritvam, vrednosti uporabljene v modelu pa smo v modelu tudi dejansko upoštevali.



Slika 8. Aktivnost MLCP (f_6 in f_8) v odvisnosti od koncentracije fosforiliranih mest a) T696 in b) T853 v vzorcu. Točke so pridobljene z digitalizacijo slike 2 v viru [19], njim prilagojena pa je Hillova funkcija.

Parameter	Oznaka	Eksperimentalna vrednost	Vrednost uporabljena v modelu
hitrostna konstanta eksponentne odvisnosti $[T853]_{max}$ in $[T696]_{max}$	k_f	$0,000473 \text{ s}^{-1}$	$0,000473 \text{ s}^{-1}$
maksimalna koncentracija fosforiliranega T696	$[T696]_{max}$	$0,815 \text{ }\mu\text{M}$	$0,815 \text{ }\mu\text{M}$
maksimalna koncentracija fosforiliranega T853	$[T853]_{max}$	$0,815 \text{ }\mu\text{M}$	$0,815 \text{ }\mu\text{M}$
razlika med maksimalno in minimalno vrednostjo aktivnosti T696	f_{6D}	1,0	1,0
konstanta polovične zasičenosti v Hillovi funkciji	K_{6f}	$2,7 \cdot 10^{-3}$	2,7
Hillov koeficient	n_6	0,9	0,9
razlika med maksimalno in minimalno vrednostjo aktivnosti T853	f_{8D}	0,87	0,87
konstanta polovične zasičenosti v Hillovi funkciji	K_{8f}	$0,7 \cdot 10^{-3}$	0,7
Hillov koeficient	n_8	1,0	1,0

Tabela 6. Parametri časovne odvisnosti stopnje fosforilacije treoninskih ostankov T696 in T853 na MYPT1 ter parametri prilagojene Hillove funkcije. Tabela vsebuje vrednosti parametrov pridobljene s prilagajanjem meritvam v viru [19] in vrednosti uporabljeno v modelu.

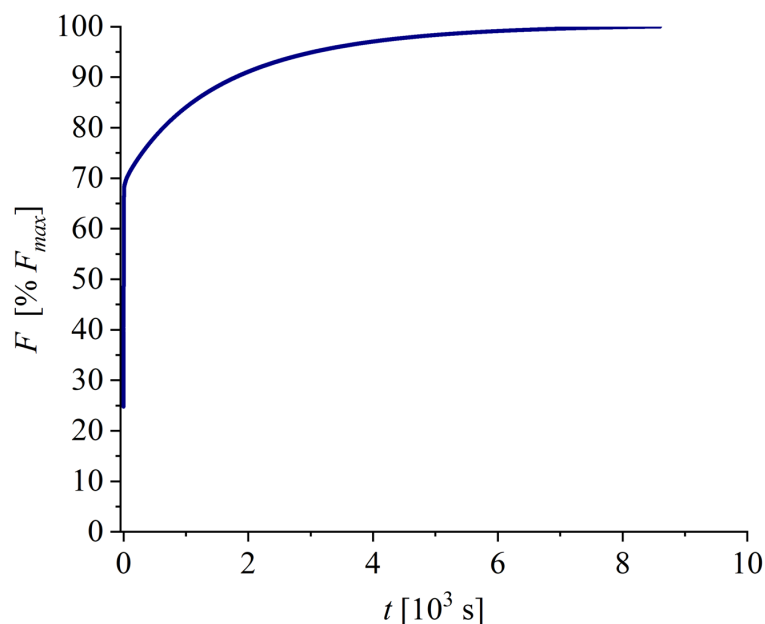
4 Rezultati in razprava

V programu Berkeley Madonna smo rešili sistem diferencialnih enačb s parametri, ki so predstavljeni v tabelah 1-6. Z rešitvijo enačb (3), (5), (6), (12) in (17) dobimo grafe aktivnosti encimov MLCK in MLCP v odvisnosti od časa, graf sile v odvisnosti od časa ter časovna poteka nastajanja nefosforiliranega nevezanega miozina ter fosforilacije miozina.

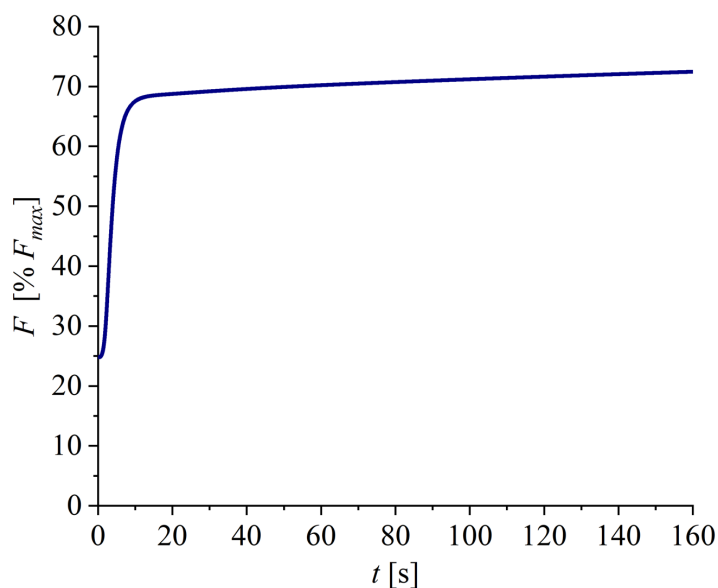
Namen modela je preveriti, ali se z zgoraj opisanimi mehanizmi regulacije aktivnosti MLCP da simulirati razvoj sile na dolgi časovni skali. Kot smo že povedali, je bilo z eksperimenti z dolgotrajno stimulacijo (reda nekaj 10 minut) ugotovljeno, da sila v prvih dveh minutah naraste do vrednosti približno 80% maksimalno razvite sile pri tem poskusu. Porast sile za nadaljnjih 20% se zgodi v drugi, počasnejši fazi, ko sila v nekaj 10 minutah naraste še za dodatnih 20%, do maksimalne vrednosti. Izkaže se, da je porast sile s predstavljenim modelom moč simulirati, kar je prikazano na slikah 9 in 10, vendar smo morali prilagoditi nekatere parametre. Vhodni signal za stimulacijo gladke mišične celice je porast ionov Ca^{2+} , kar dobro opiše oblika dvofaznega signala (slika 3). Stimulacija se v našem modelu začne ob času 0 sekund, pred tem pa je sistem v ravnovesju [9].

Edina prilagoditev, ki je bila potrebna za delovanje modela je, da smo upoštevali 1000-krat večjo vrednost parametrov K_{6f} in K_{8f} , kot izhaja iz eksperimentov. Do enake ugotovitve je prišla tudi študentka bioinformatike Vanja Založnik v svojem magistrskem delu [1], kjer je uporabila drugačen modelni pristop, ki je temeljil na kinetiki, ki izhaja iz reverzibilne kompetitivne inhibicije encimov. Tako velike razlike med meritvami in modelom v parametrih K_{6f} in K_{8f} zaenkrat ne znamo razložiti. Lahko je posledica razlik med vrsto eksperimentov in simulacijo fiziološkega dogajanja, ki ga simulira model, možno pa je tudi, da so se avtorji meritev zmotili za faktor 1000 in podali rezultate v enotah nM namesto μM . Tretja možnost bi bila, da je izmerjena koncentracija fosforiliranih mest T696 in T853 na MLCP bistveno nižja od predvidene, ki smo jo izračunali tako, da smo izmerjen delež fosforiliranih mest T696 in T853, ki je znašal 0,851, pomnožili s skupno koncentracijo MLCP, ki je $1 \mu\text{M}$. Realistične rezultate bi model dal pri vsaj 100-krat nižji vrednosti skupne koncentracije MLCP.

Kot vidimo na slikah 9 in 10 ob začetku stimulacije sila v GMC sunkovito naraste in v prvih dveh minutah naraste do približno 70% maksimalne razvite sile. Sila nato na daljši časovni skali enakomerno naraste še za 30%. Vrednosti sile F so normirane s maksimalno silo (F_{max}), ki je izračunana tako, da vrednost koncentracije platoja Ca^{2+} signala ($[\text{Ca}^{2+}]_p$) v modelu nastavimo na npr. $10 \mu\text{M}$. S F_{max} potem delimo vse vrednosti sile in dobimo % vrednosti F_{max} .



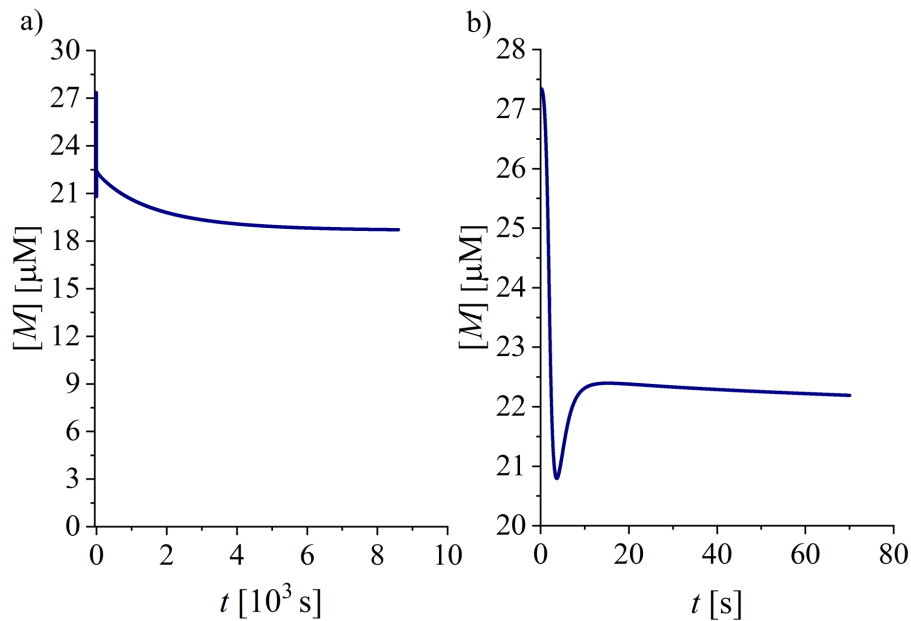
Slika 9. Razvoj sile (F), to je vrednost sile F normirana z F_{max} , v gladki mišični celici v odvisnosti od časa (t).



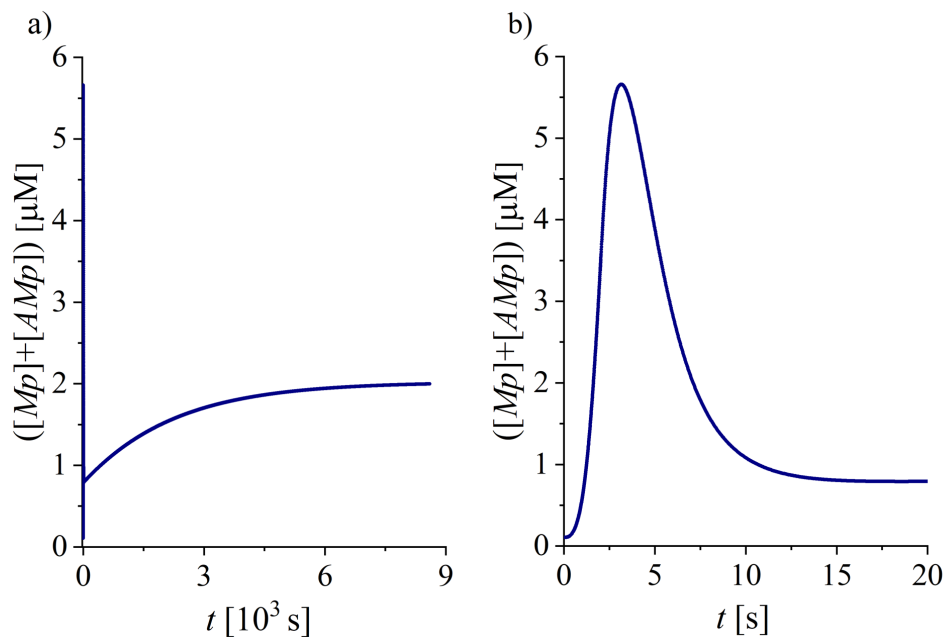
Slika 10. Razvoj sile (F), to je vrednost sile F normirana z F_{max} , v gladki mišični celici v odvisnosti od časa (t).

Posebno pozornost smo namenili tudi modeliranju kinetike proteina CPI-17 (enačbi (23) in (25)). Namesto v [1] uporabljenega kinetičnega pristopa z reverzibilno kinetiko inhibicije, smo kinetično modelirali procesa fosforilacije in defosforilacije CPI-17 ter asociacije in disociacije s PP1c. Zapisali smo dve diferencialni enačbi. Hitrost nastajanja fosforilirane oblike prostega proteina CPI-17 smo opisali s tremi členi (enačba (23)). Prvi člen opiše odvisnost hitrosti nastajanja fosforilirane oblike CPI-17 od aktivne oblike encima ROCK, drugi člen opisuje hitrost vezave $CPI-17_{pprost}$ na $PP1c_A$ in tretji člen predstavlja hitrost defosforilacije CPI-17 pod vplivom drugih fosfataz. Tudi druga diferencialna enačba (enačba (25)), ki opisuje hitrost nastajanja nevezanega in nefosforiliranega CPI-17, je sestavljena iz treh členov. Prvi člen predstavlja hitrost defosforilacije prostega CPI-17 pod vplivom drugih fosfataz, drugi člen predstavlja vpliv MLCP na hitrost defosforilacije in disociacije CPI-17 s PP1c ter tretji člen opisuje hitrost tvorbe fosforilirane oblike CPI-17.

Slika 11 prikazuje, kako nastaja nevezan, nefosforiliran miozin. Matematično to opiše enačba (12). Začetna koncentracija M je precej visoka, saj takrat v sistem še ni vnešena holigenerična stimulacija. Takoj, ko sistem zazna vhodni signal, njegova koncentracija močno pade, saj takrat naraste koncentracija fosforiliranega miozina (slika 12). Koncentracija nevezanega, nefosforiliranega miozina nato ob času 5 s ponovno malo naraste, potem pa se začne ob času 12 s počasi zniževati.



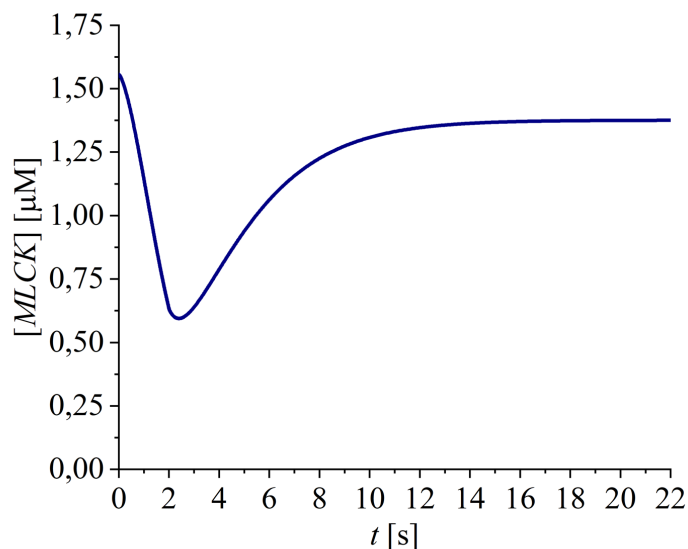
Slika 11. Koncentracija nastajanja nefosforiliranega, nevezanega miozina $[M]$, v enotah $[\mu\text{M}]$, v odvisnosti od časa (t); na časovni skali a) 10000 s in b) 80 s.



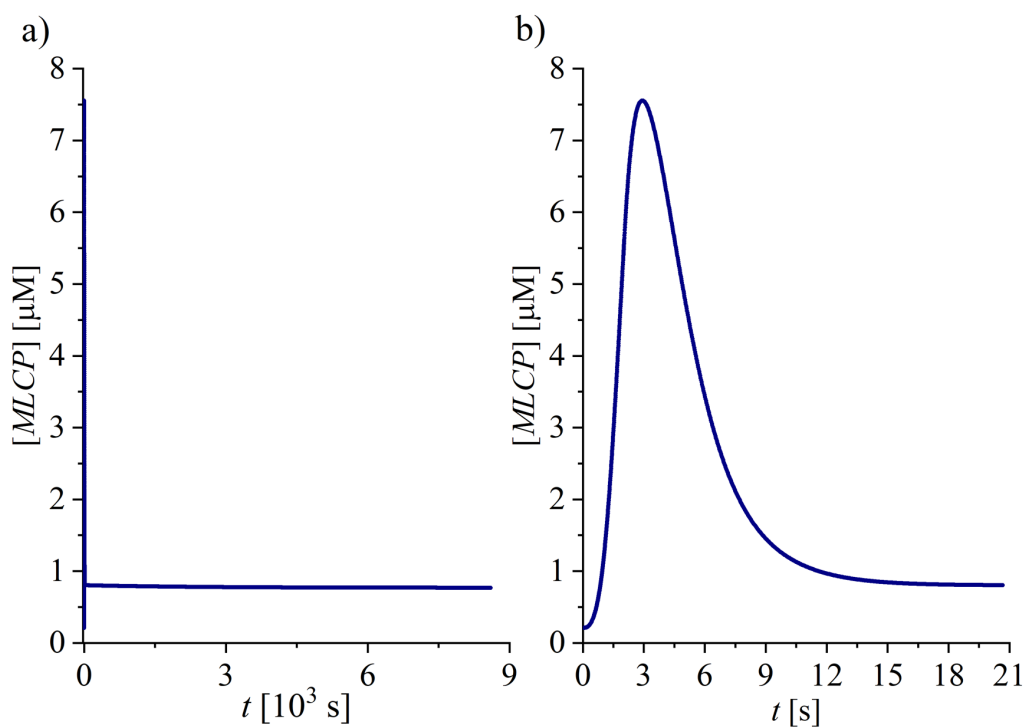
Slika 12. Na sliki je vsota koncentracij fosforiliranega prostega miozina ter fosforiliranega miozina pripetega na aktin ($[Mp] + [AMp]$), v enotah $[\mu\text{M}]$, v odvisnosti od časa (t) za časovno obdobje a) 9000 s in b) 20 s.

Zanima nas tudi, kaj se dogaja s koncentracijo MLCK. Na sliki 13 vidimo, da se koncentracija na začetku strmo zmanjša, nato pa v redu nekaj 10 sekund ponovno naraste do konstantne vrednosti, ki se tekom stimulacije ne spreminja več, saj se tudi koncentracija $[Ca^{2+}]$ ne spreminja, saj je v fazi platoja, aktivnost MLCK pa je od koncentracije Ca^{2+} direktno odvisna. Drugače je s koncentracijo MLCP, ki je prikazana na sliki 14. Koncentracija MLCP ob začetku

stimulacije močno naraste, nato se strmo zmanjša ter začne po nekaj 10 sekundah enakomerno, a komaj opazno padati. Vpliv na dogajanje na kratki časovni skali ima protein CPI-17, na dolgi pa fosforilacija T853 in T696.



Slika 13. Časovna odvisnost koncentracije MLCK ($[MLCK]$) v enotah $[\mu\text{M}]$. Graf prikazuje časovno odvisnost koncentracije MLCK v času (t) 22 sekund, saj krivulja v tem času doseže konstantno vrednost in se na daljši časovni skali ne spreminja več.



Slika 14. Koncentracija MLCP ($[MLCP]$), v enotah $[\mu\text{M}]$, v odvisnosti od časa (t); na časovni skali a) 9000 s in b) 21 s.

Model smo želeli nadgraditi še z inhibitornimi učinki regulatorne podenote fosfataze lahkih verig miozina MYPT1. Želeli smo zapisati model, ki bi opisoval, kako poleg fosforilacije treoninov na aktivnost MLCP vpliva še fosforilacija serinov in kako ta dva procesa delujeta drug z drugim. Tega nam zaradi časovne omejitve in pomanjkanja podatkov ni uspelo dokončati, saj vmesni rezultati niso bili zadovoljivi.

5 Zaključek

V diplomskem seminarju smo obravnavali mehanizme regulacije aktivnosti encima fosfataze lahkih verig miozina. Osredotočili smo se na razvoj sile v drugi, počasnejši fazi, ko naj bi sila po eksperimentalnih napovedih narastla še za dodatnih 20%. Želeli smo nadgraditi že obstoječi fizikalno-matematični model [1], kar nam je tudi uspelo, vendar smo morali pri parametrih K_{6f} in K_{8f} , ki sta konstanti polovične zasičenosti v Hillovi funkciji, upoštevati 1000-krat večjo vrednost, kot je bila izmerjena [19]. Parametra K_{6f} in K_{8f} smo dobili s prilagajanjem Hillove funkcije meritvam, ki so jih izvedli Muranyi in sodelavci [19].

V modelu smo tudi podrobneje opisali kinetiko fosforilacije in defosforilacije proteina CPI-17 ter asociacije in disociacije s PP1c. Zapisali smo dve diferencialni enačbi, ki opisujeta nastajanje prostega, nefosforiliranega proteina CPI-17 (enačba (25)) ter nastajanje prostega, fosforiliranega proteina CPI-17 (enačba (23)). Upoštevali smo vpliv aktivne oblike encima ROCK, drugih fosfatov ter vpliv PP1c.

Ena izmed ključnih ugotovitev modela je ta, da na aktivnost encima MLCP na kratki časovni skali vpliva fosforilacija encima CPI-17 (slika 14b), na dolgi časovni skali pa fosforilacija značilnih mest na MYPT1, T696 in T853 (slika 14a).

Na začetku raziskovanja, smo si zadali, da bomo nadgradili tudi procese, ki se dogajajo na MYPT1. Poleg fosforilacije značilnih mest treoninov smo želeli v model vključiti še fosforilacijo značilnih mest serinov, kar nam zaradi pomanjkanja časa in podatkov ni popolnoma uspelo. Procesov, ki se dogajajo v celici, še ne znamo dovolj dobro opisati, saj smo dobili velika odstopanja že pri vmesnih rezultatih, zato to ostaja izziv za v prihodnje.

LITERATURA IN VIRI

[1] V. Založnik, *Model regulacije fosfataze lahkih verig miozina v razvoju sile v gladkih mišicah*. Magistrsko delo na študijskem programu 2. stopnje Fizika (Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru, 2015).

[2] A. Fajmut, A. Dobovišek in M. Brumen, *Mathematical modeling of the relations between myosin phosphorylation and stress development in smooth muscle*, JCIM. A **45**, 1610 (2005).

- [3] M. D. Álvarez-Santos, M. Álvarez-González, S. Estrada-Soto in B. Bazán-Perkins, *Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility*, *Front. Physiol.* V **11**, A **701**, (2020).
- [4] J. A. MacDonald in M. P. Walsh, *Regulation of Smooth Muscle Myosin Light Chain Phosphorylation of the Myosin Targeting Subunit, MYPT*, Bentham Science. A **18**, 4 (2018).
- [5] J. Filter, B. C. Williams, M. Eto, D. Shalloway in M. L. Goldberg, *Unfair competition governs the interaction of pCPI-17 with myosin phosphatase (PPI-MYPT1)*. Pridobljeno 15.5.2021 iz <https://elifesciences.org/articles/24665#SA1> .
- [6] H. N. Aguilar in B. F. Mitchell, *Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility*, *ESHRE*. A **6**, 725 (2010).
- [7] W.C. Cole in D. G. Welsh, *Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure*. Pridobljeno 15.5.2021, iz <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986111001007>.
- [8] T. Emeršič, *Viskoelastični model izometrične kontrakcije gladkih mišic*. Diplomski seminar na študijskem programu 1. stopnje Fizika (Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru, 2012).
- [9] P. Mbikou, A. Fajmut, M. Brumen in E. Roux. *Contribution of Rho kinase to the early phase of the calcium-contraction coupling in airway smooth muscle*, *Exp Physiol.* A **96** 240 (2011).
- [10] M. Brumen, A. Fajmut, A. Dobovišek in E. Roux, *Mathematical Modelling of Ca²⁺ Oscillations in Airway Smooth Muscle Cells*, *J. Biol. Phys.* A **31**, 515 (2005).
- [11] A. Fajmut, *Modeliranje biokemijskih procesov kot sestavnih elementov kalcijeve signalizacije v procesu skrčitve gladkih mišičnih celic dihalnih poti*. Doktorska disertacija (Fakulteta za naravoslovje in matematiko, univerza v Mariboru, 2006).
- [12] P. Mbikou, A. Fajmut, M. Brumen in E. Roux, *Theoretical and experimental investigation of calcium-contraction coupling in airway smooth muscle*, *Cell Biochem. Biophys.* A **46**, 233 (2006).
- [13] D. J. Hartshorne in K. Hirano, *Interactions of protein phosphatase type 1, with a focus on myosin phosphatase*, *Mol. Cell. Biochem.* A **190**, 79 (1999).
- [14] A.P. Somlyo in A. V. Somlyo, *Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*, *Physiol. Rev.* A **83**, 1325 (2003).

- [15] A. Khromov, N. Choudhury, A. S. Stevenson, A. V. Somlyo in M. Eto, *Phosphorylation-dependent Autoinhibition of Myosin Light Chain Phosphatase Accounts for Ca²⁺ Sensitization Force of Smooth Muscle Contraction*, J. Biol. Chem. A **32**, 21569 (2009).
- [16] A. Fajmut, M. Brumen in S. Schuster, *Theoretical model of the interactions between Ca²⁺, calmodulin and myosin light chain kinase*, FEBS Lett. A **579**, 4361 (2005).
- [17] C. M. Hai in R. A. Murphy, *Cross-bridge phosphorylation and regulation of latch state in smooth muscle*, Am. J. Physiol. Cell Physiol. A **254**, 99 (1988).
- [18] M. Eto, T. Kitazawa in D.L. Brautigan. *Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. A **101**, 8888 (2004).
- [19] A. Murányi, D. Derkach, F. Erdodi, A. Kiss, M. Ito in D. J. Hartshorne, *Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on myosin phosphatase target subunit: Inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells*, FEBS Lett. A **579**, 6611 (2005).