

На правах рукописи

ЕФРЕМОВ

Артем Константинович

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КИНЕТОХОРОВ  
ХРОМОСОМ С МИКРОТРУБОЧКАМИ

03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва 2008

Работа выполнена в Государственном учреждении  
Гематологический Научный Центр Российской Академии Медицинских Наук.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор  
Фазои́л Ино́ятович Атауллаханов

Официальные оппоненты – доктор биологических наук, профессор  
Иван Андреевич Воробьев

доктор физико-математических наук, доцент  
Вавилин Василий Александрович

Ведущая организация – институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Защита состоится «22» мая 2008г. в 18:00 часов  
на заседании диссертационного совета Д 501.002.11 при Московском государственном уни-  
верситете имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, МГУ имени  
М.В.Ломоносова, физический факультет, аудитория 5-19.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке  
физического факультета МГУ им. Ломоносова

Автореферат разослан «22» апреля 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

доктор физико-математических наук, доцент

Хомутов Г.Б.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Микротрубочки – биополимеры цитоскелета, играющие важную роль в жизни клетки. Они активно участвуют в поддержании формы клетки и транспортной системе. Но самая важная функция микротрубочек – распределение точных копий генетического материала по дочерним клеткам во время деления клетки – митоза. Для решения этой задачи природа в течение эволюции создала специальный белковый комплекс, собирающийся на центромерном участке каждой хроматиды, – кинетохор. За него во время митоза могут зацепляться микротрубочки, участвующие в транспорте хромосом. Раньше считалось, что за перемещение хромосом в митозе отвечают моторные белки на кинетохоре, а кинетохорные микротрубочки просто играют роль «рельсов» по которым идут эти белки. Однако недавно было показано, что это не так – для транспорта хромосом во время митоза необходимо и достаточно только динамической нестабильности микротрубочек. Основа этого явления состоит в том, что микротрубочка может находиться в двух состояниях – быстрой разборки или медленного роста. Причем переход из одного состояния в другое является случайным процессом у свободных микротрубочек. Сокращающаяся микротрубочка, зацепленная за кинетохор, тянет за собой хромосому, в то время как растущая микротрубочка наоборот толкает хромосому. То, что микротрубочки действительно могут создавать силы достаточные для движения хромосом во время митоза, было показано экспериментально. Однако до сих пор ни одна из существующих моделей взаимодействия кинетохора и микротрубочки не может полностью описать их структурные данные и динамические характеристики, полученные в недавних экспериментах, несмотря на частичные успехи этих моделей.

**Целью данной работы** было теоретическое и экспериментальное исследование механизма движения кинетохорного Dam1 комплекса, ответственного за взаимодействие микротрубочек с кинетохорами хромосом и образующего кольца вокруг микротрубочек.

### **Задачи исследования:**

1. Создать количественную модель микротрубочки, основываясь на последних данных о ее структуре и кинетики деполимеризации. При этом модель должна включать в себя тепловые флуктуации, которые не были учтены ни в одной предшествующей модели микротрубочки.

2. Создать и объединить с моделью микротрубочки модель кинетохорных белковых комплексов, взаимодействующих с микротрубочкой, основываясь на их структурных и динами-

ческих данных.

3. С помощью получившейся математической модели определить, какими свойствами должны обладать кинетохорные белки, взаимодействующие с микротрубочкой, для наиболее эффективного развития тянущей силы деполимеризующейся кинетохорной микротрубочкой.

4. Понять, как удастся кинетохорным белковым комплексам быть сильно связанными с микротрубочкой и при этом быстро передвигаться.

5. Экспериментально определить по какому из известных теоретических механизмов происходит движение кинетохора во время деления клетки.

**Научная новизна.** Впервые была разработана наиболее полная модель кинетохора и его взаимодействия с микротрубочкой, включающая в себя все известные на сегодняшний день структурные и динамические экспериментальные данные. В результате введения дополнительной гипотезы в модель о существовании подвижных белковых мостиков – линкеров у кинетохора, ответственных за связывание со стенкой микротрубочки, впервые было показано, каким образом удастся совместить высокую эффективность движения кинетохора вдоль микротрубочки с сильным связыванием кинетохора и микротрубочки. Этого свойства кинетохора до сих пор не могла объяснить ни одна существующая на сей день математическая модель. Не смотря на такое чисто теоретическое предположение, подобные линкеры были совсем недавно обнаружены на электронных фотографиях [Wang 2007], что свидетельствует в пользу созданной нами модели. Сравнение результатов модели с существующими экспериментальными данными по динамике кинетохорного белкового комплекса, ответственного за зацепление хромосомы к микротрубочкам, показало, что в природе реализуется силовой механизм движения (power stroke mechanism) кинетохора при разборке микротрубочки, а не механизм диффузии со смещением (biased diffusion mechanism). Этот результат также подтверждается проведенными мной экспериментальными исследованиями. Кроме того теоретические расчеты показали, что кинетохор движется наподобие моторных белков – его линкеры перешагивают из одного сайта взаимодействия на микротрубочке в другой, используя вместо энергии АТФ энергию упругих напряжений, запасенную в стенке микротрубочки. Подобный механизм движения до сих пор не был никем описан. Кроме того было экспериментально показано существование *in vitro* никем ранее не описанных структур, образуемых кинетохорными белковыми комплексами на микротрубочках. Эти структуры обладают ки-

нетическими свойствами, сильно отличающимися от свойств ранее обнаруженных белковых комплексов.

**Научно-практическое значение.** Исследование механизмов, участвующих в делении клеток, очень важно при изучении развития раковых заболеваний. Знание процессов, протекающих во время митоза и принципов их действия, может помочь в создании антираковых препаратов и методик лечения. Результатом данной работы является вклад в понимание механизма движения и взаимодействия кинетохора с микротрубочкой, а также выяснение механизма генерации сил, развиваемых кинетохорными микротрубочками во время деления клетки.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Создана оригинальная математическая модель взаимодействия микротрубочки и кинетохора, хорошо согласующаяся со всеми существующими экспериментальными данными.

2. С помощью полученной математической модели определены необходимые свойства кинетохорных белков, связывающихся с микротрубочкой, для обеспечения наиболее эффективного функционирования кинетохора.

3. Показано, каким образом можно совместить в кинетохоре два противоречивых свойства – сильное связывание с микротрубочкой и высокую подвижность.

4. Экспериментально определен механизм, по которому происходит движение кинетохора во время деления клетки.

5. Экспериментально показано существование ранее никем не описанных структур, образуемых кинетохорными белковыми комплексами на микротрубочках. Эти структуры обладают кинетическими свойствами, сильно отличающимися от свойств ранее обнаруженных белковых комплексов.

**Апробация работы** состоялась 13-ого марта 2008 г. на заседании проблемной комиссии «Биохимия, биофизика и реология крови» в Гематологическом Научном Центре РАМН.

Материалы диссертации докладывались на III съезде биофизиков России (Воронеж, 24-29 июня 2004); 46-ой и 47-ой конференциях annual ASCB meeting (December 9-13, 2006, San Diego, CA и December 1-5, 2007, Washington, DC); конференции молодых ученых "Биология - наука XXI века" (29 октября - 2 ноября, 2007, Пущино).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы тезисы в сборниках 5-и конференций и 2статей.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из введения, шести глав, библиографического указателя, включающего 106 источников. Работа выполнена на базе Гематологического Научного Центра РАМН в лаборатории физической биохимии системы крови (зав. лабораторией проф. Атауллаханов Ф.И.) и в Университете штата Колорадо, США (зав. лабораторией проф. Ричард Макинтош).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы.** Модель микротрубочки. За основу была взята модель микротрубочки из статьи [Molodtsov 2005a] с небольшими изменениями, описанными ниже. В этой модели рассматривается микротрубочка, состоящая из 13 протофиламентов с 3-х заходной спиралью, ось микротрубочки направлена вдоль оси  $z$ . Считалось, что каждый протофиламент все время находится в плоскости, проходящей через ось микротрубочки и начальное

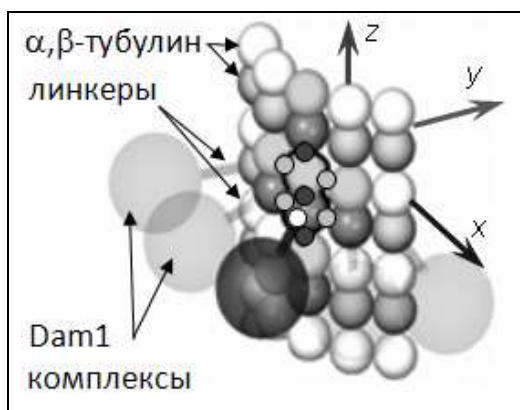


Рис.1. Схематическое изображение положения силовых центров в модели.

вертикальное положение протофиламента. Это предположение не ограничивает применение модели, т.к. на электронных томограммах видно, что протофиламенты практически полностью лежат в таких плоскостях. Конформационное изменение формы протофиламента при выгибании из стенки микротрубочки происходит благодаря изгибанию между  $\alpha$  и  $\beta$  субъединицами внутри димеров тубулина и наклону между соседними димерами тубулина [Nicholson 1999, Gigant 2000, Steinmetz 2000]. Поэтому в модели протофиламенты состояли из твердых сферических мономеров одинакового

диаметра (4 нм), которые могут наклоняться друг относительно друга. Предполагалось, что каждый мономер имеет четыре точки взаимодействия с соседними мономерами. Две из них соответствуют взаимодействию «голова к хвосту», это связи мономеров внутри протофиламентов (темно-серые кружочки на рис. 1). Две другие – по бокам, соответствующие боковым связям мономеров внутри стенки микротрубочки (светло-серые кружочки на рис. 1). Как и в статьях [Molodtsov 2005a, 2005b] считалось, что все взаимодействия между мономерами одинаковы для  $\alpha$ - и  $\beta$ -мономеров.

Координаты первого мономера в каждом протофиламента были зафиксированы. Продольные связи «голова к хвосту» мы считали нерастяжимыми и отвечающими только за из-

гибание протофиламентов, а потенциал этого взаимодействия описывался функцией  $g_{k,n} = B \cdot (\chi_{k,n} - \chi_o)^2 / 2$ , где  $\chi_{k,n} = \tau_{k,n} - \tau_{k-1,n}$  – угол между  $k$ -ым и  $(k-1)$ -ым мономерами в  $n$ -ом протофиламенте,  $\tau_{k,n}$  – угол между  $k$ -ым мономером в  $n$ -ом протофиламенте и осью микротрубочки, эти углы являются независимыми переменными в модели;  $B$  – параметр, характеризующий изгибную упругость связи. Потенциал боковых взаимодействий мономеров мы описывали функцией  $v(r) = A \cdot (r/r_o)^2 \cdot \exp(-r/r_o)$ , где  $A$  и  $r_o$  – параметры потенциала,  $r = r(\tau_{k,n})$  – расстояние между боковыми центрами взаимодействия тубулинов.

Модель ДАМ-кольца. Из экспериментальных данных известно, что ДАМ-кольцо состоит из ~ 16 субъединиц. Но для упрощения модели считалось, что кольцо состоит из 13. Такое упрощение не ограничивает общности модели, поскольку образование дополнительных 3 связей стерически не возможно. Кольцо в расчетах имело внутренний диаметр 33 нм [Westermann 2005, Miranda 2005]. От каждой из 13 субъединиц кольца к одному из 13 протофиламентов идет линкер – белковый мостик комплекса Dam1, ответственный за взаимодействие с микротрубочкой. Каждый линкер описывался линейным стержнем длиной 4 нм. Считалось, что каждый линкер может сжиматься в продольном направлении, а также выгибаться из плоскости кольца, при этом в расслабленном состоянии все линкеры направлены в центр кольца. Исходя из результатов статьи [Westermann 2005] я предположил, что центр связывания линкера с димером тубулина находится на  $\alpha$ -мономере тубулина. Положение сайта взаимодействия линкера с  $\alpha$ -мономером тубулина показан белым кружочком на рис. 1. Для простоты расчетов считалось, что подвижный конец каждого линкера все время движется по внешней поверхности соответствующего протофиламента. Следовательно, каждый линкер будет описываться одной степенью свободы, не включая координат ДАМ-кольца. В качестве нее был взят угол  $\alpha_n$  между плоскостью кольца и направлением линкера. Эти углы, так же как и углы  $\tau_{k,n}$  являются независимыми переменными в нашей модели. Кроме того к независимым переменным относятся три координаты положения центра ДАМ-кольца в пространстве  $X_c, Y_c, Z_c$  и три угла Эйлера для него  $\theta, \varphi, \psi$ . Таким образом, углы  $\tau_{k,n}, \alpha_n, \theta, \varphi, \psi$  и координаты  $X_c, Y_c, Z_c$  составляют весь набор независимых переменных системы, который обозначим  $\Omega$ .

Энергия продольной деформации  $n$ -го линкера равна  $q_n(\Delta l_n) = k_{spring} \cdot \Delta l_n^2 / 2$ , где  $k_{spring}$  – коэффициент продольной жесткости линкера;  $\Delta l_n = \Delta l_n(\Omega)$  – абсолютное изменение длины линкера. А энергия изгибания  $n$ -го линкера равна  $p_n(\beta_n) = k_{flex} \cdot \beta_n^2 / 2$ , где  $k_{flex}$  – коэффициент

изгибной жесткости линкера;  $\beta_n = \beta_n(\Omega)$  – угол отклонения линкера от равновесного положения.

Кроме этих двух энергий, описывающих свойства упругости линкеров в модель была введена энергия взаимодействия подвижного конца линкера с  $\alpha$ -мономерами тубулина. Она аппроксимировалась формулой  $d_n(\rho_n) = -k_{DAM} \cdot \exp(-\rho_n^2/r_{DAM}^2)$ , где  $k_{DAM}$  – параметр, описывающий глубину ямы;  $r_{DAM}$  – параметр, характеризующий ширину потенциальной ямы,  $\rho_n = \rho_n(\Omega)$  – расстояние от подвижного конца  $n$ -го линкера до центра взаимодействия на ближайшем  $\alpha$ -мономере.

Выбор значений констант модели. Параметр  $\chi_o$  был выбран исходя из структурных данных [Muller-Reichert 1998] – угол между соседними ГДФ-димерами тубулина в протофилamente в расслабленном состоянии равен 0.4 радиана. Для простоты считалось, что этот угол есть сумма равных интердимерного и интрадимерного изгиба между мономерами тубулина, т.е. равновесный угол  $\chi_o = 0.2$  радиана в обоих случаях. Другой параметр –  $B$  в формуле был выбран из соображения, что вся энергия гидролиза ГТФ, связанного с  $\beta$ -мономером тубулина,  $-E_H = 7.3$  ккал/моль = 12.3 к<sub>В</sub>Т, [Lehninger 1993], запасается в стенке микротрубочки в виде упругих напряжений. Следовательно,  $B = E_H / \chi_o^2 \approx 300$  к<sub>В</sub>Т/рад<sup>2</sup>. Для соответствия температурной зависимости скорости разборки микротрубочки был подобран параметр  $A$ , который оказался равен 28 к<sub>В</sub>Т, а величина барьера боковой связи  $E_{barrier} = 4Ae^{-2} \approx 15$  к<sub>В</sub>Т. Поэтому разность энергии барьера боковой связи мономера и энергии запасенной в продольной связи мономера равна  $\Delta E_{theor} = E_{barrier} - E_H/2 = 15$  к<sub>В</sub>Т – 6 к<sub>В</sub>Т = 9 к<sub>В</sub>Т, что соответствует экспериментальным данным  $\Delta E_{exp} = (4.8 \pm 0.6)$  ккал/моль  $\approx (8 \pm 1)$  к<sub>В</sub>Т [Molodtsov 2005b].

Дальнейшие расчеты модели показали, что от изменения величины  $k_{spring}$  на порядок полученные далее динамические зависимости не сильно меняются, поэтому эта величина во всех приведенных ниже расчетах была фиксирована и равна  $k_{spring} = 0.13$  Н/м. Такой коэффициент упругости для стержня длиной 4 нм площадью поперечного сечения 1 нм<sup>2</sup> соответствует модулю Юнга  $E = 5 \cdot 10^8$  Н/м<sup>2</sup>, характерному для многих белков.

Расстояние типичного белок-белкового взаимодействия составляет 1-2 Å [Jiang 2002]. Поэтому параметр  $r_o$  из формулы был выбраны равными  $r_o = 0.8$  Å, т.к. длина связи равна  $2r_o = 1.6$  Å. Это же касается и параметра  $r_{DAM}$ , который был взят равным 1.4 Å.

Также в модели необходимо задать коэффициент диффузии свободного ДАМ-кольца в



воде. Для этой цели были взяты данные по измерению коэффициента диффузии Dam1 декамеров в воде [Miranda 2005] и был оценен коэффициент диффузии свободного ДАМ-кольца в растворе по порядку величины как  $D = 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ .

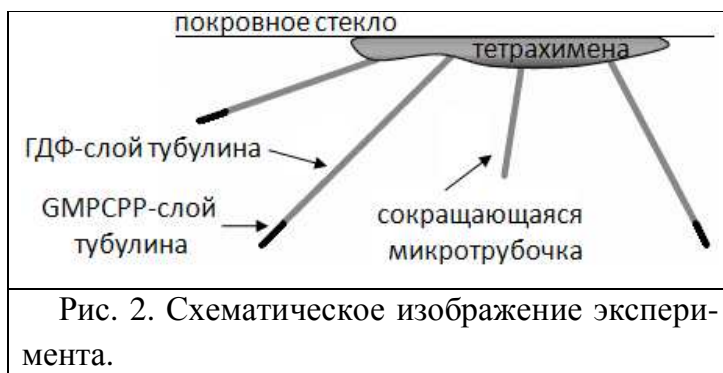
Таким образом, в модели микротрубочки, взаимодействующей с ДАМ-кольцом, есть только два важных параметра –  $k_{flex}$ ,  $k_{ДАМ}$ , от которых сильно зависят конечные результаты.

Экспериментальная установка. Все эксперименты с проточной камерой были сделаны на световом микроскопе Zeiss Axiophoto2, адаптированным под конструкцию лазерной ловушки. Изображения движущихся флуоресцентных Dam1 комплексов были получены с интервалом в 5 секунд в виде z-стеков, включающих в себя 3-4 плоскости с шагом в 0.3 мкм. Это было необходимо, т.к. микротрубочки, на которых сидят ДАМ-пятна, совершают колебательные тепловые движения и часто выходят из фокальной плоскости микроскопа, что сильно сказывается на величине интенсивности ДАМ-пятен. Экспозиция камеры в каждой плоскости была равна 400 мс. Изображения движущихся шариков, покрытых Dam1 комплексом, при деполимеризации микротрубочки, снимались с использованием DIC микроскопии и выдержкой видеокамеры 100 мс для каждого кадра.

Реагенты и белки. Большинство реагентов были куплены у Sigma и Molecular Probes. Негидролизующий аналог ГТФ, GMPCPP, был приобретен у Jena Bioscience. Тубулин был получен из коровьих мозгов путем по протоколу из [Weingarten, 1975]. Мечение тубулина родамином и биотином было выполнено по стандартному протоколу из [Human, 1991]. В качестве центров нуклеации тубулина использовались лизированные шкурки тетрахимены или аксонемы, присланные из университета штата Миннесоты. Стеклообразные микрошарики были приобретены у Spherotech Inc и обработаны по протоколу из [Asbury, 2006].

Приготовление проточной камеры к экспериментам. Эксперимент проводился в термостатируемой (32°C) проточной камере, основой которой служили предметное и покровное стекла, разделенные слоем двустороннего скотча. Схема эксперимента представлена на рис. 2. До начала эксперимента шкурки тетрахимены (или аксонемы) помещались на покровное стекло, после чего камера заполнялась буфером А (BRB-80, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0.5 мг/мл казеина), собиралась и запечатывалась силиконом (Kwik-cast, WPI, Inc). После этого не адсорбировавшиеся на покровном стекле шкурки тетрахимены (аксонемы) вымывались из камеры 300 мкл буфера А на скорости 100 мкл/мин. Затем в камеру вмывался ГТФ-тубулин концентрации 1.4 мг/мл (с 1 mM ГТФ) со скоростью 30 мкл/мин. Спустя 15 мин,

когда микротрубочки выросли до размеров  $\sim 10$  мкм, камера промывалась четырьмя объемами GMPCPP-тубулина (1:3 тубулин был мечен родамином) в концентрации 0.4 мг/мл (с 1 mM GMPCPP) со скоростью 30 мкл/мин. За время промывки камеры на плюс концах микротрубочек нарастало несколько слоев GMPCPP-тубулина и микротрубочки становились устойчивыми и не чувствительными к разбавлению концентрации свободно плавающих димеров тубулина. Благодаря этому камеру можно было хорошо отмыть от остатков свободно плавающего в растворе меченого родамином тубулина. Кроме того, благодаря наличию крашеного родамином тубулина на GMPCPP кончиках микротрубочек, можно было инициировать деполимеризацию микротрубочек, находящихся в поле зрения микроскопа, уничтожая GMPCPP кончики микротрубочек путем их освещения зеленым светом, на котором поглощает родамин. Отмывка камеры производилась все тем же буфером А на скорости 10 мкл/мин в течение 5 минут. Затем камера промывалась буфером Б, за основу которого брался буфер А с добавлением BSA до концентрации 0.5 мг/мл и 1% 2-меркаптоэтанола.



В некоторых экспериментах в проточную камеру добавлялся раствор буфера Б с Dam1 комплексом там, где это отдельно оговаривается в тексте. Меченный краской Dam1 комплекс был любезно предоставлен Вестерманом, университет Беркли, Калифорния. Непосредственно перед введением в проточную камеру Dam1 разводился в буфере Б до концентраций порядка 3-30 нМ.

### Результаты.

Увеличение жесткости линкеров кольца ведет к уменьшению силы связывания кольца с микротрубочкой. Расчеты модели для разных  $k_{flex}$  показали, что с ростом изгибной жесткости линкеров падает количество связей между ДАМ-кольцом и микротрубочкой. При  $k_{flex} = 2000$  к<sub>В</sub>Т/рад, максимальное количество линкеров, взаимодействующих с сайтами связывания на микротрубочке, в каждый момент времени  $\leq 3$  и эта цифра не зависит от  $k_{DAM}$ . При жесткости  $k_{flex} = 200$  к<sub>В</sub>Т/рад с сайтами взаимодействия на микротрубочке связываются по 7-9 линкеров кольца, а при  $k_{flex} = 20$  к<sub>В</sub>Т/рад все линкеры кольца находятся в связанном со-

стоянии для глубин ДАМ-потенциала в интервале 10-16 к<sub>В</sub>Т. С уменьшением  $k_{ДАМ}$  наблюдается уменьшение максимального количества связанных линкеров до 3. Следовательно, можно заключить, что кольцо с более гибкими линкерами образует больше связей, чем кольцо с жесткими линкерами, т.к. такому кольцу легче наклониться относительно оси микротрубочки, чтобы образовать больше связей. Кроме того нашей группой было ранее показано, что жесткое кольцо с внутренним диаметром, приблизительно равным диаметру микротрубочки, имеет низкое КПД преобразования упругой энергии, запасенной в стенке микротрубочки в механическую работу [Molodtsov 2005b]. А поскольку кольцо с жесткими линкерами ( $k_{flex} = 2000$  к<sub>В</sub>Т/рад) эквивалентно жесткому кольцу с внутренним диаметром равным диаметру микротрубочки, то можно уже на этой стадии заключить, что конфигурация кольца с жесткими линкерами не является оптимальной.

ДАМ-кольцо имеет устойчивое наклонное положение по отношению к оси микротрубочки. Дальнейшие расчеты показали, что для колец с гибкими линкерами  $k_{flex} = 20$  к<sub>В</sub>Т/рад и глубиной ДАМ-потенциала  $k_{ДАМ} \sim 12-14$  к<sub>В</sub>Т наблюдается совпадение распределения углов наклона кольца относительно оси микротрубочки с экспериментально померенным [Miranda 2005] с достоверностью

95%, см. рис. 3. На этом рисунке черным цветом изображена диаграмма распределения для теоретических расчетов в предположении, что на димере тубулина есть только один сайт связывания линкера кольца – на  $\alpha$ -мономере. Белым цветом изображена

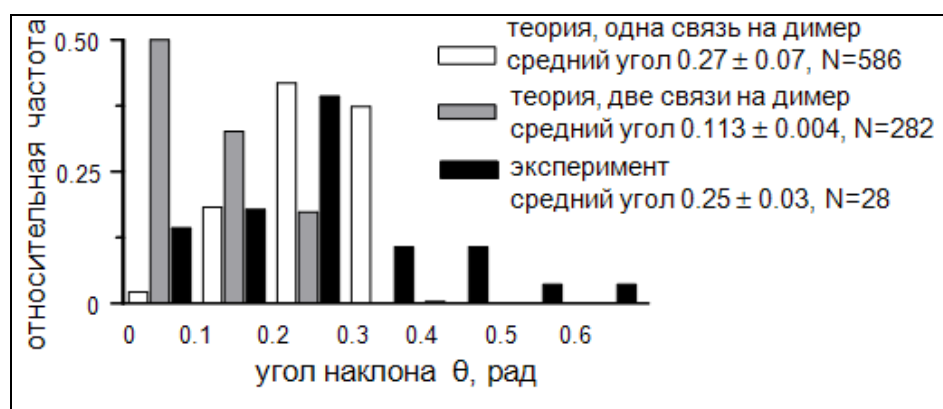


Рис. 3. Диаграммы распределения углов наклона кольца относительно оси микротрубочки.  $k_{flex} = 20$  к<sub>В</sub>Т/рад и  $k_{ДАМ} = 13$  к<sub>В</sub>Т.

диаграмма распределения для экспериментальных данных. Для сравнения была также посчитана серая диаграмма распределения в случае, когда на димер тубулина приходится два сайта связывания линкера кольца – один на  $\alpha$ -мономере, другой – на  $\beta$ -мономере. С достоверностью 95% эта теоретическая диаграмма отличается от экспериментальной диаграммы. Эти данные хорошо согласуются с экспериментальными наблюдениями [Westermann 2005],

которые свидетельствуют о том, что субъединицы ДАМ-кольца связываются только с  $\alpha$ -мономерами димеров тубулина.

У кольца есть несколько выгодных наклонных положений относительно оси микротрубочки. Их можно проиллюстрировать с помощью полярной диаграммы, как это сделано на рис. 4. На диаграмме каждая точка изображает проекцию конца единичного вектора коллинеарного оси кольца на плоскость, перпендикулярную оси микротрубочки. Радиальные круги на диаграмме, идущие с шагом 0.05, показывают абсолютную величину проекции, равную  $\sin \theta$ , где  $\theta$  – угол Эйлера кольца. Азимутальные направления показывают расположение плоскостей протофиламентов, если смотреть от плюс конца к минус концу микротрубочки. Из диаграммы видно, что точки расположены неравномерно, что объясняется спиральностью микротрубочки. И наиболее часто кольцо образует угол  $0.27 \pm 0.07$  рад с наклоном в сторону 5 протофиламента.



Рис. 4. Угловая диаграмма устойчивых положений ДАМ-кольца.  $k_{flex} = 20$   $k_B T / \text{рад}$  и  $k_{DAM} = 13$   $k_B T$ .

Слабосвязывающееся с микротрубочкой ДАМ-кольцо движется по механизму направленной диффузии. Расчеты по зависимости эффективного коэффициента диффузии кольца,

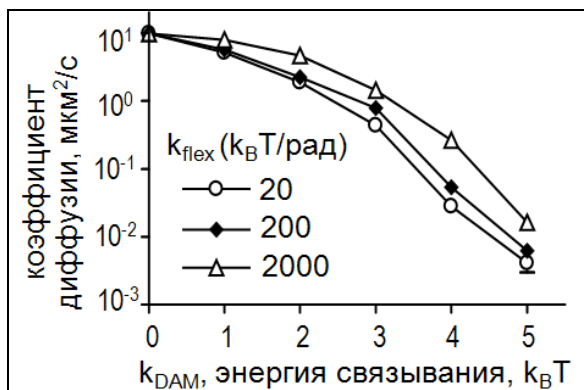


Рис. 5. Зависимость коэффициента диффузии кольца от энергии связывания линкеров с тубулином.

связанного с микротрубочкой, от  $k_{flex}$  и  $k_{DAM}$  показали, что наибольшее влияние на этот параметр оказывает величина  $k_{DAM}$ , в то время как зависимость от  $k_{flex}$  небольшая. Результаты расчетов изображены на рис. 5, на котором показаны зависимости эффективного коэффициента диффузии кольца от глубины ямы  $k_{DAM}$  для различных изгибных жесткостей линкеров  $k_{flex}$ . Из графиков видно, что когда взаимодействие кольца с микротрубочкой очень слабое ( $k_{DAM} < 2$   $k_B T$ ), кольцо диффундирует очень быстро.

При этом эффективный коэффициент диффузии на этом участке мало зависит от глубины ДАМ-потенциала. При увеличении силы связывания ( $k_{DAM} = 2-5$   $k_B T$ ) наблюдается экспоненциальная зависимость – увеличение силы связывания на 1  $k_B T$  приводит к 10 кратному

уменьшению эффективного коэффициента диффузии ДАМ-кольца в модели.

При таких неглубоких ДАМ-потенциалах кольцо во время укорочения микротрубочки двигается по механизму диффузии со смещением, см. рис. 6, на котором изображено изменение положения центра кольца и деполимеризующегося конца микротрубочки с течением времени. Из графика видно, что кольцо совершает случайные движения вдоль микротрубочки, однако деполимеризующийся конец микротрубочки ограничивает движение кольца, не давая ему слететь с микротрубочки. Это происходит благодаря тому, что деполимеризующийся конец микротрубочки очень сильно раскрывается, и его диаметр превышает диаметр ДАМ-кольца. Поэтому такой конец микротрубочки играет роль энергетического барьера, который кольцо не может преодолеть, т.к. для этого понадобилась бы энергия  $> 100 \text{ кВТ}$  для распрямления протофиламентов микротрубочки.

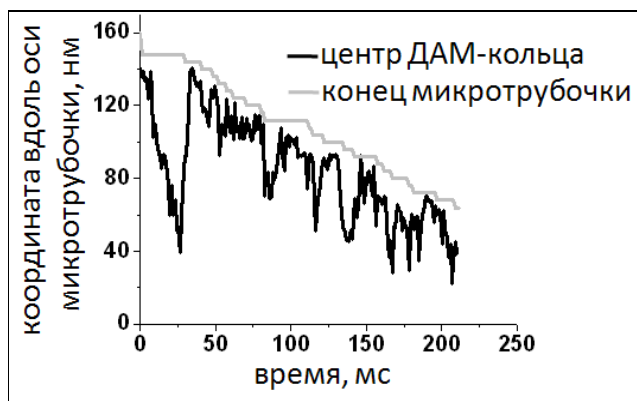


Рис. 6. Зависимость положения центра ДАМ-кольца и конца микротрубочки при ее деполимеризации.  $k_{flex} = 20 \text{ кВТ/рад}$  и  $k_{DAM} = 4 \text{ кВТ}$ .

Сильносвязывающееся с микротрубочкой ДАМ-кольцо двигается по механизму силового шагания. При увеличении глубины ДАМ-потенциала наблюдаются сильные изменения в

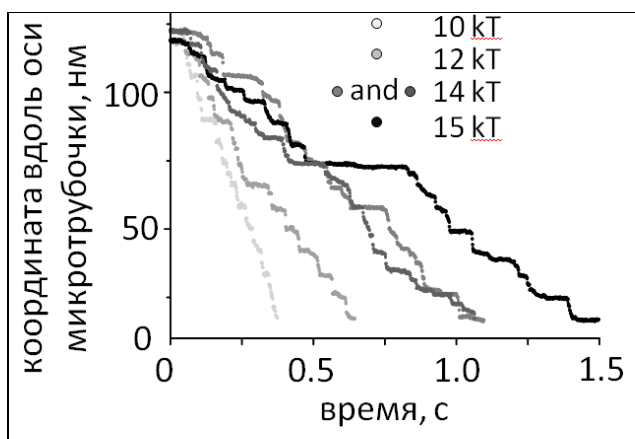


Рис. 7. Зависимость положения центра ДАМ-кольца от времени при деполимеризации микротрубочки для разных  $k_{DAM}$ .  $k_{flex} = 20 \text{ кВТ/рад}$ .

динамическом поведении кольца. Так при  $k_{DAM} = 10-15 \text{ кВТ}$  кольцо имеет очень маленький эффективный коэффициент диффузии ( $< 10^{-16} \text{ см}^2/\text{с}$ ), т.е. такое кольцо при характерном времени проведения эксперимента порядка часа выглядело бы неподвижным. Но при деполимеризации микротрубочки изгибающиеся протофиламенты развивают силу давления на линкеры кольца, достаточную для того, чтобы кольцо начало двигаться со скоростями порядка скорости разборки микротрубочки. При этом такое кольцо перемещается вдоль оси микротрубочки

шагами (см. рис. 7), что разительно отличается от диффузии слабосвязанного с микротрубочкой кольца (см. рис. 6). На рис. 7 разными оттенками изображены графики смещения центра кольца вдоль оси микротрубочки в зависимости от времени для разных значений  $k_{DAM}$ . Из рис. 7 видно, что центр сильно связанного с микротрубочкой кольца всегда движется в направлении деполимеризации микротрубочки и не испытывает случайно диффузии как у слабосвязанного с микротрубочкой кольца. Однако и здесь наблюдается некий элемент случайности – движение кольца часто прерывается паузами, являющимися результатом стохастического поведения протофиламентов при разборке микротрубочки и вероятными переходами кольца между устойчивыми положениями относительно микротрубочки. При этом длительность пауз тем больше, чем больше сила связывания линкеров кольца с поверхностью микротрубочки. Из-за чего с увеличением силы связывания наблюдается замедление скорости движения ДАМ-кольца и деполимеризации микротрубочки, см. рис. 8.

Т.к. сильносвязанное с микротрубочкой кольцо перемещается вдоль оси микротрубочки шагами под действием силы со стороны деполимеризующегося конца микротрубочки, то такой механизм движения можно назвать «силовым шаганием». При этом линкеры передвигаются 8нм шагами, что довольно таки очевидно, т.к. на протофиламентах микротрубочки сайты связывания линкеров идут как раз с этим шагом, равным длине димера тубулина. Центр же самого кольца передвигается с менее регулярным шагом в отличие от линкеров, т.к. движение кольца является усреднением движения всех 13 линкеров, которые шагают асинхронно.

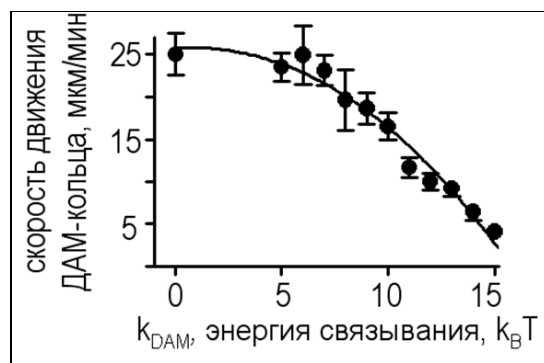


Рис. 8. Зависимость скорости движения ДАМ-кольца при разборке микротрубочки от  $k_{DAM}$ .  $k_{flex} = 20 k_B T/рад$ .

Сильносвязывающееся с микротрубочкой ДАМ-кольцо обладает более лучшими динамическими характеристиками, чем слабосвязывающееся ДАМ-кольцо. Для сравнения двух типов колец – сильносвязывающихся ( $k_{DAM} = 10-15 k_B T$ ) и слабосвязывающихся ( $k_{DAM} = 1-5 k_B T$ ) было исследовано две зависимости – сила остановки (stalling force) и сила отрыва кольца от глубины ДАМ-потенциала. В первом случае нагрузка, приложенная к кольцу, равномерно распределялась между 13 субъединицами кольца и искалась такая величина нагрузки, при которой кольцо останавливалось при деполимеризации микротрубочки. Во вто-

ром случае бралась неразбирающаяся стабильная микротрубочка с ДАМ-кольцом, к которому опять же была приложена равномерно распределенная по кольцу нагрузка. Только на этот раз искалась такая величина нагрузки, при которой кольцо начинало двигаться в сторону нагрузки, преодолевая ДАМ-потенциалы на поверхности микротрубочки и, в конечном счете, отрываясь от конца микротрубочки.

Так, например, оказалось, что сила остановки для случая  $k_{ДАМ} = 5$  кВТ равна  $\sim 60-70$  пН, а для случая  $k_{ДАМ} = 13$  кВТ она равна  $\sim 40-50$  пН. И, следовательно, в первом случае КПД системы  $\sim 80-90\%$ , а во втором  $\sim 50-60\%$ , т.к. максимально развиваемая микротрубочкой сила по теоретическим оценкам равна 80 пН. Но КПД системы – не единственный параметр, определяющий оптимальность конструкции ДАМ-кольца. На рис. 9 изображено два графика: 1) светлый – зависимость силы остановки от глубины ДАМ-потенциала; 2) темный – зависимость силы отрыва от глубины ДАМ-потенциала. В районе точки пересечения этих двух графиков и немного правее

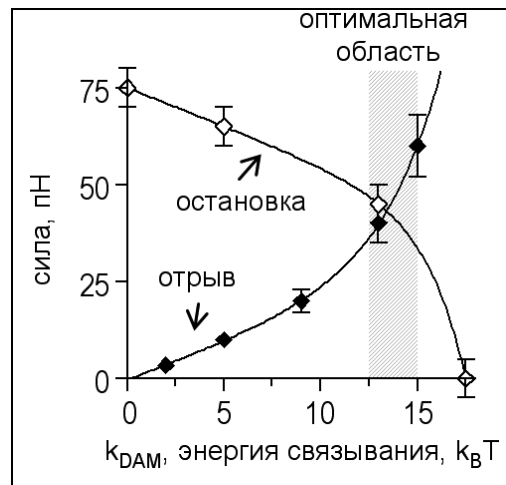


Рис. 9. Зависимость сил остановки и отрыва ДАМ-кольца от  $k_{ДАМ}$ .  $k_{flex} = 20$  кВТ/рад.

находится область оптимального значения параметра  $k_{ДАМ}$ , изображенная на рисунке штрихованным прямоугольником, т.к. ДАМ-кольца, которые под действием деполимеризующейся микротрубочки развивают силу, большую, чем сила отрыва кольца от микротрубочки, будут постоянно терять связь с микротрубочками. С другой стороны также невыгодно иметь слишком большую силу связывания ДАМ-кольца с микротрубочкой, т.к. это приводит к маленькому КПД системы или вообще ее полной остановке. Таким образом, можно заключить, что клетке более выгодно иметь ДАМ-кольца с гибкими линкерами, взаимодействующими с димерами тубулина микротрубочки с энергией  $k_{ДАМ} \sim 13-15$  кВТ.

На закрепленных к покровному стеклу микротрубочках образуются как нормальные ДАМ-кольца, так и ДАМ-структуры в виде недостроенных ДАМ-колец. Мной были проведены эксперименты, аналогичные [Westermann 2006] по диффузии флуоресцентных ДАМ-пятен вдоль стабилизированных таксомом микротрубочек, закрепленных за покровное микроскопное стекло. При этом мы использовали микротрубочки, выращенные из биотинилированного тубулина, а стекло непосредственно перед экспериментом было покрыто стреп-

тавидином. В результате связывания микротрубочек с покровным микроскопным стеклом,

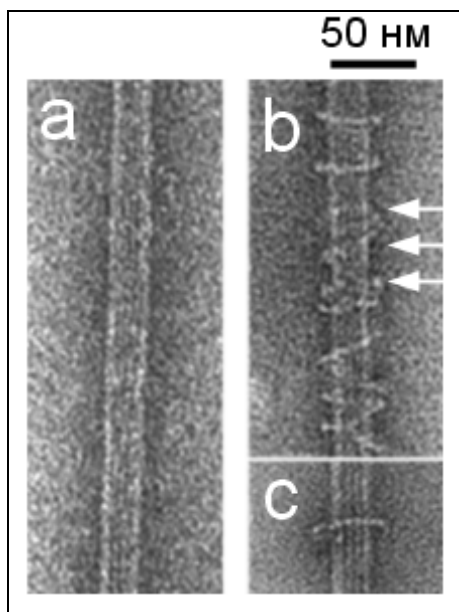


Рис. 10. **А.** Электронная фотография биотинилированной микротрубочки, лежащей на связывающей поверхности в отсутствие Dam1 в растворе. **В.** То же, что и в А, только на этот раз с Dam1 в растворе. Dam1 образовал на поверхности микротрубочки структуры, часть из которых точно не являются замкнутыми кольцами (показаны белыми стрелками). **С.** Электронная фотография свободноплавающей микротрубочки с ДАМ-кольцом на ней.

не было видно образования каких-либо агрегатов из Dam1, покрывающих все протофиламенты, кроме ДАМ-колец, то, по-видимому, эти яркие ДАМ-точки как раз представляли собой эти

ДАМ-кольца с трудом могли образовываться вокруг них, исходя из стерических соображений. Это предположение подтверждается и электронными фотографиями ДАМ-пятен, сделанных Грищук Е.Л., которые образовывались на таких связанных с поверхностью микротрубочках, см. рис. 10В. Из изображения видно, что Dam1 чаще образует структуры в виде недостроенных ДАМ-колец, – ДАМ-патчей (Dam1-patches).

Все флуоресцентные ДАМ-пятна, связанные с микротрубочками, делились на две категории, см. кимограмму, изображенную на рис. 12. Первая категория – более яркие пятна, которые совсем не двигались и сидели на одном месте на микротрубочке в течение всего эксперимента. Вторая – очень подвижные пятна, которые часто сливались друг с другом или наоборот разбивались на пару более слабых диффундирующих пятен. Динамические более слабые ДАМ-пятна никогда не проходили сквозь яркие неподвижные пятна, «отскакивая» от них. Это говорит о том, что такое яркое ДАМ-пятно занимает все протофиламенты микротрубочки, поэтому нет ни одной обходной дороги вокруг этой структуры. Т.к. в электронный микроскоп

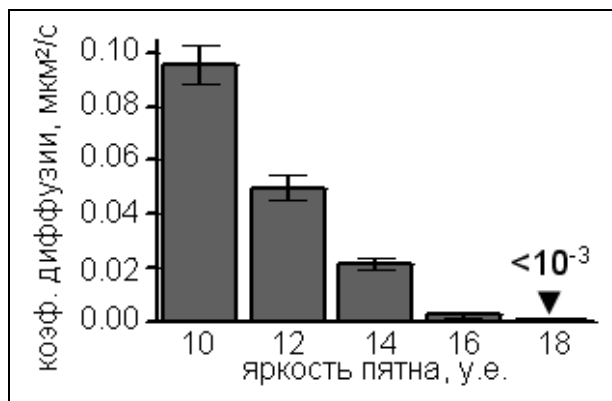


Рис. 11. Зависимость эффективного коэффициента диффузии флуоресцентных ДАМ-пятен вдоль микротрубочек от их относительной яркости.



кольца.

Характерно, что при увеличении яркости ДАМ-пятна падал его коэффициент диффузии, см. диаграмму на рис. 11, что говорит о присутствии на микротрубочках ДАМ-комплексов с разным количеством Dam1 комплексов и связей, образованных с микротрубочкой, и состоящих из разного количества Dam1. Причем чем больше флуоресценция ДАМ-пятна, тем больше крашеного Dam1 входит в его состав, тем больше образуется у такого пятна связей с микротрубочкой и тем меньше его коэффициент диффузии, начиная от значений, обнаруженных в работе [Westermann 2006] и кончая полной остановкой ДАМ-пятна. Если взять верхнюю оценку коэффициента диффузии для самых ярких пятен из диаграммы на рис. 16 и подставить в теоретический график на рис. 6, то оказывается, что соответствующая глубина ДАМ-потенциала будет не менее 6-7 кВТ.

В заключении об этом эксперименте стоит сказать, что, по-видимому, в работе [Westermann 2006] как раз и наблюдали диффузию таких ДАМ-патчей на адсорбированных к стеклу микротрубочках, хотя приписывали ее движениям полных ДАМ-колец, что, по-видимому, оказалось неверным. В нашей экспериментальной работе была впервые показана возможность существования высокодинамичных ДАМ-патчей на микротрубочке, которые вполне возможно могут играть немалую роль во время митоза.

В заключении об этом эксперименте стоит сказать, что, по-видимому, в работе [Westermann 2006] как раз и наблюдали диффузию таких ДАМ-патчей на адсорбированных к стеклу микротрубочках, хотя приписывали ее движениям полных ДАМ-колец, что, по-видимому, оказалось неверным. В нашей экспериментальной работе была впервые показана возможность существования высокодинамичных ДАМ-патчей на микротрубочке, которые вполне возможно могут играть немалую роль во время митоза.

Микрошарики, покрытые Dam1 комплексом, ускоряют разборку микротрубочек и обладают высокой процессивностью движения. Для того чтобы исследовать более подробно возможность ДАМ-патчей трансформировать упругую энергию напряжений в стенке микротрубочки в механическую работу, были использованы микрошарики, покрытые меченым алексой 488 Dam1 комплексами. Микротрубочки выращивались из шкурки тетрахимен, адсорбированных на покровном стекле. Затем в проточную камеру вмывались покрытые шарики, большинство из которых повисало на микротрубочках. Непосредственно перед вмы-

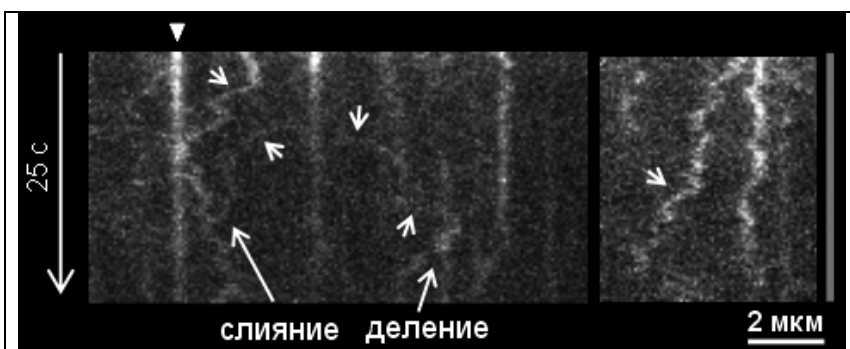


Рис. 12. Кинограмма флуоресцентных ДАМ-пятен, сидящих на микротрубочке, которая закреплена на связывающей поверхности. Из рисунка видно, что все пятна делятся на две группы – яркие неподвижные и более слабые, диффундирующие вдоль микротрубочки (белые стрелки).

ванием в проточную камеру эти шарики тщательно были отмыты от свободных Dam1 комплексов, не связавшихся с поверхностью шариков и плавающих в растворе. Таким образом,

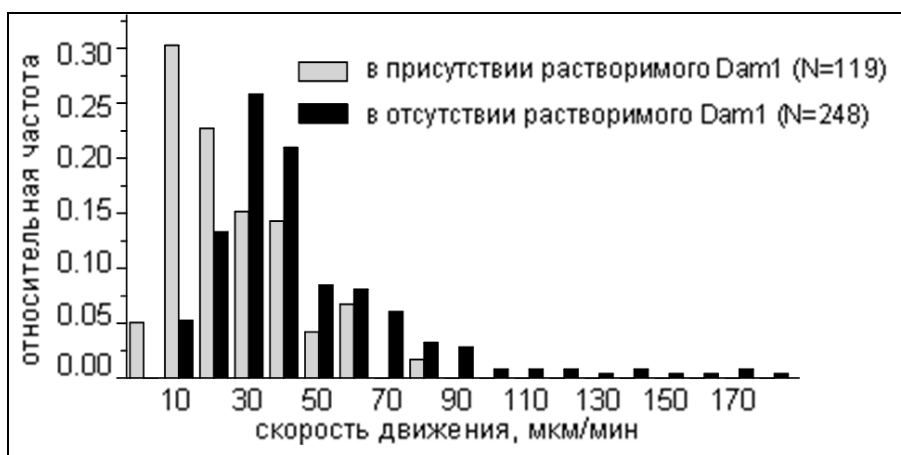


Рис. 13. Диаграммы распределения скоростей движения шариков, покрытых Dam1, при деполимеризации микротрубочек для случаев отсутствия (серая) и присутствия (черная) Dam1 в растворе.

эти шарики при зацеплении за микротрубочку не образовывали ДАМ-колец. Это подтверждалось наблюдениями в течение всего эксперимента – на микротрубочках не было видимых во флуоресцентном канале ДАМ-пятен. При инициации разборки микротрубочек путем облучения их зеленым светом 44% шариков отваливались от микротрубочек,

но оставшиеся 56% (231 шарик) начинали двигаться за разбирающимися концами микротрубочек вплоть до самого сайта нуклеации. В среднем такие шарики проходили порядка 7-10 мкм. При этом средняя скорость движения этих шариков была равна  $29.8 \pm 3.4$  мкм/мин (N=248), см. рис. 13, что было больше, чем средняя скорость разборки свободных микротрубочек  $21.8 \pm 0.6$  мкм/мин (N=57) в той же системе в отсутствие шариков, см. рис. 18. Следовательно, шарики, покрытые Dam1 комплексом в отсутствие свободноплавающего Dam1 в растворе, обладают деполимеризующей активностью и двигаются при разборке по механизму диффузии со смещением аналогично шарикам в [Lombillo, Peskin 1995, Tao 1998].

Уменьшение плотности покрытия Dam1 комплексом поверхности шариков ведет к уменьшению их скорости движения за деполимеризующимися концами микротрубочек. При проведении экспериментов аналогичным тем, что упоминались в предыдущем пункте, с разными плотностями покрытия поверхности шариков Dam1, была получена зависимость, изображенная на рис. 14. И хотя график состоит всего из трех точек, хорошо заметна тенденция уменьшения скорости движения шариков с уменьшением количества Dam1 на их поверхности. Это служит доказательством того, что в такой постановке эксперимента не наблюдается формирование ДАМ-колец при присоединении шарика к микротрубочке. Т.к.

иначе понижение плотности Dam1 на шариках приводило бы к меньшему числу образующихся ДАМ-колец, соединенных с шариком. А это бы приводило в свою очередь к увеличению скорости движения шариков при деполимеризации микротрубочки. Такое поведение шариков в зависимости от плотности покрытия Dam1 наряду с их свойством ускорять деполимеризацию микротрубочек хорошо объясняется моделью диффузии со смещением, предложенной в [Peskin 1995] для аналогичных экспериментов, правда с другим белком.

Проводя такие же эксперименты, только в присутствии Dam1 комплекса в растворе оказалось, что

в этом случае средняя скорость движения шариков за разбирающимися концами микротрубочек равна  $9.4 \pm 2.9$  мкм/мин (N=119), что приблизительно в три раза меньше, чем в отсут-

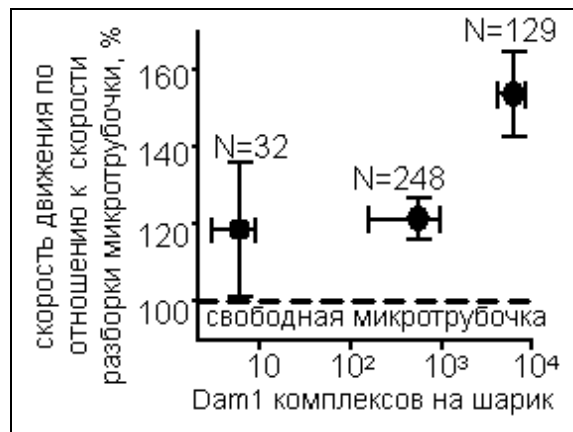


Рис. 14. Зависимость относительной скорости движения шариков при деполимеризации микротрубочек от плотности их покрытия Dam1 комплексами.

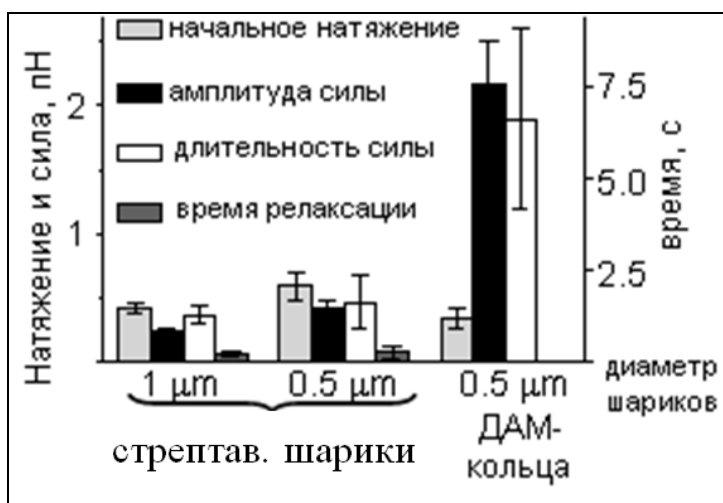


Рис. 15. Диаграммы динамических характеристик сигналов, возникающих при перемещении шариков под действием деполимеризующихся микротрубочек, измеренных в опыте с лазерной ловушкой.

ствии свободно плавающих Dam1 комплексов, см. рис. 13. Это объясняется образованием ДАМ-колец вокруг микротрубочек в месте присоединения шариков.

В пользу этого говорят измерения, проведенные на шариках с помощью лазерной ловушки. Оказалось, что сила, развиваемая деполимеризующейся микротрубочкой, на стрептавидиновые шары, зацепленные за биотинилированные микротрубочки [Grishchuk 2005] по своей амплитуде и продолжительности гораздо меньше, чем в случае шариков, покрытых Dam1, с присутствием Dam1 в растворе,

см. диаграмму на рис. 15. Эти экспериментальные данные объясняются тем, что в первом случае нет ДАМ-кольца между шариком и микротрубочкой, поэтому шары гораздо легче

отваливаются от деполимеризующихся концов микротрубочек, что и дает маленькую продолжительность силы. Кроме того, в первом случае на эти шарики давление оказывают всего 2-3 протофиламента, исходя из стерических соображений. Во втором случае, по видимому, образуется ДАМ-кольцо между шариком и микротрубочкой, в результате чего на шарик посредством ДАМ-кольца давят все 13 протофиламентов, что создает силу раз в шесть большую, чем в случае стрептавидиновых шариков, что и наблюдается в экспериментах. Таким образом, эти данные говорят о наличии ДАМ-колец вокруг микротрубочек, связанных с шариками, в присутствии Dam1 в растворе. При этом на самих микротрубочках во флуоресцентном канале видны неподвижные ДАМ-пятна, которые, следовательно, являются кандидатами на ДАМ-кольца.

Более детальная обработка экспериментов с лазерной ловушкой показала наличие прецессии оси ДАМ-кольца вокруг оси микротрубочки, которая также наблюдается и в теории.

ДАМ-кольца *in vitro* двигаются по механизму силового давления. В дальнейшем я решил выяснить – как влияет разборка микротрубочки на движение ДАМ-колец. В этих экспериментах проточная камера с микротрубочками, выращенными из аксоном, готовилась, как описано в «методах и материалах». При этом в конце промывки проточной камеры в нее добавлялся буфер Б с Dam1 с такой концентрацией, чтобы на микротрубочках образовались отчетливо видимые ДАМ-пятна, которые, как было показано выше, представляли собой ДАМ-кольца. Исходя из верхней оценки коэффициента диффузии таких пятен, глубина ДАМ-потенциала взаимодействия имеет значение  $> 6-7$  к<sub>B</sub>T. И, следовательно, такое кольцо при деполимеризации микротрубочки должно было бы двигаться по механизму силового давления. Т.к. механизм диффузии со смещением не может объяснить, как малоподвижное ДАМ-кольцо двигается со скоростями  $7.2 \pm 0.3$  мкм/мин ( $N = 209$ ), умеренными в этих экспериментах. Как видно из графика на рис. 8, такая скорость движения ДАМ-кольца соответствует глубине ДАМ-потенциала порядка 13-14 к<sub>B</sub>T, при которой также наблюдается согласие со структурными данными ДАМ-колец, полученных с помощью электронной микроскопии, см. рис. 3. Но тогда из-за такого сильного связывания наблюдалась бы остановка ДАМ-кольца, движущегося за деполимеризующим концом микротрубочки, при столкновении с любым ниже лежащим на микротрубочке ДАМ-кольцом, но в [Westermann 2006] наблюдалось скоплением ДАМ-пятен на конце деполимеризующегося конца микротрубочки без замедления скорости деполимеризации. Поэтому было решено воспроизвести опыты [Wester-

mann 2005, 2006] в нашей системе, где инициация деполимеризации микроотрубочек происходила с помощью промывки проточной камеры от свободноплавающих димеров тубулина. Непосредственно перед этим на микроотрубках можно было видеть в основном образование очень слабых ДАМ-пятен, диффундировавших вдоль микроотрубочек, в отличие от четких неподвижных ДАМ-пятен, образовавшихся при использовании стандартного протокола. Это свидетельствует о том, что это были по большей части ДАМ-патчи с редко попадающимися ДАМ-кольцами на микроотрубках. Поэтому можно заключить, что плавающий в растворе тубулин, по-видимому, обладает ингибиторным действием на образование ДАМ-колец на микроотрубках.

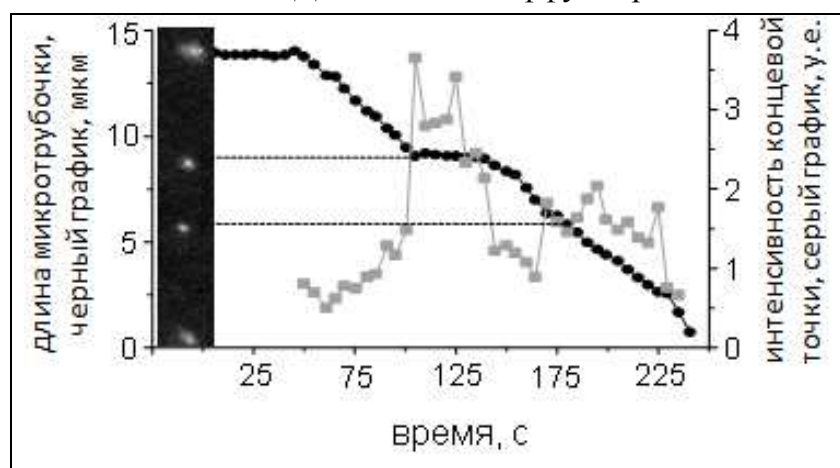


Рис. 16. Графики зависимости положения концевого флуоресцентного ДАМ-пятна (черный) относительно минуса конца микроотрубочки и его относительной интенсивности (серый) с течением времени при деполимеризации микроотрубочки. Слева графика показано начальное изображение микроотрубочки, покрытой ДАМ-пятнами. Видны только наиболее яркие пятна, хотя в микроскоп можно было наблюдать и очень слабые ДАМ-патчи, диффундирующие вдоль микроотрубочки.

пятна (см. рис. 16), что объясняется не сбором ДАМ-колец, как делали это авторы в [Westermann 2005, 2006], а накоплением более подвижных ДАМ-патчей на конце микроотрубочки, возможно при этом упаковывающихся в ДАМ-кольцо. Если же ДАМ-пятно, следующее за деполимеризующимся концом микроотрубочки, наталкивалось во время своего движения на другое яркое ДАМ-пятно (ДАМ-кольцо), то происходила остановка деполимеризации микроотрубочки. В таком положении система обычно находилась несколько секунд, после чего движение концевого ДАМ-пятна восстанавливалось. При этом было заметно понижение интенсивности концевого пятна по сравнению с тем, которое оно имело во время паузы. Это свидетельствует о сбрасывании с конца микроотрубочки лишних Dam1 комплексов. Чтобы определить, какое из двух ДАМ-пятен на микроотрубке – ближнее или дальнее от разби-

рающегося конца, продолжает движение после окончания паузы, были сделаны эксперименты с обесцвечиванием крашенных Dam1 комплексов путем облучения их лазером с длиной волны 488 нм. Оказалось, что при вхождении в эту зону обесцвечивания, интенсивность концевой ДАМ-пятна резко падала, а затем возрастала после выхода из зоны. Это говорит о том, что при столкновении одного ДАМ-пятна с другим во время деполимеризации микротрубочки разбирается то, которое стоит ближе к концу микротрубочки, а дальнейшее от конца пятно затем продолжает движение.

Эти экспериментальные данные не описываются моделью Хилла [Hill, 1985].

ДАМ-кольца С-мутанта Dam1 двигаются при разборке микротрубочки с большими, чем в случае нативного Dam1, скоростями. В статьях [Wang, Miranda 2007] было показано, что С-концы Dam1p белков подходят на роль линкеров между ДАМ-кольцом и микротрубочкой,

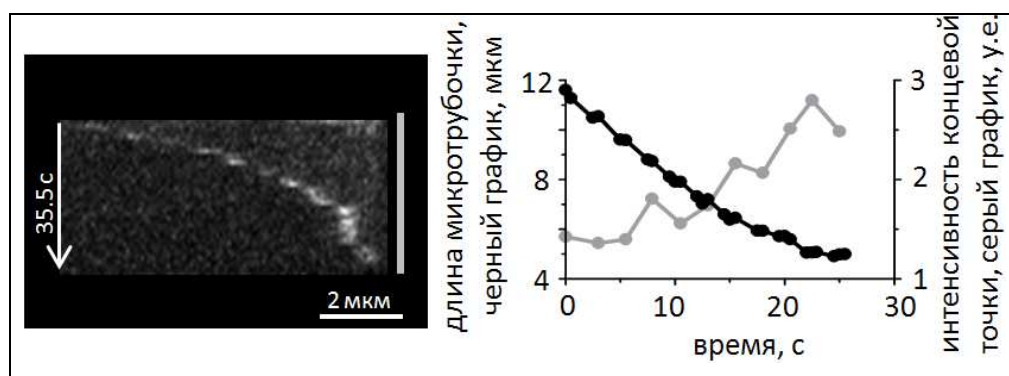


Рис. 17. **Справа** изображена кимограмма движения концевой ДАМ-пятна, состоящего из С-мутантного Dam1, при деполимеризации микротрубочки. Слева изображены графики зависимости положения концевой ДАМ-пятна относительно минус конца микротрубочки (черный) и его относительной яркости с течением времени, построенные для этой кимограммы (серый).

поэтому возникает вопрос – как же влияет отсутствие этих линкеров на движение ДАМ-колец, которые все еще образуются вокруг микротрубочек, хотя и при больших концентрациях. Для этой цели были поставлены эксперименты, в которых из аксоном, прикреплен-

ных к покровному стеклу проточной камеры, выращивались микротрубочки, растущие внутрь проточной камеры. Затем туда вмывался С-мутантный Dam1 комплекс, у которого были удалены С-концы Dam1p белков. Большинство ДАМ-пятен, образовавшихся вдоль микротрубочек, обладали довольно таки сильной диффузией и не большой яркостью, что говорит об образовании ДАМ-патчей на микротрубочках мутантным Dam1 комплексом и о его пониженных свойствах образовывать ДАМ-кольца, хотя они иногда присутствовали на микротрубочках. При этом при инициализации деполимеризации микротрубочек можно бы-

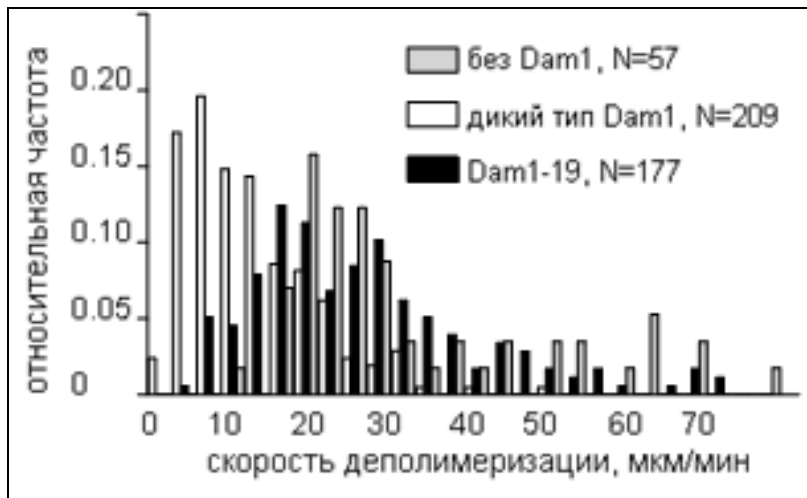


Рис. 18. Диаграммы распределения скоростей движения концевых ДАМ-пятен при деполимеризации микротрубочек для случая нативного Dam1 (белая) и С-мутантного Dam1 (черная). Также приведена диаграмма распределения скоростей деполимеризации микротрубочек в отсутствии какого бы то ни было Dam1 (серая).

ло наблюдать увеличении яркости концевое ДАМ-пятна с ростом пройденного расстояния, см. рис. 17. А средняя скорость его движения была равна  $20 \pm 1$  мкм/мин ( $N = 177$ ), т.е. очень близка к скорости разборке свободной микротрубочки, и приблизительно в три раза больше, чем для ДАМ-колец, состоящих из нативного Dam1, см. диаграмму на рис. 18. Эти экспериментальные данные говорят о том, что в природе не реализуется качественная гипотеза электростатического скольжения ДАМ-кольца [Wang, 2007].

## ВЫВОДЫ

1. На основе последних экспериментальных данных построена детальная молекулярно-механическая модель взаимодействия микротрубочки и ДАМ-кольца, включающая в себя гипотезу линкеров – белковых мостиков, соединяющих ДАМ-кольцо с микротрубочкой.
2. С помощью полученной математической модели показано, что кольцо с жесткими линкерами обладает малым КПД  $\sim 10\%$ , в то время как линкеры с маленькой изгибной жесткостью позволяют кольцу эффективно преобразовывать энергию деполимеризации микротрубочки в полезную механическую работу с КПД  $\sim 50\%$  даже при сильном связывании линкеров с поверхностью микротрубочки  $\sim 13$  кТ.
3. Показано, что в модели существует два типа движения кольца при разборке микротрубочки – по механизму диффузии со смещением при слабом связывании линкеров с микротрубочкой и по механизму силового давления при сильном связывании. При этом во втором случае наблюдается перешагивание линкеров кольца с одного сайта связывания на микротрубочке в другой подобно движению кинезинов.
4. На основе экспериментальных измерений доказано, что ДАМ-кольца двигаются по

механизму силового давления во время деполимеризации микротрубочек. Во время этого процесса наблюдается прецессия оси кольца вокруг оси микротрубочки.

5. Экспериментально показано существование ни кем ранее не описанных не кольцевых ДАМ-структур, которые в отличие от ДАМ-колец имеют большой коэффициент диффузии вдоль микротрубочки.

6. При деполимеризации микротрубочек не кольцевые ДАМ-патчи следуют за разбигающимися концами микротрубочек подобно ДАМ-кольцам.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Molodtsov M.I., Grishchuk E.L., **Efremov A.K.**, McIntosh J.R., Ataulakhanov F.I. 2005. Force production by depolymerizing microtubules: a theoretical study. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:4353-8.

2. **Efremov A.K.**, Grishchuk E.L., McIntosh J.R., Ataulakhanov F.I. 2007. In search of an optimal ring to couple microtubule depolymerization to processive chromosome motions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:19017-22.

3. **Ефремов А.К.**, Кочиков И.В., Трубецков М.К., Тихонравов А.В., Атауллаханов Ф.И., Механическая модель микротрубочки // III Съезд Биофизиков России, сборник тезисов докладов, Воронеж, 24-29 июня 2004, стр. 38.

4. E.L. Grishchuk, M.I. Molodtsov, **A.K.Yefremov**, I.S. Spiridonov, F.I. Ataulakhanov and J.R. McIntosh. 2006. Mechanisms of poleward chromosome movement. 2006. 46th annual ASCB meeting. December 9-13. San Diego, CA.

5. E.L. Grishchuk, **A.K. Efremov**, I. S. Spiridonov, V.A. Volkov, S. Westermann, I.M. Cheeseman, A. Desai, D. Drubin, G. Barnes, F.I. Ataulakhanov, J.R. McIntosh. Biomechanical design of molecular couplers that transduce microtubule depolymerization into chromosome movement. 2007. 47th annual ASCB meeting. December 1-5. Washington, DC. p. 451.

6. J. McIntosh, M. Morphew, D. Mastronarde, **A. Yefremov**, K. Zhudnikov, E. Grishchuk, F. Ataulakhanov. Kinetochore-microtubule interactions visualized by EM tomography. 2007. 47th annual ASCB meeting. December 1-5. Washington, DC. p. 603.

7. Жуденков К.В., **Ефремов А.К.**, Грищук Е.Л., МакИнтош Р., Атауллаханов Ф.И. Исследование структуры кинетохорных элементов, взаимодействующих с микротрубочкой. 11-я международная пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века", сборник тезисов докладов. Пушино, 29 октября - 2 ноября, 2007, стр. 9.