

*Двенадцатая Международная научно-техническая конференция
«Оптические методы исследования потоков»
Москва, 25 — 28 июня 2013 г.*

УДК 577.353

Ю.М.Романовский¹, А.В.Карговский¹, А.В. Приезжев¹, В.П.Трифоненков²

¹ *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия,
119992 ГСП-2, Москва, Ленинские Горы, физический факультет,
E-mail: yuromanovsky@yandex.ru*

² *Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Россия,
115409, Москва, Каширское шоссе 31, E-mail: snuclear@mail.ru*

**ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ АВТОВОЛНОВАЯ ГИДРОДИНАМИКА
И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОТОРЫ**

АННОТАЦИЯ

Живые клетки и внутриклеточные структуры и компоненты находятся в постоянном движении. Их перемещение в пространстве всегда связано со сложной автоволновой гидродинамикой протоплазмы. Достаточно хорошо изучены и построены соответствующие математические модели для гигантских клеток зеленых харовых водорослей и плазмодия слизевого гриба *Physarum*. Микротоки протоплазмы в этих гигантских клетках поддерживаются благодаря работе молекулярных моторов (ММ), действующих на основе актомиозиновых взаимодействий. Однако и в протоплазме клеток меньших размеров, таких как нейроны, имеет место непрерывный направленный транспорт органелл. Он осуществляется с помощью ММ, действующих на основе взаимодействия белковых макромолекул кинезина и миозина V. В связи с этим будет представлена общая картина транспорта в нейронах. Следует подчеркнуть, что как микротоки протоплазмы в живых клетках, так и динамика самих ММ во многом были изучены с применением различных лазерных и оптических методов: доплеровской микроскопии, микро-видео съемки, лазерных пинцетов и магнитных ловушек различных конструкций, а также методов фиксации оптических меток, связанных с движущимися фрагментами ММ. В работе будут представлены оптические методы как для изучения потоков протоплазмы, так и транспорта органелл в нейронах. Достаточно подробно описано функционирование кинезина и представлены соответствующие новые математические модели его молекулярной динамики.

**ЖИВЫЕ КЛЕТКИ, ТЕЧЕНИЕ ПРОТОПЛАЗМЫ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОТОРЫ,
ОПТИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ**

ВВЕДЕНИЕ

Направленные движения целостных организмов или составляющих их отдельных компонентов являются неотъемлемой характеристикой живых систем на разных уровнях организации, начиная с живых клеток. Некоторые клетки (одноклеточные организмы) обладают собственной подвижностью – локомоцией, например, амёбы, инфузории, бактерии и другие жгутиковые организмы (например, сперматозоиды) и пр. При этом движителями являются соответственно внутриклеточные сократительные молекулярные комплексы, реснички, жгутики и пр., существенным элементом которых являются различные ММ.

Другие клетки, являющиеся как правило составными частями многоклеточных организмов, демонстрируют более или менее интенсивную направленную подвижность внутриклеточных органоидов: ядер, митохондрий и разного рода везикул. Эти структуры приводятся в движение внутри клеток также с помощью ММ.

Диапазон скоростей направленного транспорта одноклеточных организмов или их внутриклеточных компонентов составляет от долей мкм/с до нескольких мм/с (в зависимости от типа движителей и их числа, приходящегося на одну клетку или на единицу объема внутриклеточного матрикса). Эти движения можно визуализировать с помощью современных оптических микроскопов, а временная динамика отдельных клеток и/или внутриклеточных структур может быть исследована путем цифровой обработки изображений, получаемых либо в реальном времени, либо при ускоренной или замедленной их регистрации. Данные оптических экспериментов являются одним из главных источников для построения содержательных математических моделей ММ.

ЛАЗЕРНАЯ МИКРОСКОПИЯ И ТОМОГРАФИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ

Лазерная доплеровская микроскопия (ЛДМ)

Существует широкий круг задач, как правило связанных с изучением механизмов направленного движения клеток и, особенно, транспорта внутриклеточных структур, для решения которых целесообразно не следить за перемещениями отдельных микроструктур, а получать информацию, усредненную по одному объему или сразу нескольким объемам (измерительным объемам), содержащим эти структуры. В таких случаях удобно применять лазерные доплеровские методы измерений. Ниже будут рассмотрены некоторые примеры доплеровских измерений внутриклеточной подвижности, проведенных нами в гигантских растительных клетках харовой водоросли *Nitella* и в телях плазмодия слизевого гриба *Physarum polycephalum*. Нами было построено несколько вариантов лазерных доплеровских измерителей скорости, в частности лазерных доплеровских микроскопов (ЛДМ), реализующих те или иные схемы измерений, многие из которых описаны, например, в монографии [1]. В частности, были использованы дифференциальные схемы и схемы с опорным пучком с регистрацией сигнала в переднее и заднее полупространство. Для компенсации низкочастотного пьедестала в доплеровском спектре использовались схемы с поляризационной развязкой и со сдвигом частоты зондирующих пучков. Для проведения измерений одновременно в нескольких точках использовались многопучковые схемы. Выбор оптимальной схемы, как правило, представлял собой сложную задачу в связи со следующими особенностями исследуемых объектов.

1. Толщина канала, в котором локализован поток внутриклеточной цитоплазмы составляет, как правило, несколько десятков мкм, причем в этом потоке имеют место значительные градиенты скорости. Для обеспечения высокой локальности измерений скорости необходимо было уменьшать размер измерительного объема в направлении вектора скорости потока, что неминуемо приводило к времяпролетному уширению доплеровского спектра и, как следствие, к снижению точности измерений скорости.
2. В качестве светорассеивающих частиц (трассеров) в потоке могли выступать только естественные внутриклеточные включения (ядра, митохондрии), размерами и формой которых невозможно управлять. Как следствие, контраст доплеровского сигнала зачастую был сравнительно низок.
3. Стенки живых клеток также содержат светорассеивающие включения (в случае фотосинтезирующих водорослей – хлоропласты, в случае плазмодия слизевого гриба – заполненные слизью инвагинации). Рассеяние света на этих включениях приводит к паразитной регулярной или квазишумовой модуляции зондирующего пучка, что также ухудшает качество доплеровского сигнала. С другой стороны излучение, рассеянное на

относительно неподвижной стенке клетки и не содержащее сдвиги частоты, в ряде случаев может использоваться в качестве опорного в схеме с опорным пучком.

4. Для обеспечения невозмущающего характера измерений на живых объектах приходится ограничивать мощности зондирующих пучков вплоть до 0,1 мВт с тем, чтобы при их сильной фокусировке не происходило никаких нарушений жизненных процессов в клетке.

Имеются также и другие особенности лазерных доплеровских измерений в живых клетках, делающих эти измерения нетривиальными [2]. Некоторые результаты наших экспериментов, проведенных с названными выше объектами, описаны в работе [3]. Здесь же покажем схему построенного нами ЛДМ, реализующего дифференциальный метод измерений величины и направления вектора скорости внутриклеточных потоков (см. рис. 1).

В этом микроскопе для разделения исходного лазерного пучка на два и для внесения стабильного и переменного сдвига частоты между ними используются две акусто-оптических (брэгговских) ячейки с блоком накачки. Пучки дифрагируют в брэгговских ячейках так, что в первом порядке дифракции они приобретают сдвиг частоты $f_{12} = 0 - 10$ кГц. Точное значение частоты сдвига f_{12} выбирается в зависимости от максимальной скорости, которую предстоит определить и, как следствие этого, максимального доплеровского сдвига частоты, который следует детектировать. Обычно f_{12} устанавливается в диапазоне от 1 до 5 кГц.

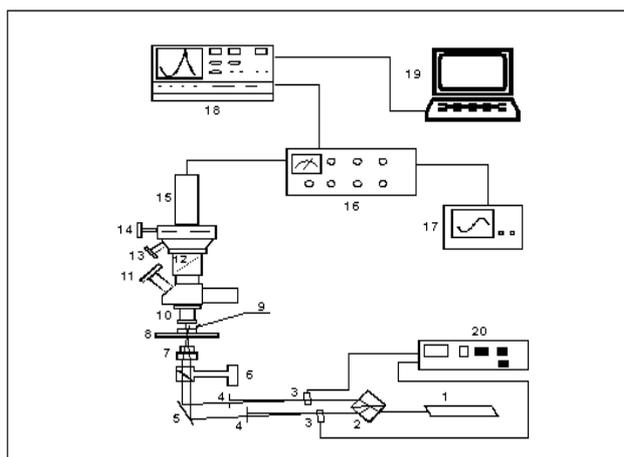


Рис. 1. Схема ЛДМ. 1 – He-Ne лазер (632,8 нм); 2 – делитель пучка; 3 – акусто-оптические ячейки; 4 – точечные диафрагмы; 5 – подстраиваемое зеркало; 6 – осветитель; 7 – фокусирующий объектив; 8 – X-Y-Z-сканирующий столик; 9 – исследуемый объект; 10 – собирающий объектив; 11 – окуляр; 12 – шторка; 13 – окуляр для настройки диафрагмы; 14 – регулируемая точечная диафрагма; 15 – ФЭУ; 16 – усилитель; 17 – осциллоскоп; 18 – спектро-анализатор реального времени; 19 – компьютер; 20 – блок накачки акусто-оптических ячеек.

Пересечение сдвинутых по частоте и сфокусированных зондирующих пучков образует измерительный объем, имеющий в идеальном случае (т.е. без учета искажений зондирующих пучков стенками исследуемой живой клетки или кюветы, в которой она содержится) форму сфероида. Характерные линейные размеры измерительного объема составляют от нескольких единиц до нескольких десятков микрометров и регулируются фокусировкой пучков, выбором угла пересечения между ними и размера точечной диафрагмы, установленной в плоскости изображения микроскопа. Как правило, направление вектора чувствительности измерителя выбирается коллинеарным вектору скорости направленного потока цитоплазмы в клетке так, чтобы величина доплеровского сдвига f_D , определяемая известной формулой

$$f_D = f_M \pm 2n|V| \sin(\alpha/2)/\lambda \quad (1)$$

была максимальной. Здесь, как обычно, $|V|$ – модуль скорости потока, n – средний показатель преломления цитоплазмы клетки (обычно $n \approx 1,37 - 1,40$ в зависимости от типа клетки), α – угол пересечения пучков в воздухе, f_M – частота модуляции или относительный сдвиг частоты между зондирующими пучками, знаки \pm соответствуют тому или иному направлению вектора скорости относительно вектора чувствительности ЛДМ. Следует отметить, что скорости направленного потока цитоплазмы в гигантских клетках харовых водорослей достигают единиц и десятков мкм/с, а в тяжках плазмодия слизевого гриба – десятков и даже сотен мкм/с, что соответствует доплеровским сдвигам частоты порядка единиц, десятков и сотен герц.

Доплеровский сигнал возникает при пересечении измерительного объема и рассеянии зондирующих пучков внутриклеточными органоидами, имеющими коэффициент преломления выше, чем окружающий их цитоплазматический матрикс и характерные размеры порядка десятых долей мкм. Свет, рассеянный в измерительном объеме и прошедший через точечную диафрагму детектируется ФЭУ. Информация о величине и направлении вектора скорости потока содержится в частоте модуляции выходного сигнала ФЭУ. Энергетический спектр этого сигнала содержит так называемый доплеровский пик, расположенный на доплеровской частоте так, например, как показано на рис. 2.

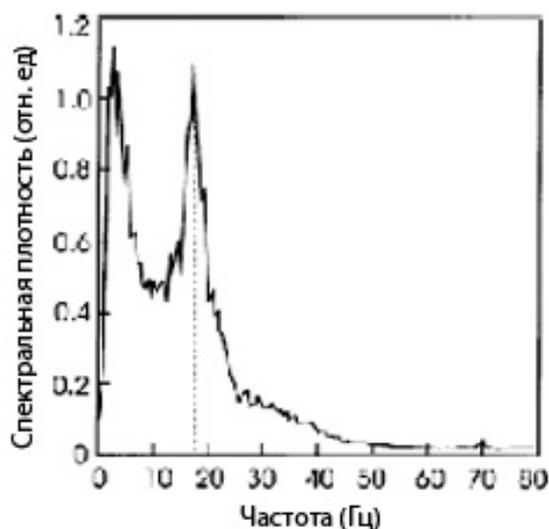


Рис. 2. Типичный вид энергетического спектра сигнала ЛДМ, полученного от клетки харовой водоросли без внесения относительного сдвига частоты между зондирующими пучками. Время измерения 1 минута. Частоте в 1 Гц соответствует скорость 1,22 мкм/с, т.е. положение доплеровского пика соответствует скорости течения цитоплазмы в 21,5 мкм/с.

Регистрируя подобные спектры при различных условиях, можно изучать реакцию клетки на различные внешние воздействия, а также связь механизмов создания движущей силы с другими характеристиками клетки и процессами, протекающими в ней, например генерации потенциала действия на мембране при освещении клетки светом различных длин волн [4].

Структура и строение тяжей плазмодия слизевого гриба *Physarum polycephalum*, представляющего собой одну недифференцированную гигантскую живую клетку, существенно отличаются от структуры и строения клеток харовых водорослей. Они представляют собой толстостенные трубки из вязкоупругой гелеподобной эктоплазмы, внутри которых движется жидкая дисперсная масса зольподобной эндоплазмы. Важно

отметить, что эктоплазма и эндоплазма суть разные фазы протоплазмы, между которыми происходят постоянные взаимопревращения. Часть эндоплазмы затекает в карманы (инвагинации) эктоплазматической стенки, частично превращается в эктоплазму и частично вытекает назад в поток вместе с частью бывшей эктоплазмы.

Как будет описано ниже, движущая сила в данном случае возникает за счет сокращения стенок тяжа, главным образом во фронтальной области, и возникновения градиента давления внутри клетки. Эти сокращения являются проявлениями автоволнового характера амебоидной внутриклеточной подвижности у данного типа клеток и имеют характерный период порядка одной минуты при нормальных условиях. Так же, как и в клетках харовых водорослей, в протоплазме плазмодия содержится множество ядер и митохондрий, играющих роль трассеров потока при доплеровских измерениях. Однако более сложная (и нестационарная!) структура стенок тяжей и их большая относительная толщина приводят к их большей оптической неоднородности. Кроме того имеются разнонаправленные радиальные компоненты скорости вследствие движения части эндоплазмы в инвагинации и обратно.

Это неминуемо сказывается на форме доплеровских спектров: ярко выраженные пики сильно уширяются и становится невозможным говорить о наличии одной характерной скорости потока. Тем не менее, отслеживая временные изменения некоторых параметров регистрируемых спектров, например, их ширину и асимметрию, а также положение на оси частот относительно частоты модуляции, можно судить о временной динамике интенсивности внутриклеточного транспорта. Это позволяет исследовать разнообразные процессы, характеризующие механизмы образования и синхронизации волн, а также типы автоволновой подвижности. В частности, регистрация скорости одновременно в нескольких точках вдоль тяжа позволила обнаружить режим стоячих волн [5]. Исследование температурной зависимости периода сократительной активности клетки и вариация градиента температур относительно различных частей клетки с частотой, отличной от частоты собственной сократительной активности позволили исследовать механизмы синхронизации автоволновой подвижности и сделать выводы о природе синхронизирующего фактора [6]. Измерение скорости внутриклеточных потоков одновременно со стационарными или импульсными световыми воздействиями на разных длинах волн позволило исследовать связь фототаксиса клетки с ее автоколебательной и автоволновой подвижностью [7].

Оптическая доплеровская когерентная томография (ОДКТ)

Новые возможности визуализации пространственно-временной структуры потоков биологических жидкостей в тканях и одиночных живых клетках, в частности, в тяжах плазмодия *Physarum* появились в связи с развитием метода ОДКТ [8]. Суть этого метода состоит в использовании в качестве зондирующих пучков излучения низкокогерентного источника, например, суперлюминесцентного диода и периодического изменения длины опорного плеча интерферометра Майкельсона, в схему которого такой источник включен (см., например, рис. 3).

На этом рисунке в объектном плече для общности показан произвольный капилляр с потоком жидкости любой природы, содержащей рассеивающие частицы. Капилляр расположен под некоторым углом к нормали к оси зондирующего пучка, так что проекция скорости потока жидкости на ось пучка не равна нулю. При когерентном суммировании опорного и рассеянного от объекта пучков света на светочувствительной поверхности фотодиода создается интерференционная картина. Вследствие малой длины когерентности излучения источника ($\Delta l \approx 50$ нм) условие когерентного суммирования выполняется только при равенстве оптических длин плеч интерферометра с точностью до величины $\Delta z \approx 5$ мкм.

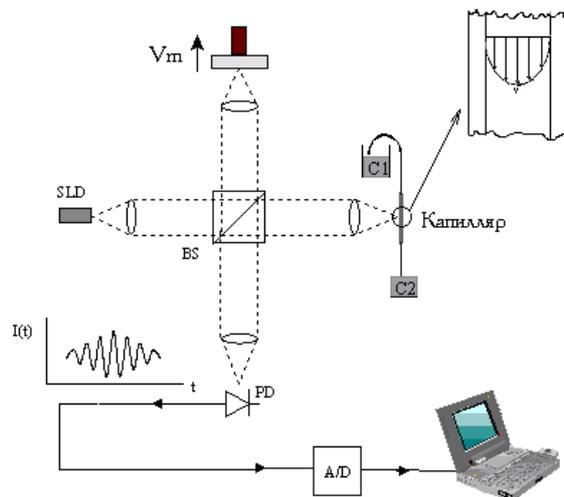


Рис. 3. Упрощенная схема ОДКТ. SLD - суперлюминесцентный диод, BS - делитель пучка, PD – фотодиод, A/D – аналого-цифровой преобразователь, V_m – скорость движения опорного зеркала.

На этом рисунке в объектном плече для общности показан произвольный капилляр с потоком жидкости любой природы, содержащей рассеивающие частицы. Капилляр расположен под некоторым углом к нормали к оси зондирующего пучка, так что проекция скорости потока жидкости на ось пучка не равна нулю. При когерентном суммировании опорного и рассеянного от объекта пучков света на светочувствительной поверхности фотодиода создается интерференционная картина. Вследствие малой длины когерентности излучения источника ($\Delta l \approx 50$ нм) условие когерентного суммирования выполняется только при равенстве оптических длин плеч интерферометра с точностью до величины $\Delta z \approx 5$ мкм. При должной юстировке системы движение опорного зеркала создает условие конструктивной интерференции только для света рассеянного из слоев объекта толщиной $\Delta z/n$, расположенных на изменяющейся глубине. Здесь n , как и ранее – показатель преломления текущей жидкости (цитоплазмы в случае живой клетки). Диапазон достигаемых глубин ограничен сильным затуханием интенсивности рассеянного света, выходящего из объекта, с глубиной и обычно не превышает 1,5 мм, что вполне достаточно для исследования живых клеток [9].

Равномерное движение опорного зеркала приводит к амплитудной модуляции выходного сигнала фотодиода с фиксированной доплеровской частотой, пропорциональной скорости этого движения. Движение рассеивающих частиц в потоке приводит сдвигу этой частоты на величину, пропорциональную проекции вектора скорости этих частиц на ось зондирующего пучка. Измеряя величину и знак этого сдвига, мы можем определить мгновенные значения величины и знака скорости потока и их изменения при продольном сканировании. При этом поперечное разрешение, как и в ЛДМ, определяется шириной перетяжки сфокусированного зондирующего пучка. В результате одного скана опорного зеркала получается один скан исследуемого потока по глубине. Дополнительное сканирование зондирующим пучком в поперечной плоскости позволяет получить двух- и трехмерные картины распределения скоростей. На рис. 4 изображена двумерная картина распределения скоростей течения протоплазмы в тяже плазмодия *Physarum*, полученная без поперечного сканирования [10]. По вертикальной оси отложена оптическая глубина, а по горизонтальной – текущее время. Разными цветами закодированы величины скоростей направленного потока внутри клетки. Таким образом, эта картина отражает внутреннюю динамику автоволнового процесса, протекающего в фиксированном поперечном сечении тяжа, включающего сократительную активность его стенки.

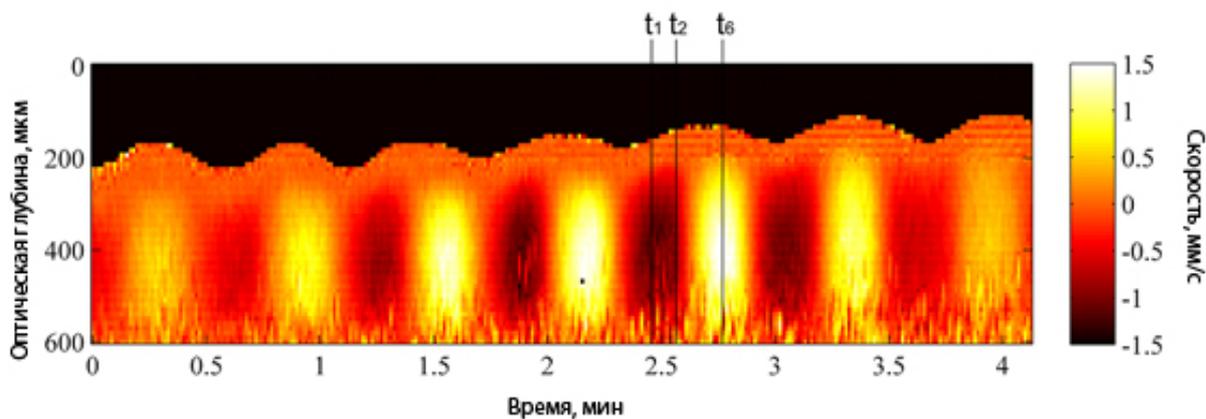


Рис. 4. ОДКТ-изображение временной динамики сократительной активности стенки и скорости направленного потока протоплазмы в фиксированном поперечном сечении тяжа плазмодия *Physarum*.

Из этой картины можно получить динамические характеристики потока на различных глубинах внутри тяжа с высоким разрешением по скорости. Например, на рис. 5, полученном из рис. 4, показана временная зависимость аксиальной скорости (т.е. скорости на оси тяжа) $V_{\max}(t)$. Хорошо видна низкочастотная модуляция колебаний скорости, являющаяся следствием распределенной автоколебательной природы сократительной активности плазмодия *Physarum* [11]. Отметим, что в обзоре [11] представлены достаточно общие математические модели автоволновой подвижности протоплазмы и даны разнообразные результаты анализа моделей, хорошо соответствующие экспериментальным данным.

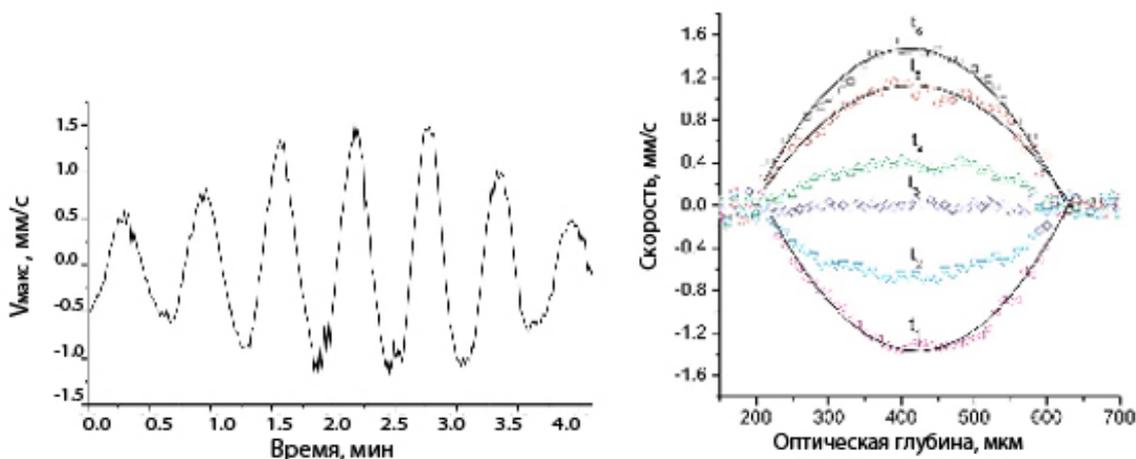


Рис. 5. Временная зависимость локальной скорости движения протоплазмы в центре тяжа (слева).

Рис. 6. Радиальные профили мгновенной скорости движения протоплазмы вдоль тяжа, измеренные в моменты времени t_1, \dots, t_6 , указанные на рис. 4. Сплошные линии соответствуют параболической аппроксимации измеренных зависимостей (справа).

На рис. 6 показаны несколько профилей мгновенной скорости, измеренных в моменты t_1, \dots, t_6 , обозначенные на рис. 4. Из этого рисунка ясно видно, что параболическая аппроксимация хорошо соответствует экспериментальным значениям. Это означает, что для тяжа данного диаметра (300 мкм) в условиях данного эксперимента (агаровая подложка без питательных веществ, температура 23°C и пр.) неньютоновость протоплазмы сказывается незначительно.

Таким образом, можно заключить, что лазерная доплеровская микроскопия и оптическая доплеровская когерентная томография являются эффективными методами исследования внутриклеточной динамики и направленного транспорта.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ НЕЙРОНА

Нервную систему человека составляют десятки миллиардов нейронов, и каждый из них представляет сложное аналого-цифровое вычислительное устройство. В общении между ними огромную роль играет движение компонентов нейроплазмы. Подробно со строением нейрона можно ознакомиться, например в [12]. Здесь важно подчеркнуть, что по коротким отросткам – дендритам, окончания которых достигают другие нейроны и образуют между ними синаптические щели, и по длинным аксонам, достигающим удаленные клетки, происходит непрерывное перемещение визикул-пузырьков с нейромедиаторами, митохондрией и других органелл от ядра клетки к ее периферии, а в сторону ядра перемещаются контейнеры с «отработанными» молекулами. Движение это осуществляют молекулярные «шагающие» моторы - кинезин, миозин V и динеин. Движение происходит вдоль направляющих – тубулиновых микротрубочек (МТ) и актиновых филаментов (рис.7).

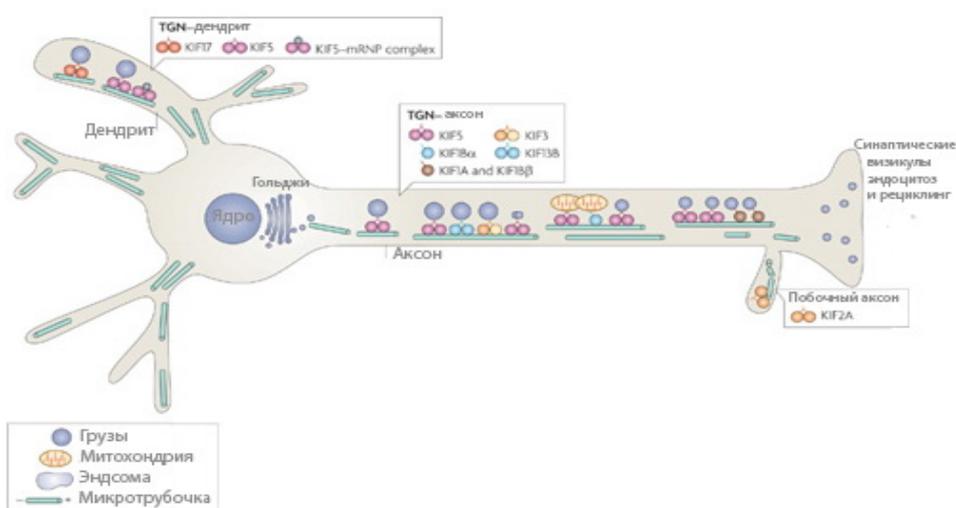


Рис. 7. Зеленым цветом показаны МТ, по которым перемещаются от ядра к синапсам кинезиновые ММ с различными грузами. Средняя скорость доставки грузов составляет около 2 мкм/с [12].

Прежде, чем говорить о том, как устроен кинезин и как он функционирует, скажем о грузах, который он перемещает. Это прежде всего визикулы или «пузырьки» с молекулами нейромедиаторов. Визикулы с нейромедиаторами непрерывно доставляются к синапсам, где прикрепляются вблизи мембраны синаптического окончания. При возбуждении мембраны нервным импульсом содержимое визикулы выплескивается в синаптическую щель. Нейромедиатор, например, ацетилхолин, достигает рецепторов на клетке-мишени, которые стимулируют выработку нервного импульса в этой клетке. Это один из важнейших типов взаимодействия нейронов. В мембране нейрона находятся также специальные молекулярные машины, а точнее сказать, молекулярные ножницы. Они разрезают на части молекулы отработавшего нейромедиатора, эти «осколки» попадают снова в окончание дендрита, запаковываются снова в визикулы и доставляются в обратном направлении по МТ к ядру на «переделку». Помимо нейромедиаторов шагающие моторчики доставляют от ядра к периферии митохондрии, в мембранах которых работают другие замечательные электрические моторы-генераторы - F_0F_1 АТФазы, которые за счет мембранных потенциалов (~ 220 мВ) при своем вращении вырабатывают молекулы АТФ [13, 14]. Сами же мембранные потенциалы вырабатываются за счет процессов окисления глюкозы. АТФ необходима для работы кинезина и других переносчиков, для роста МТ, для удлинения дендритов. Именно этот процесс необходим для жизни нейронов и образования новых связей в мозгу. Всего в организме человека в сутки синтезируется (и расходуется) около 50 кг АТФ. При этом на нервную ткань приходится около 20% этого количества.

Открытие кинезина

Теперь кратко скажем о том, как был открыт кинезин в 1984 году группой исследователей во главе с R.D. Vale [15]. Вот какой абстракт был у этой работы.

«Цитоплазматические нити, отделенные от аксоплазмы аксона гигантского кальмара визуализировали с помощью видео-микроскопии при повышенном контрасте. При этом фиксировалось направленное движение органелл в присутствии АТФ. Все органеллы независимо от размера непрерывно перемещались вдоль изолированной нити со скоростью 2.2 ± 0.2 мкм/с. В неповрежденной аксоплазме, однако, движения больших органелл являются медленными и сальто-мортальными. Эти движения могут отражать сопротивление среды. Характер и величина скорости всех органелл вдоль изолированной транспортной нити позволяют предположить, что имеется единый тип молекулярных движителей (моторов), обеспечивающих быстрый аксональный транспорт. Органеллы могут двигаться и по более, чем одной нити. Это может быть, если у мотора имеется несколько центров связывания с органеллами».

Конечно, авторы могли видеть лишь движение больших «грузов» и, в частности, митохондрий. Типичный фото-кадр представлен на рис. 8 [16, 17].

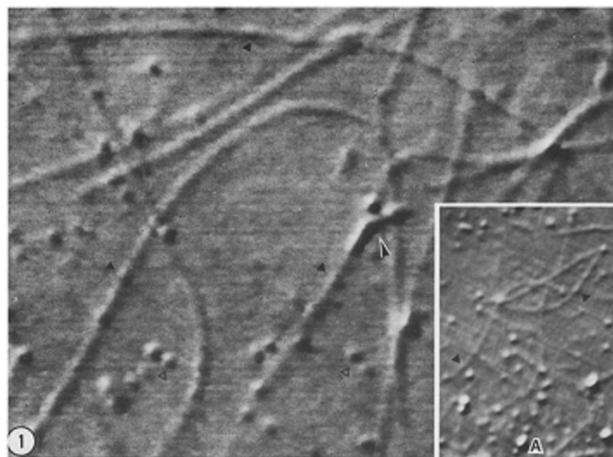


Рис. 8. Типичные области транспорта нитей и связанного с ними органеллами. Несколько небольших и средних везикулярных органелл, обозначены черными треугольниками. Небольшие митохондрии (черный и белый стрелки) контактны к двум нитям; последующие наблюдения показали, что они были прикреплены к обоим. Некоторые стационарные органеллы везикулярно прикрепляются к поверхности стекла (открытые треугольники); пузырьков, взвешенных в среде, вне плоскости фокусировки. Увеличение 11000 х. Врезка транспорта: нити (черные треугольники) прикреплены на поверхности стекла на краю основной аксоплазмы.

Авторы конечно не знали каков он – кинезин. Одна из интересных гипотез, предложенных ими, схематично представлена на рис. 9 (из работы [17]).

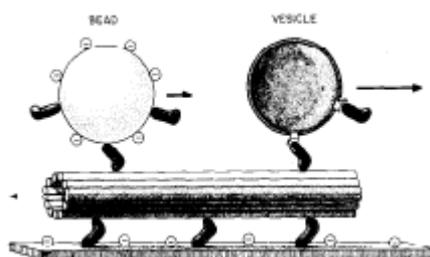


Рис. 9. Гипотетическая схема, показывающая, как «некие» структуры, продвигают везикулы по табулиновым микротрубочкам (МТ), а сами МТ - относительно поверхности подложки. Кстати сказать, так же

«катятся» по актиновым нитям и создают циркулярный поток цитоплазмы в гигантской клетке водоросли *Nitella* сферосомы с миозиновыми «ручками».

Методы исследования кинезина

За последние 30 лет появились сотни работ, посвященных кинезину: его структуре, функционированию, математическим моделям. Безусловно, открытие механизмов действия другого замечательного молекулярного мотора-генератора F_0F_1 АТФазы, за что R.D. Woyle и J. Walker в 1997 получили нобелевскую премию (см., например, обзор [14]), и существенное продвижение в понимании основ акто-миозиновых взаимодействий в мышцах [18] способствовало успехам в исследовании кинезина.

Метод покадровой съемки Vale был усовершенствован как для объектов *in vitro*, так и *in vivo*. При этом в среду вносятся различные флюоресцирующие красители адсорбирующиеся на «грузах». Силу, развиваемую молекулой кинезина, измеряют с помощью «лазерных пинцетов» или, как называют весь комплекс, «интерферометром с оптическим захватом (optical trapping interferometer)» [19]. Движение молекул кинезина, перемещающих груз, наблюдают в хорошие микроскопы. При этом «грузы», например митохондрии в живых клетках, либо окрашивают *in vivo* специальными флюоресцирующими красителями, либо внедряют в них красители генетическими процедурами [20, 21].

Индивидуальные молекулы кинезина без грузов фиксируются методами силовой микроскопии или же электронной микроскопии [22]. Изучаются и записываются траектории не только отдельных кинезинов, но и их отдельных головок. При этом возможно измерять и развиваемые ими усилия [23].

Рост и миграция простейших микроорганизмов исследуются в комплексе с их подвижностью протоплазмы не только, как в случае плазмодия слизевого гриба *Physarum*, но при наблюдении перемещении митохондрий. Так с помощью прижизненного флюоресцентного маркера MTR в известном модельном объекте *Neurospora crassa* показано, что митохондрии перемещаются вдоль гиф (растущих отростков, подобных выростам в нейронах) со скоростью порядка 0.1 мкм/с. Они обеспечивают молекулами АТФ потребности растущего с той же скоростью гифа (рис.10). При этом можно определять влияние на этот процесс мембранных потенциалов и других факторов [24-26].

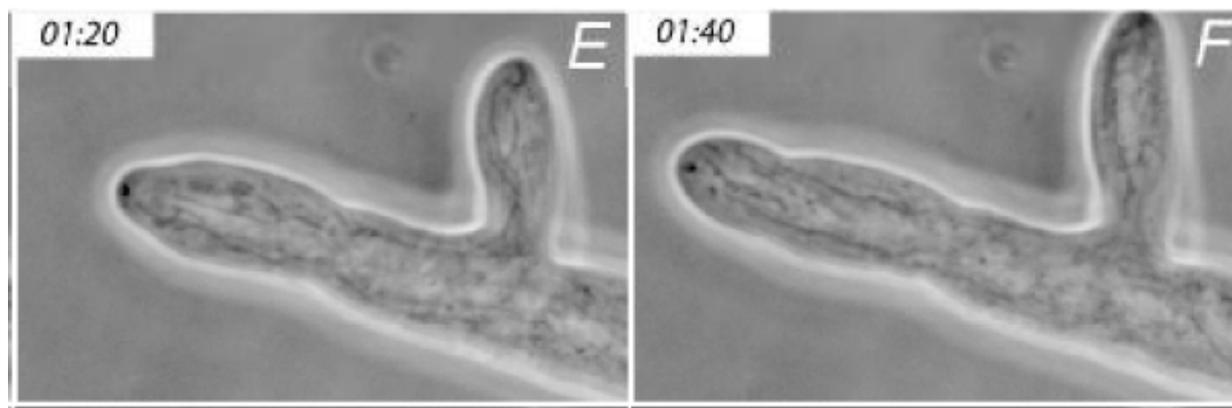


Рис 10. Фотографии гифов *Neurospora crassa*, полученные с интервалом 20 мин. Длина гифа ~ 100 мкм. Видны пучки МТ, по которым движутся митохондрии - черные «ниточки». (Фото любезно предоставлено Т.В. Потаповой).

Подобными же методами исследуются перемещения и других «шагающих» моторов – миозина V и динеина. Подробно со строением молекулярных моторов и их перемещением в вязкой неньютоновой протоплазме можно на лабораторных сайтах R.D. Vale, S.M. Block, G. Oster и J. Walker (см. [15, 27-29]).

Следует еще раз отметить, что развитию оптических экспериментальных методов изучения шагающих ММ во многом способствовали успехи в исследовании вращающихся ММ и, прежде всего, F₁АТФазы (одного из компонентов F₀F₁АТФазы). Обзоры по этому поводу можно найти по ссылкам [14,15, 27-29]. Укажем на важнейшие экспериментальные достижения в этой области.

1. С помощью видеозаписей, сделанных с помощью современных лазерных микроскопов, зафиксированы последовательности шагов вращения в зависимости от стоковых нагрузок на ротор ММ и от концентрации АТФ – источника энергии вращения. При этом время ожидания между шагами так же, как и у шагающих моторов, определяется временем гидролиза АТФ в АЦ и составляет порядка 1 мс.
2. Наблюдая за флуоресцирующими метками, внедренными в различные элементы конструкции ММ, оказалось возможным фиксировать движение этих элементов друг относительно друга.
3. Методами лазерных и магнитных пинцетов научились измерять усилия при движении элементов ММ и фиксировать их в последовательных положениях.
4. С помощью вращающегося магнитного поля заставили ротор ММ, к которому присоединяли магнитные бусинки, вращаться в противоположную сторону. При этом регистрация оптического сигнала в режиме счета фотонов позволяла детектировать вновь синтезированные молекулы АТФ.

Что известно про кинезин ?

Молекула кинезина представляет собой димер, образованный двумя одинаковыми полипептидными цепями. На одной стороне каждой цепи образуется шаровидная голова (ГК) с размерами 7,5 x 4,5 x 4,5 нм, в сочетании с длинным хвостом. Хвосты двух мономерных цепей, сплетены вместе и опираются в разных направлениях на ГК, образуя "вилку", которая взаимодействует с тубулиновой микротрубочкой (МТ), вдоль которой движется кинезин. Один шаг кинезина приводит к его смещению на расстояние около 8 нм, что в точности соответствует размеру двух мономерных глобул тубулина, из которых построены МТ. Кинезин обычно за одну секунду совершает 100 шагов (800 нм) до полного отрыва от МТ [30, 31]. Заметим, что на МТ имеется 11 независимых «путей», по которым могут в параллель передвигаться молекулы кинезина с грузом и при этом преодолевать стоково сопротивление (рис.11).

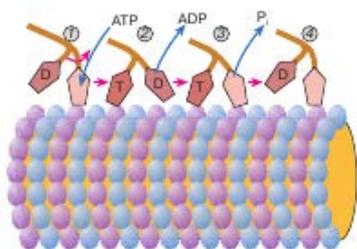


Рис. 11. Схема «шагания» кинезина [30, 31].

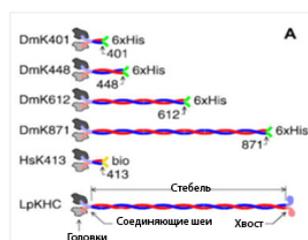


Рис. 12. Схемы строения различных кинезинов [32].

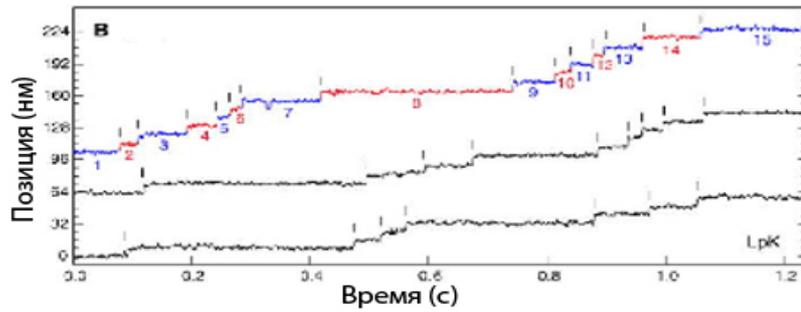


Рис. 13. Запись с высоким разрешением движения кинезина LpKвр из кальмара. Вертикальные линии показывают шаги кинезина. Быстрые и медленные фазы показаны синим и красным цветом, соответствующие интервалы «ожидания» пронумерованы [32].

Известно строение многих кинезинов. Например, в организме мыши насчитывается до 40 типов молекул кинезина (рис. 12 из работы [32]). В открытом доступе существует несколько мультфильмов (см. сайты R.D. Vale and S.M. Block [15, 27]). Ниже представлена последовательность кадров из видеофильма, сделанного R.D. Vale (рис.14).

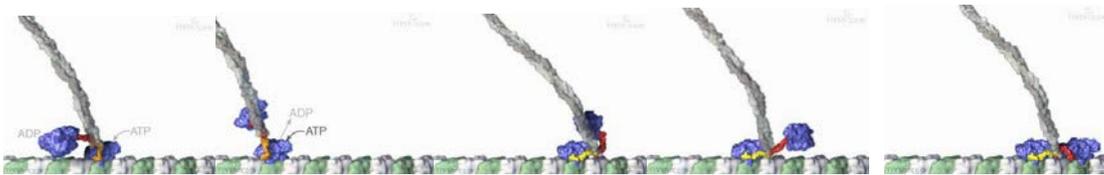


Рис. 14. Последовательность шагов кинезина по МТ с указанием состояния АЦ и его ГК.

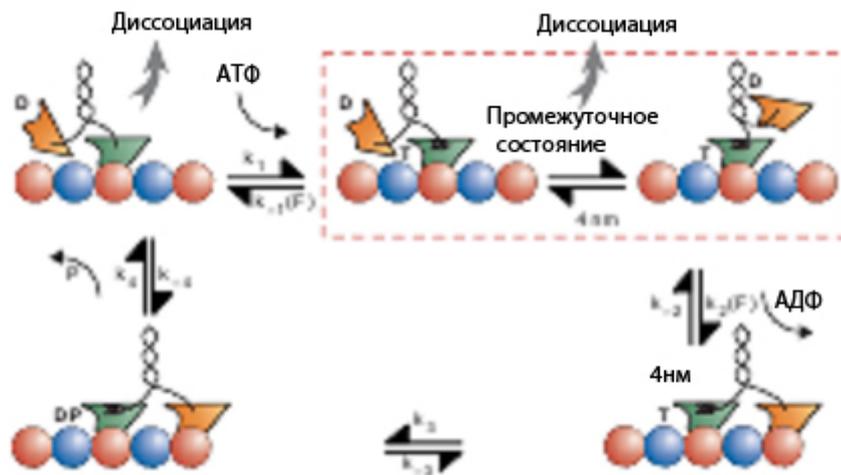


Рис. 15. Механико-химический цикл кинезина. Две ГК (оранжевая и зеленая) связаны между собой соединяющими «шеями» и образуют «стебель», к которому может прикрепляться груз. Обозначения внутри АЦ: E – АТФ, D – АДФ, P – фосфат. Жесткое связывание ГК с МТ происходит, когда АЦ ГК пуст. При вхождении молекулы АТФ в АЦ в передней ГК развивается момент, который приводит к перебросу задней ГК вперед на 8 нм. Затем молекула АТФ в результате гидролиза разваливается в АЦ, (АТФ→АДФ + Р), Р покидает АЦ и процесс повторяется [33].

На рис. 16 [34] приведена современная схема событий в ГК при ее взаимодействии с МТ и молекулами АТФ и АДФ, приводящих к рождению силового момента, продвигающего «стебель» с грузом. На нем представлен поперечный разрез МТ и строение ГК. + направление вперед по движению вдоль МТ. Угол β (наклон), характеризует раскрытие АЦ, и меняется от ~ 30 град до 0 град при сорбции АТФ в кармане АЦ.

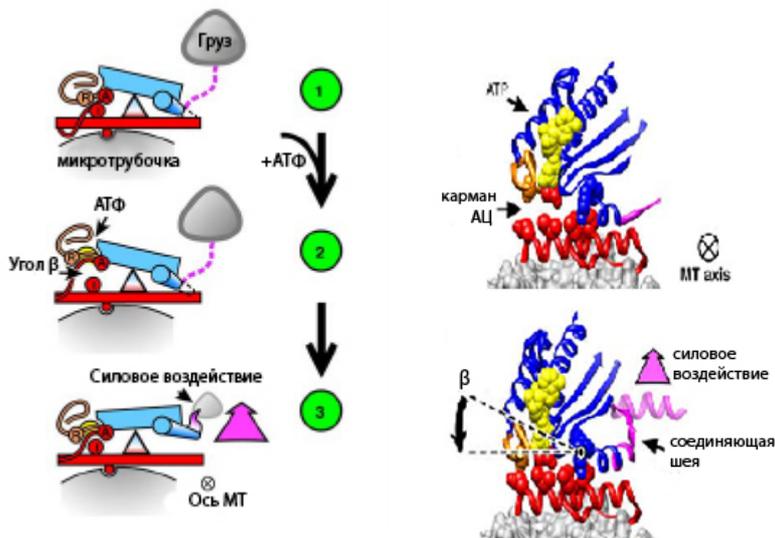


Рис. 16. На рисунке справа показана «молекулярная структура головки». Она соответствует схемам с «качелями», показанными слева. Стрелками показано изменение угла β . Качели передают усилие на рычаг, который продвигает груз, закрепленный на «шее» вдоль МТ но направлению к ее + концу. Важно, что качели прикреплены к МТ. После развала АТФ и при «дергании» задней головки кинезина передней головкой этот контакт разрывается. Головка отскакивает, протаскивается вперед вместе с грузом и затем, находясь в диффузионном движении, прикрепляется впереди работающей головки в следующей потенциальной яме на МТ.

Ниже на рис. 17 [35], поясняющем предыдущие рисунки, показано «шагание» кинезина по МТ. Угол α , описывающий положение «шей», меняется на 180 град, он пропорционален углу наклона элемента CNB или углу β на рис. 16.

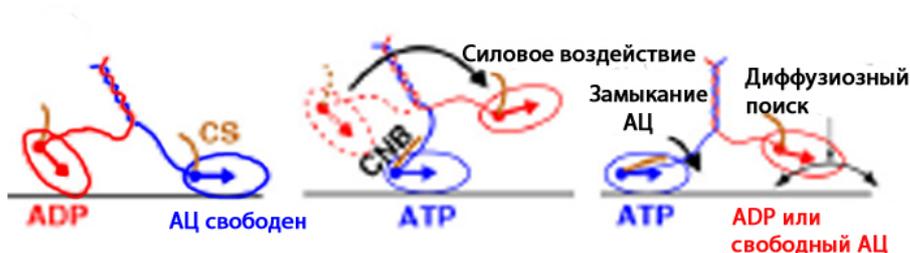


Рис 17. CNB - структурный элемент, соответствующий плечу «качелей». Слева: выпуск P_i в задней голове приводит ее либо к диссоциации либо, быть может, к ослаблению связывания с МТ. В середине: АТФ связывается с ведущей головой и обеспечивает рабочий ход через формирование CNB, при этом способствует отрыванию задней ГЛ от МТ и двигает ее вперед. Справа: оторванная «задняя» голова движется вместе с грузом и диффузно ищет свой МТ сайт связывания, затем в слабо связанном или подвижном состоянии, «ждет» пока АДФ-выйдет из АЦ. Таким образом угол α меняется в пределах от -90 град до $+90$ град. Теперь АЦ готов принять АТФ и начинается новый цикл.

Описанные процессы соответствуют изменению положений желтой и красной «шей» на кадрах из кинофильма R.D. Vale (рис. 14), которые меняются местами и проворачиваются

на 180 градусов. Ниже на рис. 18 показана траектория шарнира на веерообразной поверхности, к которому прикреплен «ствол» с грузом.

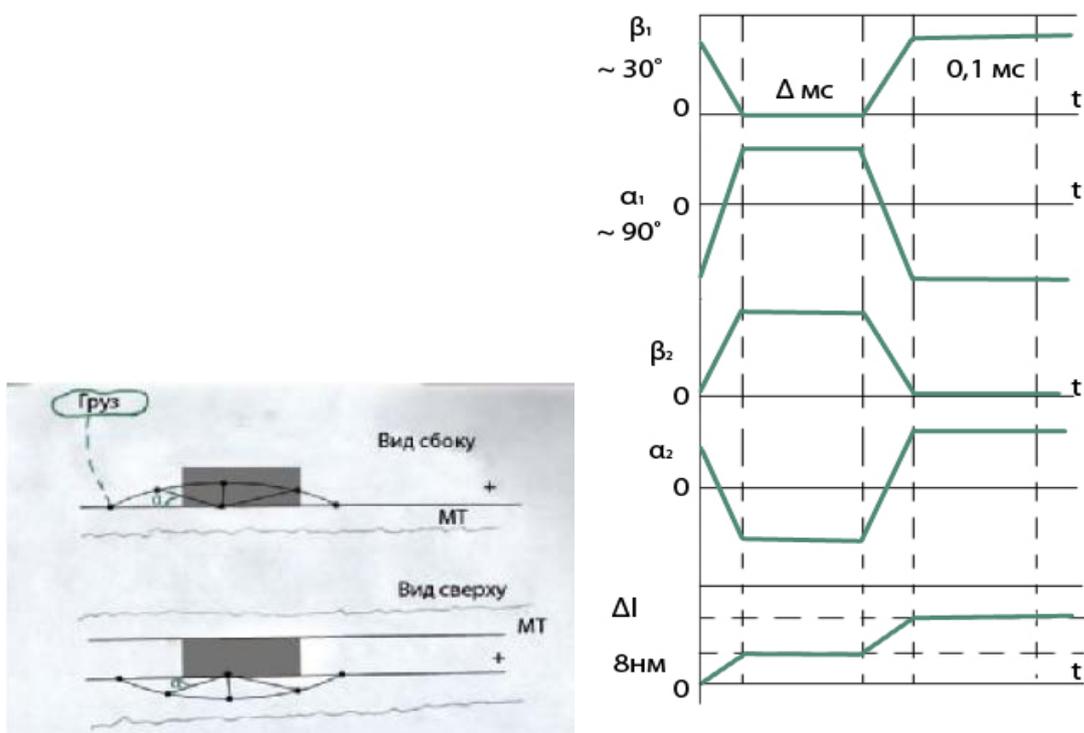


Рис. 18. Слева показана траектория шарнира на конце «связывающей шеи», к которому прикреплен «ствол» с грузом. Вращение осуществляется в результате воздействия на связывающую шею системы рычагов при закрытии угла β . Карман АЦ закрывается в результате сорбции молекулы АТФ. При этом угол β меняется от 30 град до 0. Соответственно, угол α меняется от -180 град до +180 град. Траектория шарнира располагается на веерообразной поверхности. Справа показана качественная схема изменения углов β_1 , β_2 , α_1 , α_2 и смещения груза вдоль МТ $\Delta l = 8$ нм. Заметим, что плечо момента, который продвигает груз, равно $\Delta l/2 = 4$ нм.

В работе [36] показано расположение «потенциальных ям» на МТ, минимумы которых находятся друг от друга на расстоянии 8 нм, в которых связывается ГК. Глубина «ям» составляет 30 ккал/моль или 12 кТ, т.е. нужна значительная часть от энергии АТФ на «выдергивание» ГК из ямы.

Оценка энергии, необходимой для преодоления стоковского сопротивления при «шагании» кинезина

Будем считать, что с момента открытия угла β_2 и выдергивания ГК-2 из потенциальной ямы в течение дальнейшего проворота шеи с грузом вплоть до прикрепления ГК-2 впереди ГК-1, действующий момент при закрывании β_1 все тот же, но коэффициенты трения (сопротивления) разные. Далее мы будем учитывать то обстоятельство, что момент, развиваемый при сорбции АТФ и закрытии угла β примерно в два раза больше момента, изменяющего угол α и продвижение груза. Ведь «силовой момент закрытия β_1 » должен еще вызвать открытие β_2 в ГК-2 и выдергивание ее из потенциальной ямы МТ.

Из эксперимента известно, что только половину энергии АТФ кинезин тратит на продвижение груза. Остальная энергия тратится на «выдергивания» задней ГК (второго «башмака»), перетаскивание башмака вперед и т.д. Поэтому мы выбираем соответствующие оценки для моментов. Еще раз: мы считаем, что момент $M(\beta)$ равен моменту $M(\alpha) +$ Момент выдергивания, а сравнительно небольшой момент силы Стокса, действующий на перетаскиваемый задний башмак, суммируется с моментом, преодолевающим силу Стокса груза. Сделаем соответствующие оценки.

При гидролизе АТФ \rightarrow АДФ + P⁻ освобождается около 40 кДж/моль энергии, или на одну молекулу АТФ ~ 15 кТ. При протаскивании груза ведущей ГК на 8 нм при силе 5 пН совершается работа $4 \cdot 10^{-20}$ Дж (24 кДж/моль ~ 20 кТ). Значит для «полезного шага» расходуется лишь половина энергии АТФ. Куда тратится вторая половина?

а) Потери на перетаскивание задней ГК.

Будем считать, что груз имеет радиус 0,1 мкм, ГК имеет характерный «радиус» 3 нм = $3 \cdot 10^{-3}$ мкм. Значит ее радиус меньше на два порядка, чем радиус груза. Поэтому работа по перетаскиванию задней, отделившейся от МТ, ГК много меньше работы по перетаскиванию груза. По всей видимости, почти все дополнительные усилия передней ГК уходят на отрыв задней головки от МТ.

б) Оценим время нарастания ступени одного шага кинезина (или перетаскивания груза на расстояние $L = 8$ нм). Пусть радиус груза $r = 0,1$ мкм. По формуле Стокса

$$F = 6\pi r(dV/dt)\eta \quad (2)$$

($F \sim 6$ пН, $r = 0,1$ мкм, $\eta = 20,10^{-3}$ Нс/м² - протоплазма имеет вязкость в 20 раз больше, чем вода, τ^* – время шага) получаем из равенства: $F\tau^* = 6\pi\eta L$. Значит, $\tau^* \sim 50 \cdot 10^{-6}$ с. Если r больше, то и τ^* больше и наоборот, если $r = 0,01$ мкм, то $\tau^* = 5 \cdot 10^{-6}$ с – меньше. Если «плато» или ширина ступени 1 мс, то время нарастания ступени 0,05 от длительности ступеньки.

в) Теперь оценим значение размерного параметра ζ , учитывающего вязкое сопротивление среды и геометрические параметры рассматриваемой системы, используя сделанную выше оценку для времени уменьшения угла β от 30 град до 0 град.

Мы считаем, что для момента, который продвигает груз, плечо силы (или «шея» (см. рис. 18) равно $L/2 = 4$ нм. Поэтому

$$\zeta d\alpha = F(L/2) dt. \quad (3)$$

Если β уменьшился на $\pi/6$, то α увеличивается на π и $\zeta \pi = F(L/2) \tau^*$. Отсюда и оцениваем размерную величину $\zeta = F L (1/2\pi) \tau^*$.

Математическая модель шагания кинезина

Мы строим систему динамических уравнений для взаимодействия двух ГК по аналогии с системой, описывающей вращение ротора в молекулярном моторе F₁АТФазы. Ротор вращается под действием моментов, которые по очереди создаются тремя идентичными β -субглобулами при сорбции в их АЦ молекул АТФ [13, 14, 37]. Связь между тремя β -субглобулами создается через ротор. Моменты в ГК и их упругие деформации создаются также по очереди при сорбции в их АЦ молекул АТФ. Силовая связь между ГК создается через соединяющие их шейки, и при этом возникает (через стебель) момент, продвигающий груз вдоль МТ (см. рис. 18). Система уравнений, описывающая шаг кинезина (угол β_1 закрывается, угол β_2 открывается) выглядит следующим образом:

$$\begin{aligned} \zeta \dot{\beta}_1 &= M(\beta_1) - \tau_1 + \varepsilon \dot{\beta}_2 & \zeta \dot{\beta}_2 &= M(\beta_2) - \tau_2 - \varepsilon \dot{\beta}_1 \\ \mu \dot{\tau}_1 &= k\beta_1 - \tau_1 & \mu \dot{\tau}_2 &= k\beta_2 - \tau_2 \end{aligned} \quad (4)$$

Здесь $\beta_1(t)$ и $\beta_2(t)$ – углы, описывающие закрытие карманов АЦ ГК при сорбции в них молекул АТФ, $\tau_1(t)$ и $\tau_2(t)$ – упругие натяжения, возникающие при деформации ГК. $\tau_1(t)$ и $\tau_2(t)$ запаздывают относительно упругих сил $k\beta_1$ и $k\beta_2$ из-за процессов гидролиза (развала) АТФ в АЦ. $M(\beta_1)$ и $M(\beta_2)$ – моменты, создающиеся в деформирующихся карманах АЦ при сорбции в них АТФ. Заметим, что углы β пропорциональны углам α (см. рис.7). Значения ζ

определяются стоковым сопротивлением при перемещении груза, величина μ определяется временем гидролиза АТФ, а k - упругостью ГК.

Момент, определяемый силами сорбции молекул АТФ или продуктами гидролиза АДФ и неорганического фосфата Р в АЦ ГК, задается формулой

$$M(\beta) = M_0 \left(\beta - \frac{1}{n} \beta^n \right), \quad n = 3, 5, 7 \dots \quad (5)$$

Форма $M(\beta)$ приближается к N-образной при больших n . Соответствующая система уравнений в безразмерных переменных имеет вид:

$$\begin{aligned} \hat{\zeta} \dot{\hat{\beta}}_1 &= \overline{M}(\beta_1) - \hat{\tau}_1 + \hat{\varepsilon} \dot{\hat{\beta}}_2 & \hat{\zeta} \dot{\hat{\beta}}_2 &= \overline{M}(\beta_2) - \hat{\tau}_2 - \hat{\varepsilon} \dot{\hat{\beta}}_1 \\ \hat{\tau}_1 &= \hat{k} \hat{\beta}_1 - \hat{\tau}_1 & \hat{\tau}_2 &= \hat{k} \hat{\beta}_2 - \hat{\tau}_2 \end{aligned}, \quad (6)$$

где безразмерные переменные заданы выражениями:

$$\hat{t} = \frac{t}{\mu}, \quad \hat{\zeta} = \frac{\zeta}{M_0 \mu}, \quad \hat{\tau} = \frac{\tau}{M_0}, \quad \hat{k} = \frac{k}{M_0}, \quad \hat{\varepsilon} = \frac{\varepsilon}{M_0 \mu}. \quad (7)$$

Возьмем для примера численные значения коэффициентов: $\mu = 0,5$ мс, $M_0 = 80$ пН нм, $\hat{\zeta} = 0,05$, $\hat{k} = 0,7$, $\hat{\varepsilon} = 0,015$, близкие к модели F_1 АТФазы [37]. Пример решения системы (6) приводится ниже.

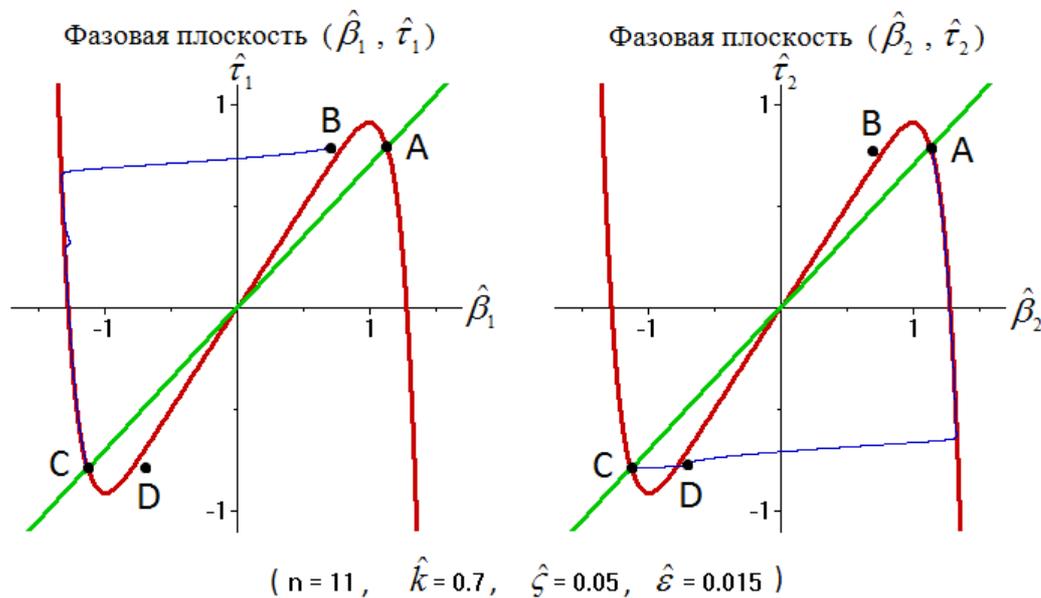


Рис. 19. Фазовые плоскости $(\hat{\beta}, \hat{\tau})$ для передней (слева) и задней (справа) ГК. Для закрытия угла $\hat{\beta}_1$ необходимо, чтобы в АЦ сорбировалась молекула АТФ. Тогда возникают начальные условия в точке В и фазовая траектория идет от В до С (рисунок справа). При открытии угла $\hat{\beta}_2$ нужно преодолеть порог (от С до D), чему может способствовать момент, передаваемый от передней ГК.

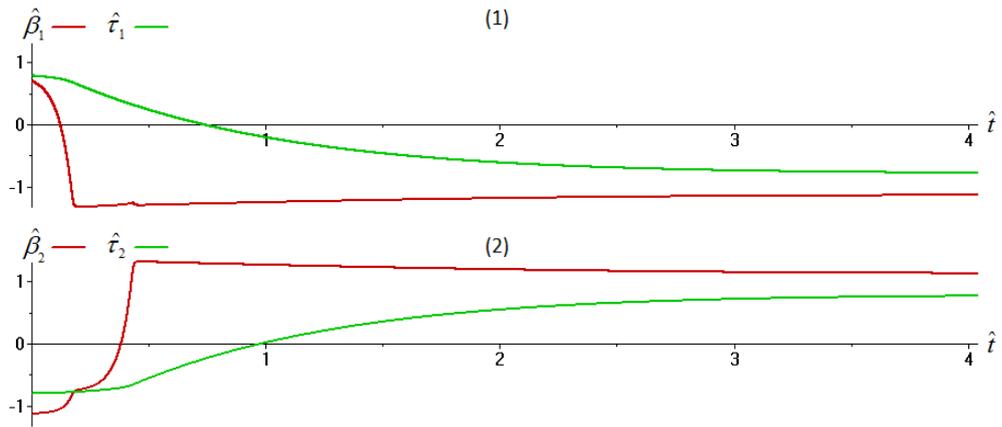


Рис. 20. Траектории углов и напряжений, соответствующие одному шагу кинезина, показанному на фазовых плоскостях рис. 19. Скачок в траектории $\hat{\beta}_2$ соответствует переходу от С до D, связанному с отделением ГК -2 от МТ.

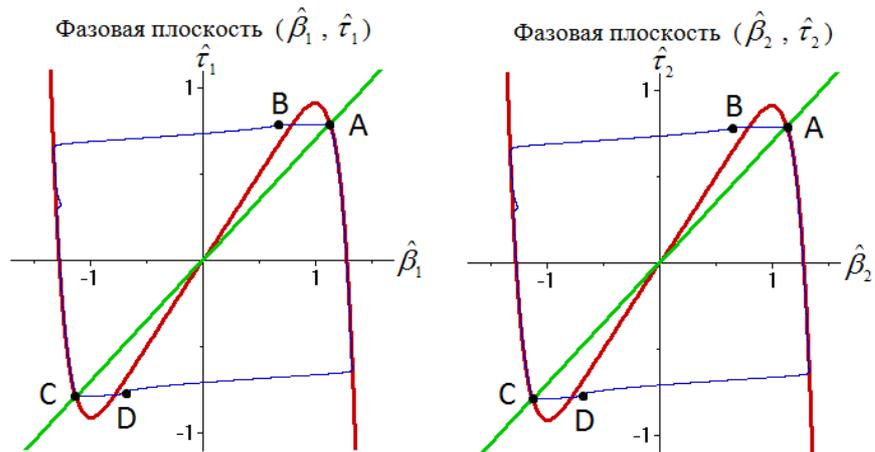


Рис. 21 Траектории на фазовых плоскостях ГК-1 и ГК-2 в случае избытка АТФ с среде. Посадка АТФ в свободный АЦ происходит практически мгновенно. И процесс, соответствующий шаганию кинезина по МТ происходит строго периодически.

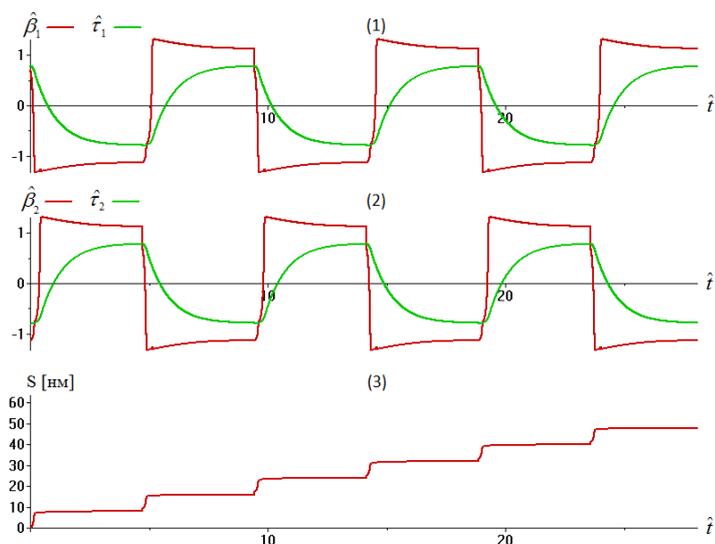


Рис 22. Периодические (в противофазе) изменения углов $\hat{\beta}_1$ и $\hat{\beta}_2$ и соответствующие изменения внутренних напряжений $\hat{\tau}_1$ и $\hat{\tau}_2$. S – продвижение кинезина вдоль МТ.

Окончим наш краткий анализ полученных решений следующей аналогией. «Шагание» кинезина с грузом по МТ подобно шаганию человека в акваланге по илистому дну водоема. Человек держит в вытянутой руке «груз» - баллон с водой. Так как и груз, и человека в воде можно считать невесомыми, то всю работу человек совершает против сил Стокса и на выдергивание задней ноги из ила. В какой пропорции находятся энергии, затраченные на передвижение груза и на «выдергивание» ноги зависит от конкретных параметров системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ

1. Направленное движение протоплазмы в клетках, миграция клеток и перемещение элементов компартмента клеток являются следствием функционирования различных ММ, работающих за счет энергии, запасенной в молекулах АТФ.
2. Так или иначе, движения исполнительных элементов или блоков ММ являются периодическими, характерные времена этих движений составляют более, чем 10^{-4} с.
3. При таких скоростях взаимодействие ММ и протоплазмы определяются стоксовыми закономерностями. При этом протоплазму в общем случае следует рассматривать, как неньютонову жидкость.
4. Внутриклеточные потоки в амебоидных клетках с учетом их взаимодействия с активными стенками имеют автоволновой характер. Механизм взаимодействия олигомеров миозина и актиновых структур в этих клетках все еще остается непонятым в связи с трудностью визуализации этих структур в нестационарных условиях (т.е. потока и сократительной активности стенок).
5. Перемещение различных «грузов» осуществляется молекулярными моторами: кинезином, миозином V, динеином, «шагающими» по «рельсам» - МТ или актиновым филаментам.
6. Предложенные авторами математические модели кинезина хорошо описывают известные эксперименты и легко подстраиваются к различным изменениям реальных параметров.
7. В мировой литературе описаны самые современные оптические методы, применяемые в исследованиях ММ. В докладе приводятся интересные примеры применения этих методов.
8. Ближайшие планы работы авторов с моделями ММ следующие.
 - а) Построить более подробные модели взаимодействия ГК и МТ, в частности выяснить влияние «направленности» МТ на процесс связывания ГК и МТ.
 - б) Построить модель «шагания» миозина V по актиновому филаменту.
 - в) Исследовать стохастическую динамику кинезина. При этом необходимо учитывать шумы разной природы. Прежде всего это шумы, связанные с нерегулярной посадкой молекул АТФ в АЦ при малых концентрациях АТФ в среде. Затем тепловые шумы, которые всегда действуют в диссипативных системах. Наконец, мультипликативные шумы, связанные с разбросом времен гидролиза АТФ в АЦ, что приводит к флюктуациям коэффициента μ от цикла к циклу (или от шага к шагу).

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

ММ – молекулярный мотор
ГК - головка кинезина
МТ - тубулиновая микротрубочка
АЦ – активный центр
АТФ аденозинтрифосфорная кислота
 F_0F_1 АТФаза – АТФ-синтаза
ЛДМ – лазерный доплеровский микроскоп
ОДКТ – оптическая доплеровская когерентная томография
 V - скорость потока
 f_D - доплеровский сдвиг
 n – показатель преломления
 f_M – частота модуляции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят профессора А.Н. Тихонова и ведущего научного сотрудника Т.В. Потапову за полезное обсуждение и предоставленные материалы, А.М. Романовскую и А.В. Трифоненкова за помощь в расчетах и в работе над иллюстрациями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Ринкевичюс Б.С.** Лазерная диагностика потоков, М.: Издательство МЭИ, 1990. 287 с.
2. **Приезжев А.В., Романовский Ю.М.** Лазерная доплеровская спектроскопия и ее применение в биологии // Квантовая электроника. 1978. Т. 5. № 10. С. 2237-2242.
3. **Priezzhev A.V., Romanovsky Y.M. and Cherniaeva E.B.** Laser Doppler spectroscopy of living cells and models of intracellular motility // Laser Scattering Spectroscopy of Biological Objects, Edited by J. Stepanek et al. Elsevier. Amsterdam etc. 1987. P. 503-530.
4. **Черняева. Е.Б.** Нестационарные режимы подвижности протоплазмы в клетках харовых водорослей. Дисс. канд. физ.-мат. наук, М.: МГУ, 1984.
5. **Ермаков В.Г., Приезжев А.В.** Волновые режимы сократительной активности в тяжках плазмодия миксомицета *Physarum* и их связь с переносом протоплазмы. // Биофизика. 1984. Т. 29. С. 106 -112.
6. **Колинько В.Г.** Автоколебательная активность плазмодия миксомицета при нестационарных температурных воздействиях. Дисс. канд. физ.-мат. наук, М.: МГУ, 1985.
7. **Порошина М.Ю.** Фоторецепция и автоколебательная подвижность живой клетки. Дисс. канд. физ.-мат. наук, М.: МГУ, 1989.
8. **Peiponen K.-E., Myllyla R., Priezzhev A.V.** Optical Measurement Techniques. Innovations for industry and the Life Sciences. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 2009. 155 p.
9. **Быков А.В., Приезжев А.В., Лаури Я., Мюллюля Р.** Визуализация колебательной динамики цитоплазмы в живой клетке методом оптической когерентной доплеровской томографии на примере плазмодия миксомицета *Physarum* // Квантовая электроника. 2009. Т. 39, № 4. С. 382-384.
10. **Vykov A.V., Priezzhev A.V., J. Lauri, and Myllyla R.** Doppler OCT imaging of cytoplasm shuttle flow in *Physarum polycephalum* // J. Biophotonics. 2009. 2(8-9). P. 540–547.

11. Романовский Ю.М., Теплов В.А. Физические основы клеточного движения. Механизмы самоорганизации амебодной подвижности // УФН. 1995. 165. С. 555–578.
12. Hirokawa N., Noda Y., Tanaka Y., Niwa Sh. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2009. 10. P. 682-696.
13. Xing J., Liao J.-C, and Oster G. Making ATP // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. 102. P. 16539-16546.
14. Романовский Ю.М., Тихонов А.Н. Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-синтаза — вращающийся молекулярный мотор // УФН. 2010. 180. С. 931–956.
15. <http://valelab.ucsf.edu/> R.D. VALE LAB.
16. Schnapp B.J., Vale R.D., Sheetz M.P. and Reese T.S. Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles // Cell. 1985. 40. P. 455-462.
17. Vale R.D., Schnapp B.J., Reese T.S. and Sheetz M.P. Organelle, bead and microtubule translocations promoted by soluble factors form the squid giant axon // Cell. 1985. 40. P. 559-569.
18. Кубасова Н.А., Цатурян А.К. Молекулярный механизм работы актин-миозинового мотора в мышце // УБН. 2011. 51. С. 233-282.
19. Cappelletto C., Badoual M., Ott A., Prost J., Busoni L. Kinesin motion in the absence of external forces characterized by interference total internal reflection microscopy // Phys. Rev. E. 2003. 68. 021907.
20. Svoboda K., Block S.M. Biological applications of optical forces // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1994. 23. P. 247-285.
21. Svoboda K., Schmidt C.F., Schnapp B.J., Block S.M. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry // Nature. 1993. 365. P.721-727.
22. Schaap I.A.T., Carrasco C., de Pablo P.J., Schmidt Ch.F. Kinesin walks the line: Single motors observed by atomic force microscopy // Biophys. J. 2011. 100. P. 2450–2456.
23. Yildiz A., Tomishige M., Gennerich A., Vale R.D. Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules // Cell. 2008. V. 134. P. 1030–1041.
24. Crevel I., Carter N., Schliwa M., Cross R. Coupled chemical and mechanical reaction steps in a processive *Neurospora* kinesin // The EMBO J. 1999. 18. P. 5863-5872.
25. Потапова Т.В., Бойцова Л.Ю., Голышев С.А., Попинако А.В. Динамика митохондрий *Neurospora crassa* при верхушечном росте // Биол. мембраны. 2011. 28. С. 345-353.
26. Потапова Т.В., Голышев С.А. О поведении митохондрий в растущей гифе гриба *Neurospora crassa* // Математика. Компьютер. Образование: Сб. научных трудов. Под ред. Г.Ю. Ризниченко: М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». 2011. С. 214-229.
27. http://stanford.edu/group/block_lab/ S.M. BLOCK LAB.
28. <http://www.cnr.berkeley.edu/~goster/home.html> G. OSTER LAB.
29. <http://www.biosci.missouri.edu/Walker/> J. WALKER LAB.
30. Тихонов А.Н. Молекулярные моторы. Часть 1. Вращающиеся моторы // Соровский образовательный журнал. 1999. № 6. С. 8-16.
31. Тихонов А.Н. Молекулярные моторы. Часть 2. Молекулярные основы биологической подвижности // Соровский образовательный журнал. 1999. № 6. С.17-24.
32. Asbury C.L., Fehr A.N., Block S.M. Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism // Science. 2003. 302. P. 2130-2134.
33. Schnitzer, M.J., Visscher, K. and Block, S.M. Mechanism of force production by single kinesin motors // Nature Cell Biology. 2000. 2. pp. 718-723.
34. Sindelar C.V., Downing K.H. An atomic-level mechanism for activation of the kinesin molecular motor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. 107. P. 4111–4116.

35. Hwang W., Lang M.J., and Karplus M. Force generation in kinesin hinges on cover-neck bundle formation // Structure. 2008. 16. P. 62–71.
36. Sept T D., Backer N.A., Mccammon J.A. The physical basis of microtubule structure and stability // Protein Science. 2003. 12. P. 2257–2261.
37. Карговский А.В., Погребная А.Ф., Романовский Ю.М., Тихонов А.Н. F₁ATФаза как динамическая система // Динамические модели процессов в клетках и субклеточных структурах. Под ред. Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубина: М.-Ижевск: Инст. компьютерных исследований. 2010. С. 69-98.

Yu.M.Romanovsky ¹, A.V.Kargovsky ¹, A.V. Priezzhev ¹, V.P.Trifonenkov ²

¹Lomonosov Moscow State University, Russia,
119992, GSP-2, Moscow, Leninskiye Gory, Physics Department,
E-mail: yuromanovsky@yandex.ru

²National Research Nuclear University "Moscow Engineering Physics Institute", Russia,
115409, Moscow, Kashirskoye sh., 31, E-mail: snuclear@mail.ru

INTRACELLULAR AUTOWAVE HYDRODYNAMICS AND MOLECULAR MOTORS

Live cells and intracellular structures and components are in constant motion. Their movement in space is always associated with complex auto-wave hydrodynamics of protoplasm. Corresponding mathematical models were constructed for the giant cells of green Charcean algae and the plasmodium of slime mold Physarum. The microflows of protoplasm in these giant cells are supported by the work of molecular motors (MM) operating on the basis of actin-myosin interactions. However, in the protoplasm of cells of smaller sizes, such as neurons, continuous directional transport of organelles also takes place. It is sustained with the help of MM, operating on the basis of the interaction of such protein macromolecules as kinesin and myosin V.

In this regard, a general picture of transport phenomena in neurons is presented. It should be emphasized that both the protoplasmic microflows in live cells and the dynamics MM were studied to a large extent using a variety of laser and optical methods: Doppler microscopy, micro video imaging, laser tweezers and magnetic traps of different designs, and methods of recording various optical markers associated with moving fragments of MM. In this paper, we shall overview the optical techniques for studying both the protoplasmic streaming and the organelle transport in neurons. A detailed description of kinesin functioning will be given and relevant new mathematical models of its molecular dynamics will be proposed.

LIVE CELLS, PROTOPLASMIC FLOWS, MOLECULAR MOTORS, OPTICAL MEASUREMENTS