ISSN 0868–5886 НАУЧНОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ, 2004, том 14, № 3, с. 48–56

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 576.32/ .36

© П. Б. Крайкивский, Л. Н. Галль

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКОГО ТВИЗЕРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОЙСТВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МОТОРОВ С МИКРОТРУБОЧКОЙ

Рассмотрен вопрос об использовании оптического твизера для исследования свойств взаимодействия молекулярных моторов с микротрубочкой. Разработан экспериментальный метод для исследования влияния силы, приложенной в разных направлениях к молекулярным моторам, на скорость их перемещения по микротрубочке, синхронизации движения группы моторов вдоль микротрубочки, влияния заторов на мобильность моторов. Некоторые возможности методики продемонстрированы с помощью компьютерного моделирования.

ВВЕДЕНИЕ

Результаты рентгенографических и спектроскопических исследований позволяют определить молекулярную структуру клеточных белков, отдельных элементов клетки, таких как микрофиламенты, микротрубочки и молекулярные моторы. Однако знание только структуры клеточных элементов не позволяет понять таких динамических процессов, как перенос веществ внутри и между клетками, деление, передвижение и изменения формы клетки. Для того чтобы понять эти процессы, необходимы динамические методы, которые позволят определить силы, действующие на клеточные элементы и определяющие их динамику. Такие силы возникают на молекулярном уровне и имеют порядок величины нескольких пН. Один из экспериментальных методов, который позволяет измерять силы такого порядка, основан на использовании оптического твизера [1]. В этой работе мы предлагаем метод исследования взаимодействий молекулярных моторов с микротрубочкой или микрофиламетами. Предлагаемый метод позволяет исследовать влияние силы, приложенной к мотору под разными углами, на скорость его передвижения, определить влияние возникающих заторов в движении моторов вследствие их большой плотности на скорость перемещения моторов вдоль микротрубочки, исследовать эффект синхронизации в движении молекулярных моторов, связанных с микротрубочкой.

Взаимодействия молекулярных моторов с микрофиламентами и микротрубочками имеют место в процессах деления, передвижения, изменения формы клетки, в перемещениях органелл и веществ внутри клетки и между клетками. Развитие нанотехнологий позволяет находить новые применения системам, основанным на этих биологических эффектах. Так, в работе [2] подробно описываются возможные применения наномашин, основанных на молекулярных моторах, которые взаимодействуют с микрофиламентами и микротрубочками, передвигаясь вдоль них. Одно из применений такой системы, реализованное на практике, — наноприбор для измерения силы рецептор—лиганд связи [3]. Прибор представляет поверхность с молекулярными моторами и двумя микротрубочками. Такой наноприбор позволяет измерять силы порядка нескольких пН. Также с помощью систем, включающих молекулярные моторы и микротрубочки, осуществляется направленное движение филаментов и контейнеров [4, 5, 6, 7], следовательно, может быть реализована локальная доставка лекарственных препаратов внутрь живого организма. Так как молекулярные моторы наноразмеров, то доставка лекарственных препаратов может осуществляться на клеточном уровне. Кроме лекарственных препаратов, можно доставлять приборы-сенсоры с целью диагностики живого организма. Применение возможно также и в химии для доставки катализаторов и веществ в микрореакторы. Описанные применения способствуют активизации работы по изучению взаимодействий между молекулярными моторами и микротрубочками.

Отдельному молекулярному мотору, взаимодействующему с микротрубочкой, было посвящено много работ [8, 9], что позволило определить, силу, с которой мотор действует на микротрубочку, время и размер отдельного шага мотора. Однако в клетке с одной микротрубочкой могут взаимодействовать несколько молекулярных моторов. Следовательно, интерес представляет изучение взаимодействия группы моторов с микротрубочкой или актиновым филаментом. Ниже будут представлены результаты компьютерного модели-

рования эксперимента по изучению взаимодействия полимера с молекулярными моторами на поверхности. Системы, основанные на молекулярных моторах и микротрубочках, уже сейчас имеют применения на практике и большие перспективы в будущем.

СВОЙСТВА МОЛЕКУЛЯРНОГО МОТОРА

Большинство биологических движений обеспечивается белковыми машинами — молекулярными моторами. Такие молекулярные моторы могут работать как в виде больших ансамблей, так и как одиночные молекулы. Наибольшим вниманием пользуются три класса цитоскелетных молекулярных мотора: миозин, который взаимодействует с актиновыми филаментами, кинезин и динеин, взаимодействующие с микротрубочками. В работах [8, 9] было показано, что скорость молекулярного мотора зависит от концентрации АТФ — источника энергии — и нагрузки на молекулярный мотор. Если предположить для молекулярного мотора — кинезина биохимический цикл

$$\text{К} + \text{АТФ} \xrightarrow{k_a} \text{К} \cdot \text{АТФ} \xrightarrow{k_b} \text{К} + \text{А}\Delta\Phi, \qquad (1)$$

где k_a и k_b — константы реакции, то скорость молекулярного мотора $\upsilon_{\text{м}}(C)$ в зависимости от концентрации C АТФ дается следующим выражением [9]

$$\upsilon_{\text{м}}(C) = \frac{\upsilon_0}{1 + k_b (k_a C)^{-1}} = \frac{\Delta x_{\text{м}}}{(k_b)^{-1} + (k_a C)^{-1}}. \qquad (2)$$

Размер шага молекулярного мотора — кинезина $\Delta x_{\text{м}} = 8$ нм связан с максимальной скоростью молекулярного мотора υ_0 следующим соотношением — $\upsilon_0 = k_b\, \Delta x_{\text{м}}$, определяется геометрией микротрубочки и не зависит от внешней нагрузки на молекулярный мотор. В работе [9] показано, что константы реакции k_a и k_b также не зависят от внешней нагрузки на мотор. Однако кинезин продолжает движение, только если нагрузка не превышает 5 пН [8]. При увеличении нагрузки скорость молекулярного мотора уменьшается. В работе [9] предлагается ввести зависимость от нагрузки в формулу для скорости молекулярного мотора (2) умножением правой части формулы (2) на фактор, пропорциональный нагрузке F_L

$$\upsilon_{\text{м}}(C) = \frac{\Delta x_{\text{м}}}{(k_b)^{-1} + (k_a C)^{-1}} \frac{1}{f(F_L)}. \qquad (3)$$

Значение фактора $f(F_L)$ зависит от нагрузки и удовлетворяет следующим условиям: $f(F_L) \geq 1$, $f(0) = 1$. Среднее значение шага молекулярного мотора при использовании одной молекулы АТФ определяется выражением $\Delta x_{\text{м}}/f(F_L)$.

При значительных концентрациях моторы могут образовывать заторы в движении вдоль микротрубочки, что также влияет на скорость движения моторов. Предположим, что среднее число моторов, связанных с микротрубочкой, равно N_c и обозначим N_f — число свободных мест на микротрубочке, с которыми может связаться мотор, тогда скорость молекулярного мотора можно выразить следующим образом:

$$\upsilon_{\text{м}}(C) = \frac{\Delta x_{\text{м}}}{(k_b)^{-1} + (k_a C)^{-1}} \frac{1}{f(F_L)} \left(1 - \frac{N_c}{N_f}\right). \qquad (4)$$

Таким образом, последний член учитывает уменьшение скорости с увеличением плотности моторов, связанных с микротрубочкой. Величины N_c, N_f, могут быть выражены через скорость связывания мотора с микротрубочкой и скорость отделения мотора от микротрубочки, для этого необходимо написать уравнение баланса потоков присоединения и отделения моторов.

СВОЙСТВА МИКРОФИЛАМЕНТОВ И МИКРОТРУБОЧЕК

Пластичность полимеров характеризуется их персистентной длиной. При длине полимера, меньшей персистентной длины, полимер лишается своей пластичности и практически несгибаем. Персистентная длина микрофиламентов — ~15 мкм, ДНК — ~50 нм и для микротрубочек — порядка 1 мм, что сравнимо с размером клетки. Полимеры с большой персистентной длиной поддаются манипулированию на поверхности, что позволяет надеяться на применение таких полимеров в электронике. В работе [10] описана динамика таких полимеров на наноструктурированной поверхности. Персистентная длина определяется отношением тепловой энергии к коэффициенту упругости k_{c}, который определяет энергию сгиба полимера: $L_{\text{p}} = k_{\text{c}} / k_{\text{B}}T$, где k_{B} — константа Больцмана, T — температура среды в которой находится полимер. Полимер с большой персистентной длиной удобно рассматривать как упругую линию. Введем единичный вектор $\boldsymbol{\tau}(s)$, направленный по касательной к полимеру в точке s, тогда производная $\partial_s \boldsymbol{\tau}$ является вектором кривизны, его абсолютная величина обратно пропорциональна радиусу кривизны. Свободная упругая энергия полимера описывается следующим гамильтонианом:

$$H = \int_L \mathrm{d}s \frac{k_{\text{c}}}{2} (\partial_s \boldsymbol{\tau})^2, \qquad (5)$$

где L — контурная длина полимера, $(\partial_s \boldsymbol{\tau})^2$ — квадрат кривизны. Свойства полимера с большой персистентной длиной подобны упругому стержню.

Следовательно, при действии на полимер внешних сил можно написать следующее уравнение равновесия [11]

$$k_{\text{c}}\left[\boldsymbol{\tau}\times\frac{\mathrm{d}^2\boldsymbol{\tau}}{\mathrm{d}s^2}\right]=\left[\mathbf{F}\times\boldsymbol{\tau}\right], \qquad (6)$$

где квадратные скобки обозначают векторное произведение. Уравнение (6) определяет форму полимера, приобретаемую под действием сил. Для определения констант интегрирования и параметров, входящих в уравнение (6), необходимо определить граничные условия. В случае свободного конца момент и сила на конце обращаются в нуль. Если к концу приложена сила, но конец может свободно поворачиваться, то момент сил, действующий на конец, должен исчезать. При заделанном конце, когда он не может испытывать ни продольных, ни поперечных смещений и направление касательной к полимеру в его конце фиксировано, граничные условия заключаются в том, что задаются координаты конца стержня и единичный вектор касательной к нему.

ИЗГИБ МИКРОТРУБОЧКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СЖИМАЮЩИХ СИЛ

Рассмотрим случай, когда к микротрубочке приложены силы на обоих концах, действующие в противоположных направлениях. Сила на одном из концов микротрубочки создается в результате действия оптического твизера, к другому концу приложена сила, создаваемая молекулярными моторами, хвосты которых зафиксированы на поверхности. В состоянии равновесия силы на концах микротрубочки равны.

Выберем плоскость изгиба в качестве плоскости xy и обозначим ϑ угол между касательной к микротрубочке и осью x. Угол ϑ связан с координатами точек микротрубочки $x(s)$, $y(s)$ следующими соотношениями: $\partial_s x = \cos(\vartheta)$, $\partial_s y = \sin(\vartheta)$. Обозначим углы ϑ_F и $\vartheta_{F\text{м},i}$: ϑ_F — между силой F, создаваемой оптической ловушкой, и осью x и $\vartheta_{F\text{м},i}$ — между силами $F_{\text{м},i}$, создаваемыми молекулярными моторами, и осью x. Для того чтобы полимер находился в равновесии, необходимо, чтобы суммы сил и моментов, приложенных к центру масс, равнялись нулю. Следовательно, суммарная сила от молекулярных моторов $F_{\text{м}}=\Sigma_i F_{\text{м},i}$ должна быть равна силе F и иметь противоположное направление $F_{\text{м}}=-F$. Таким образом, измерение силы F с помощью оптического твизера позволяет определить силу и направление создаваемую молекулярными моторами. Если известна сила, создаваемая одним мотором, то можно оценить число моторов, взаимодействующих с микротрубочкой. Для равенства нулю моментов силы должны быть приложены вдоль оси полимера, оси x, при этом происходит сжимание микротрубочки. Критическая сжимающая сила может быть найдена решением уравнения для слабого изгиба [11]. В случае, когда концы микротрубочки могут свободно поворачиваться и, следовательно, моменты сил, действующие на концы, равны нулю, критическая сжимающая сила равна $F_{\text{кр}} = \pi^2 EI_{\text{i}} / L^2$, E — модуль растяжения (модуль Юнга), I_{i} — наименьший из главных моментов инерции. Если один из концов микротрубочки заделан, то $F_{\text{кр}} = \pi^2 EI_{\text{i}} / 4L^2$. Раскрывая векторные произведения в уравнении (6), получаем уравнение, определяющее форму изогнутой микротрубочки,

$$k_{\text{c}}\partial_{s,s}\vartheta(s) = F\sin(\vartheta(s)-\vartheta_F)\,. \qquad (7)$$

Интегрирование уравнения (7) дает

$$\frac{k_{\text{c}}}{2}\left(\partial_s\vartheta(s)\right)^2 + F\cos(\vartheta(s)-\vartheta_F) = C_1\,, \qquad (8)$$

где C_1 — константа интегрирования. Концы микротрубочки могут свободно поворачиваться, следовательно, моменты сил на концах должны исчезать. Момент пропорционален $\partial_s\vartheta$, на концах микротрубочки $\partial_s\vartheta=0$. Условия равенства нулю моментов на концах позволяют определить константу интегрирования $C_1 = F\cos(\vartheta(0)-\vartheta_F)$. Интегрирование (8) приводит к следующему уравнению для длины дуги s

$$s=\pm\sqrt{\frac{k_{\text{c}}}{2}}\int\frac{\mathrm{d}\vartheta}{\sqrt{C_1-F\cos(\vartheta-\vartheta_F)}}+C_2\,. \qquad (9)$$

Функция $\vartheta(s)$ может быть выражена из (9) через эллиптические функции. Координаты точек микротрубочки $x(s)$, $y(s)$ определяются следующими выражениями:

$$x=\int\cos(\vartheta)\mathrm{d}\vartheta\,,\ y=\int\sin(\vartheta)\mathrm{d}\vartheta\,. \qquad (10)$$

При интегрировании (9) от $\vartheta(0)$ до $\vartheta(L)$ длина дуги, определяемая выражением (9), равна длине микротрубочки L. Измерение силы в случае, когда изогнутая микротрубочка находится в покое, не позволяет получить зависимость скорости передвижения молекулярного мотора от нагрузки, приложенной к мотору. Для того чтобы получить зависимость скорости мотора $\upsilon_{\text{м}}$ от приложенной к нему силы F, необходимо позволить микротрубочке перемещаться. В равновесном случае скорости передвижения моторов и микротрубочки равны. Таким образом, измеряя скорость передвижения микротрубочки при различных нагрузках, получим зависимость $\upsilon_{\text{м}}(F)$.

МОДЕЛЬ, ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ДЛЯ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Молекулярный мотор моделируется в виде пружины с коэффициентом упругости $k_м$, действие которой на полимер ограничено определенным расстоянием, которое определяется вероятностью молекулярного мотора быть связанным с полимером. Один конец молекулярного мотора — хвост закреплен на поверхности, другой — голова перемещается по полимеру, создавая силу, которая действует на полимер в противоположном направлении движения молекулярного мотора. Предположим, что молекулярный мотор переместился на расстояние $\Delta x_{||}$, тогда сила, с которой мотор действует вдоль полимера, определяется как $F_{||} = -k_м \Delta x_{||}$. Логично предположить, что мотор изначально связывается с полимером перпендикулярно к полимеру, что соответствует минимальному расстоянию $\Delta x_{\perp}$ от места связи молекулярного мотора с поверхностью до места его связи с полимером. После связывания молекулярного мотора с полимером на полимер действует сила, направленная к месту связи молекулярного мотора с поверхностью и равная $|F_{\perp}| = |k_м \Delta x_{\perp}|$. Скорость передвижения молекулярного мотора по микротрубочке зависит от силы, с которой мотор действует на полимер, т. е. скорость зависит от натянутости пружины. При достижении критического значения силы молекулярный мотор срывается с полимера. Изменение скорости молекулярного мотора с силой F можно выразить следующей формулой:

$$\upsilon_м = \upsilon_0 \left(1 - F / F_м\right). \qquad (11)$$

При достижении максимального значения силы $F_м$ молекулярный мотор срывается с микротрубочки, таким образом, скорость движения молекулярного мотора $\upsilon_м$ не может быть отрицательна и υ_0 — максимальное значение скорости. Как было отмечено выше (3, 4), величина скорости молекулярного мотора $\upsilon_м$ зависит от концентрации АТФ в растворе, в котором находятся молекулярные моторы. При определенной концентрации АТФ достигается максимальное значение скорости υ_0, после чего скорость мотора $\upsilon_м$ не изменяется при дальнейшем увеличении концентрации АТФ. В (11) предполагается, что концентрация АТФ выше уровня, при котором достигается значение скорости υ_0 в отсутствии нагрузки на молекулярный мотор. Молекулярный мотор кинезин совершает примерно сто шагов, после чего отделяется от микротрубочки [8, 9]. В нашей модели мы предполагаем, что спустя некоторое время после отделения мотор вновь может связаться с микротрубочкой и участвовать в движении.

В модели, используемой для компьютерного моделирования, полимер представлен как цепочка элементов — сегментов, соединенных между собой пружинами с продольным и поперечным коэффициентами упругости k_c, k_n. Пружины между сегментами полимера позволяют связать сегменты между собой и удерживать их вместе. Энергия сгиба, определяемая гамильтонианом (5) в таком представлении, задается формулой

$$E_c = \frac{k_c \psi^2}{2}, \qquad (12)$$

где ψ — угол между сегментами. Динамика полимера определяется всеми вышеописанными силами. Баланс сил определяется уравнением Ланжевена

$$\frac{1}{\mu}\frac{\partial \mathbf{z}(x,t)}{\partial t} = \mathbf{F}_{\text{sum}} + \boldsymbol{\xi}(x,t). \qquad (13)$$

Последний член в уравнении (13) $\xi(x, t)$ определяет силу, возникающую вследствие термофлуктуации: $\xi(x, t)$ является причиной броуновского движения полимера; F_{sum} — сумма всех вышеописанных сил; μ — параметр, определяющий мобильность полимера. В дискретной модели для отдельного сегмента имеют место следующие соотношения [12]:

$$\begin{gathered} u_{||} = \mu_{||} F_{||}, \quad u_{\perp} = \mu_{\perp} F_{\perp}, \quad u_{\varphi} = \mu_{\varphi} M, \\ \mu_{||} = \frac{\ln(L_c / d)}{2\pi\eta L_c}, \ \mu_{\perp} = \frac{\mu_{||}}{2}, \ \mu_{\varphi} = \frac{6\mu_{||}}{L_c^{\,2}}. \end{gathered} \qquad (14)$$

Сегмент представляет собой цилиндр с диаметром d и длиной L_c; $u_{||}$, $u_{\perp}$ — скорости в параллельном и перпендикулярном направлениях; u_{φ} — угловая скорость; $F_{||}$, $F_{\perp}$ — силы, приложенные к сегменту; M — момент вращения, возникающий за счет действия внешней силы; η — вязкость среды, в которой находится стержень.

В компьютерном моделировании флуктуации, броуновское движение полимера моделируются генератором случайных чисел *random* с нормальным распределением. Переходя к дискретной форме уравнения Ланжевена (13), удобно использовать систему координат центров масс сегментов ($X_{c,i} Y_{c,i}$) и их направлений, задающихся набором углов к оси x — φ_i; следовательно, уравнение (13) принимает вид системы уравнений

$$\begin{aligned} X_{c,i}(t+1) &= X_{c,i}(t) + \mu_{||} F_{\text{sum},||} \Delta t + a_{||} \cdot random, \\ Y_{c,i}(t+1) &= Y_{c,i}(t) + \mu_{\perp} F_{\text{sum},||} \Delta t + a_{\perp} \cdot random, \\ \varphi_i(t+1) &= \varphi_i(t) + \mu_{\varphi} M_{\text{sum}} \Delta t + a_{\varphi} \cdot random, \end{aligned} \qquad (15)$$

где коэффициенты $a_{||}$, $a_{\perp}$, a_{φ} определяются выражениями: $a_* = (6\, k_B\, T\, \Delta t\, \mu_*)^{1/2}$, $* \in \{||, \perp, \varphi\}$. Система уравнений определяет положение всех сегментов цепочки полимера в следующий момент времени

t+1 при известных силах и моментах, действующих на сегменты; i — целое число, определяющее номер сегмента; Δt — шаг итерации. Угол ψ между соседними сегментами может быть выражен через углы φ_i, задающие направление сегментов к оси x: $\psi = \varphi_{i+1} - \varphi_i$. Следовательно, момент, возникающий вследствие стремления полимера уменьшить энергию сгиба (12), определяется следующей формулой: $M_c = k_c L_c(\varphi_{i+1} - \varphi_i)/2$, L_c — длина сегмента. Момент, действующий на i и i+1 сегменты, равен нулю, если угол между i и i+1 сегментами равен нулю.

Оптическая ловушка моделируется гармоническим потенциалом и, следовательно, может быть представлена как пружина с коэффициентом упругости k. Сила, с которой оптическая ловушка действует на полимер, определяется как $F = -k\,\Delta r$ и должна учитываться в системе уравнений (15) для сегмента, который находится в районе действия оптической ловушки (Δr — смещение сегмента от центра оптической ловушки).

СТАБИЛЬНОСТЬ ЧИСЛЕННОГО МЕТОДА

Рассмотрим сегмент — стержень, на который действует сила F; динамика стержня описывается системой уравнений (15). Для того чтобы решение уравнений (15) давало корректный результат, необходимо выбрать маленькое значение шага итераций Δt. В этом разделе будет проведена оценка максимальной величины шага итераций $\Delta t_{\max}$, при котором решение уравнений (15) остается стабильным и не расходится. Если предположить, что источником силы, действующей на стержень, является пружина с коэффициентом k_n, то сила может быть выражена следующим образом: $F = k_n \Delta x \sim k_n L_c\,\varphi$. Следовательно, момент может быть выражен как $M \sim -L_c F \sim -k_n L_c^2\,\varphi$. Угловое перемещение за время, определяемое шагом итерации Δt, выражается через момент следующим образом $\Delta\varphi = \mu_\varphi M \sim -\Delta t\, k_n \mu_\varphi L_c^2\,\varphi$. Приращение угла $\Delta\varphi$ определяет величину угла в следующий момент времени $\varphi_{i+1} = \varphi_i + \Delta\varphi$. В случае, если выполняется условие $\|\varphi_{i+1}\| \geq \|\varphi_i\|$, то угол нарастает с каждым шагом итерации и, следовательно, численное решение некорректно. Обратное соотношение, определяющее стабильное решение, дается выражением $\Delta t\, k_n \mu_\varphi L_c^2 < 2$. Используя выражение, определяющее μ_φ (14), для шага итерации Δt получаем следующее выражение:

$$\Delta t < \frac{2\pi\eta L_c}{3k_n \ln(L_c/d)}. \qquad (16)$$

На сегмент действуют вышеописанные силы, с учетом всех этих сил и должен определяться итерационный интервал. Кроме того, величина силы, действующая на сегмент, меняется со временем, т.к. число активных моторов, связанных с сегментом, меняется. Предложим, что число активных моторов для рассматриваемого сегмента N_c, тогда, следуя аналогичным рассуждениям, как при выводе выражения (16), найдем верхнюю оценку для шага итерации

$$\Delta t < \Delta t_{\max} = \frac{2k_n}{N_c k_м + 2k_n}\,\frac{2\pi\eta L_c}{3k_n \ln(L_c/d)}, \qquad (17)$$

где коэффициент $k_м$ описывает взаимодействие мотора с сегментом. В численных расчетах был выбран шаг итераций равный $\Delta t = 0.8\,\Delta t_{\max}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Вышеописанный алгоритм был реализован с помощью языка программирования C++ с использованием графической библиотеки PGPLOT. Основные цели компьютерного моделирования описанной системы:

1) исследовать влияние силы, приложенной в разных направлениях к молекулярным моторам, на скорость их перемещения по микротрубочке;

2) изучить влияние заторов, возникающих в движении моторов вследствие их большой плотности, на скорость перемещения моторов по микротрубочке.

В эксперименте с одним мотором [13] было показано, что скорость молекулярного мотора зависит от приложенной силы в направлении, поперечном движению мотора. Скорость молекулярного мотора зависит как от величины приложенной поперечной силы, так и от направления. При приложении силы слева или справа поперек движения молекулярного мотора по микротрубочке экспериментально получены различные зависимости скорости мотора от приложенной поперечной силы, но в обоих случаях скорость перемещения мотора убывает с возрастанием поперечной силы [13]. Такое поведение молекулярного мотора позволяет сделать вывод, что при преобразовании химической энергии в механическую скорость молекулы кинезина определяется сложным механохимическим циклом, включающим несколько переходных состояний [13].

Мы предлагаем для измерения зависимости скорости молекулярного мотора от приложенной силы использовать геометрию эксперимента, при которой микротрубочка вращается при воздействии на один из ее концов молекулярных моторов, как показано на рис. 1. Молекулярные моторы изображены в виде пятен, расположенных по кругу, микротрубочка представлена изогнутой линией идущей к центру, где расположена оптическая

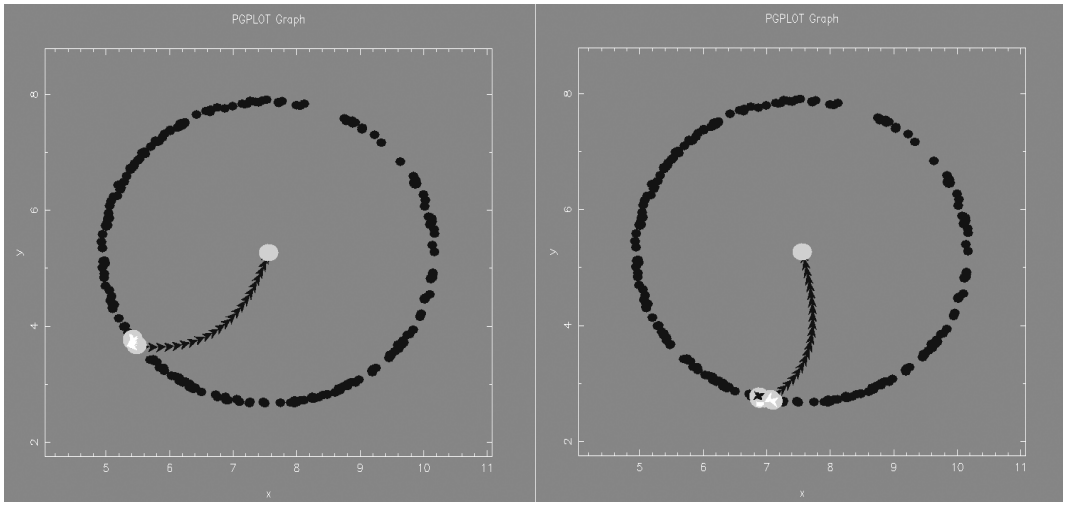

Рис. 1. Вращение микротрубочки (компьютерное моделирование): два кадра с разницей во времени 5000 итераций

ловушка, изображенная на рисунке круглым пятном. Микротрубочка имеет изогнутую форму в результате действия на ее конец молекулярных моторов; активные моторы изображены в виде пятен большего диаметра и белой стрелкой в середине пятна. Другой конец микротрубочки, расположенный в центре круга, фиксирован оптической ловушкой, создаваемой оптическим твизером, в результате чего происходит сжимание микротрубочки в радиальном направлении. Оптическая ловушка позволяет измерять величину силы в радиальном направлении. Молекулярные моторы создают также силы вдоль изогнутой микротрубочки, что приводит к ее вращению. Микротрубочка изгибаясь также оказывает воздействие на молекулярные моторы в радиальном направлении. Сила воздействия определяется параметрами микротрубочки, модулем упругости и ее изогнутой длиной. Изменение радиуса круга, на котором расположены молекулярные моторы, приводит к изменению направления воздействия силы на молекулярные моторы. При изменении плотности молекулярных моторов на поверхности изменяется величина силы, приложенной к отдельному мотору. Предлагаемая система замечательна тем, что перемещения микротрубочки ограничены в небольшой наблюдаемой области и при этом для измерения силы нет необходимости перемещать оптическую ловушку вместе с микротрубочкой.

Экспериментально могут быть измерены: скорость центра масс микротрубочки υ_c; сила, направленная в радиальном направлении $F_г$, измеряемая оптическим твизером; форма изогнутой микротрубочки и, следовательно, угол α между касательной к микротрубочке и касательной к окружности, на которой расположены молекулярные моторы; длина микротрубочки L; плотность молекулярных моторов на поверхности. Число связанных моторов N_c с микротрубочкой при малых плотностях моторов определяется плотностью молекулярных моторов на поверхности и углом α. Форма микротрубочки определяется ее длиной, радиусом окружности, на которой расположены молекулярные моторы, и количеством моторов, связанных с микротрубочкой (9). Измеряемых величин достаточно, чтобы найти число связанных с микротрубочкой моторов (см. рис. 2, 3) и зависимость скорости молекулярного мотора от при-

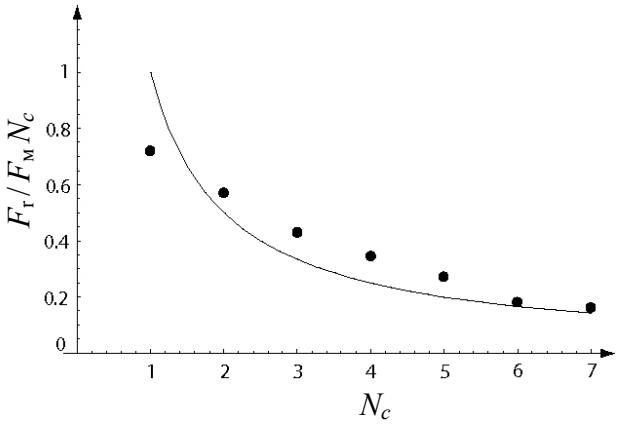

Рис. 2. Зависимость силы, направленной в радиальном направлении $F_г/F_м N_c$, измеряемой на конце микротрубочки и приложенной к отдельному мотору, от числа связанных с микротрубочкой моторов N_c. Точки на рисунке соответствуют результатам компьютерного моделирования, сплошная линия соответствует функции $1/N_c$

ложенной к нему силы в разных направлениях (см. рис. 4). Так как сила, действующая на отдельный мотор, уменьшается с возрастанием числа связанных моторов N_c, (см. рис. 2), то скорость, с которой моторы перемещаются вдоль микротрубочки, увеличивается. В равновесии скорость молекулярных моторов связана со скоростью центра масс микротрубочки следующим соотношением: $\upsilon_c \cos(\alpha) = \upsilon_м$. Соотношение скоростей позволяет получить зависимость скорости молекулярного мотора от приложенной к нему силы в разных направлениях (см. рис. 4). Направление силы определяется углом α и, следовательно, параметрами системы, изображенной на рис. 1.

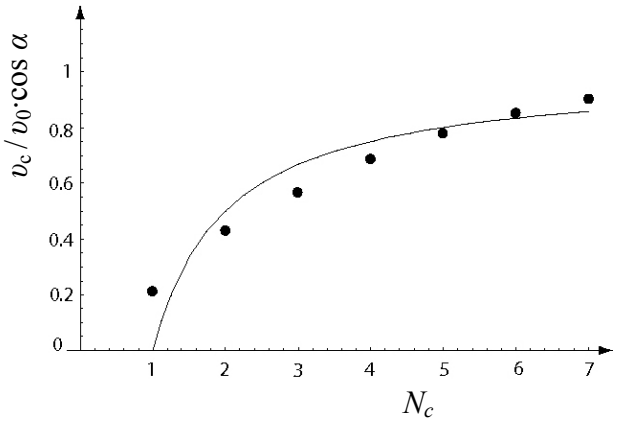

Рис. 3. Зависимость скорости центра масс микротрубочки от числа связанных с микротрубочкой моторов N_c. Точки на рисунке соответствуют результатам компьютерного моделирования, сплошная линия соответствует аналитическому расчету уравнений (11, 13)

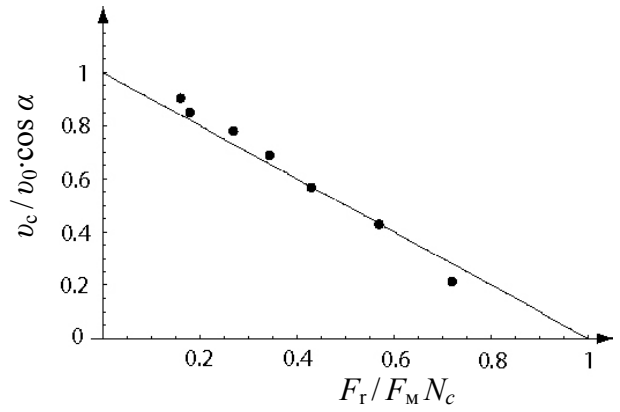

Рис. 4. Зависимость скорости центра масс микротрубочки от силы, действующей на отдельный мотор $F_г / F_м N_c$. Точками показаны результаты компьютерного моделирования, сплошная линия соответствует аналитическому расчету уравнений (11, 13)

В процессах митоза аккумулирование молекулярных моторов на концах микротрубочек приводит к образованию астер — внутриклеточной структуры, составленной из радиально расположенных вокруг центриоли фибрилл [14]. При аккумулировании молекулярных моторов образуются заторы в их движении. В работе [15] рассматривается влияние плотности молекулярных моторов на скорость передвижения микротрубочки. Образование заторов приводит к уменьшению скорости движения моторов и, как следствие, микротрубочки. Заторы в движении моторов возникают вследствие ограниченного числа мест на микротрубочке для связывания молекулярного мотора. Если с ячейкой на микротрубочке связан молекулярный мотор, то другой мотор не может переместиться и занять эту область до тех пор, пока первый мотор не освободит место. Рассасывание заторов зависит от времени связывания мотора с микротрубочкой и его отделения от микротрубочки. Скорости связывания и отделения моторов также могут зависеть от приложенной к мотору силы. В моделируемом на компьютере эксперименте мы ввели область, которую занимает мотор при связывании с микротрубочкой. При этом молекулярный мотор осуществляет шаг в соседнюю область, только если она не занята другим молекулярным мотором. Результаты компьютерного моделирования показывают, что скорость центра масс микротрубочки и, следовательно, моторов слабо зависит от приложенной силы, но может резко меняться при изменении направления воздействия на мотор. Такая зависимость от направления объясняется тем, что расположение свободных областей на микротрубочке также меняется от направления.

Другой интересной проблемой, которая может быть исследована в предложенном эксперименте (рис. 1), является синхронизация движений моторов, связанных с микротрубочкой. Если два маятника, совершающих колебания с разными частотами, связать упругим стержнем, то спустя некоторое время их частоты сравняются; таким образом, происходит синхронизация двух связанных систем [16]. Молекулярные моторы, связанные с микротрубочкой, также синхронизуют свои движения и воздействие на микротрубочку.

РЕАЛИЗАЦИЯ ИССЛЕДУЕМОЙ СИСТЕМЫ НА ПРАКТИКЕ

Для захвата и удержания одного из концов микротрубочки оптической ловушкой необходимо на конце микротрубочки иметь связанную с ней сферическую частицу. Причем связь должна быть достаточно прочной, чтобы действия других

сил, возникающих благодаря действию молекулярных моторов на микротрубочку и оптической ловушки на частицу, не разорвали ее. Кроме того, отношение сигнал / шум также зависит от качества связи сферической частицы и исследуемого объекта — микротрубочки [17]. Для осуществления такой связи используется взаимодействие стрептовидина с биотином. На одном из концов микротрубочки необходимо наличие биотина и на поверхности сферической частицы — наличие стрептовидина [6]. Метод нанесения на поверхность молекулярных моторов описан в работах [5, 6, 7]. Таким образом, вышеописанный эксперимент может быть практически реализован.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описан метод исследования свойств взаимодействия молекулярных моторов с микротрубочкой; влияния силы, приложенной в разных направлениях к молекулярным моторам, на скорость их перемещения по микротрубочке; синхронизации движения группы моторов вдоль микротрубочки; влияния заторов на мобильность моторов. Разработанный экспериментальный метод предполагает использование оптического твизера. В работе предложен математический аппарат для описания механических, динамических и статистических свойств молекулярных моторов, взаимодействующих с микротрубочкой. С помощью компьютерного моделирования продемонстрированы некоторые возможности методики. Предложенный метод упрощает проведение эксперимента и имеет значительные преимущества по объему получаемой информации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Крайкивский П.Б., Галль Л.Н.* Оптические твизеры — новый метод исследований в биологии // Научное приборостроение. 2004. Т. 14, № 1. С. 10–17.
2. *Böhm K.J., Unger E.* Kinesin and Nanoactuators // Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. American Scientific Publishers, 2004. V. 4. P. 345–357.
3. *Hess H., Howard J., Vogel V.* A Piconewton Forcemeter Assembled from Microtubules and Kinesins // Nano Lett. 2002. V. 2, N 10. P. 1113–1115.
4. *Hess H., Matzke C.M., Doot R.K. et al.* Molecular Shuttles Operating Undercover: A New Photolithographic Approach for the Fabrication of Structured Surfaces Supporting Directed Motility // Nano Lett. 2003. V. 3, N 12. P. 1651–1655.
5. *Hess H., Clemmens J., Howard J. Vogel V.* Surface Imaging by Self-Propelled Nanoscale Probes // Nano Lett. 2002. V. 2, N 2. P. 113–116.
6. *Hess H., Clemmens J., Qin D., Howard J., Vogel V.* Light-Controlled Molecular Shuttles Made from Motor Proteins Carrying Cargo on Engineered Surface // Nano Lett. 2001. V. 1, N 5. P. 235–239.
7. *Hiratsuka Y., Tada T., Oiwa K., Kanayama T. and Uyeda T.Q.P.* Controlling the Direction of Kinesin-Driven Microtubule Movements along Microlithographic Tracks // J. Biophys. 2001. V. 81. P. 1555–1561.
8. *Svoboda K., Schmidt C.F., Schnapp B.J., Block S.M.* Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry // Nature. 1993. V. 365. P. 721–727.
9. *Svoboda K., Block S.M.* Force and velocity measured for single kinesin molecules // Cell. 1994. V. 77. P. 773–784.
10. *Kraikivski P., Lipowsky R. and Kierfeld J.* Barrier crossing of semiflexible polymers // Europhys. Lett. 2004. V. 66, N 5. P. 763–769.
11. *Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М.* Теоретическая физика. В 10 т. Т. VII. Теория упругости. М.: Наука, 1987. 248 с.
12. *Tirado M.M., Carcia de la Torre J.* Translational friction coefficients of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders // J. Chem. Phys. 1979. V. 71, N 6. P. 2581–2587.
13. *Block S.M., Asbury C.L., Shaevitz J.W., Lang M.J.* Probing the kinesin reaction cycle with a 2D optical force clamp // PNAS. 2003. V. 100, N 5. P. 2351–2356.
14. *Nedelec F., Surrey T. and Maggs A.C.* Dynamic Consentration of Motors in Microtubule Arrays // Phys. Rev. Lett. 2001. V. 86, N 14. P. 3192–3195.
15. *Bohm K.L., Stracke R., Unger E.* Speeding up kinesin-driven microtubule gliding *in vitro* by variation of cofactor composition and physicochemical parametrs // Cell Bio. I. 2000. V. 24, N 6. P. 335–341.
16. *Pikovsky A., Rosenblum M. and Kurths J.* Synchronization a universal concept in nonlinear sciences. Cambridge Univ. Press, 2002. 411 p.
17. *Gittes F., Schmidt C.F.* Thermal noise limitations on micromechanical experiments // J. Eur. Biophys. 1998. V. 27. P. 75–81.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Материал поступил в редакцию 25.06.2004.

COMPUTER SIMULATIONS REVEAL MOLECULAR MOTOR PROPERTIES USING A MICROTUBULE AND AN OPTICAL TWEEZER

P. B. Kraikivski, L. N. Gall

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

We present theoretical studies of the dynamics of molecular motors interacting with a microtubule. Using an optical tweezer and a microtubule, we subjected molecular motors to forces in different directions. To study the dependence of motor properties on the load in different directions, the translational motion of the microtubule in a gliding motor array was transformed into the rotational motion. Computer simulations show that the force-velocity relationship can be obtained. The dependence of microtubule gliding on the density of bound motors is investigated.