

ФИЗИКА НАШИХ ДНЕЙ

Микротрубочка — динамически нестабильный биополимер со спонтанными переключениями между фазовыми состояниями

П.Н. Захаров, В.К. Аржаник, Е.В. Ульянов, Н.Б. Гудимчук, Ф.И. Атауллаханов

Рассматривается простейший молекулярный мотор — биологическая микротрубочка, которая является примером сильно неравновесной молекулярной машины, способной испытывать спонтанные переключения между фазами медленного роста и быстрой разборки. Описываются основные свойства микротрубочки, рассматриваются различные подходы к моделированию её динамики: от статистических моделей химической кинетики до молекулярно-динамических с использованием метода Метрополиса и броуновской динамики.

Ключевые слова: микротрубочка, гуанозинтрифосфатный колпачок, математическое моделирование, динамическая нестабильность

PACS numbers: 87.10. – e, 87.16. – b, 87.16.A –

DOI: 10.3367/UFNr.2016.04.037779

Содержание

1. Введение (853).
 2. Экспериментальные данные о строении и свойствах микротрубочек (854).
2.1. Строение микротрубочек. 2.2. Экспериментальные данные о динамических и механических свойствах микротрубочек.
 3. Математическое моделирование микротрубочки (858).
3.1. Молекулярно-кинетические модели. 3.2. Молекулярные кинетико-механические модели. 3.3. Молекулярно-механические модели.
 4. Достоинства и недостатки отдельных методов (866).
 5. Заключение (867).
- Список литературы (867).

П.Н. Захаров. Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,

Ленинский просп. 38/1, 119334 Москва, Российская Федерация
E-mail: pavel.n.zaharov@gmail.com

В.К. Аржаник. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Ленинские горы 1, стр. 73, 119234 Москва, Российская Федерация
E-mail: arzhanik_work@mail.ru

Е.В. Ульянов. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Ленинские горы 1, стр. 2, 119991 Москва, Российская Федерация,
E-mail: pi-mezon@mail.ru

Н.Б. Гудимчук, Ф.И. Атауллаханов. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Ленинские горы 1, стр. 2, 119991 Москва, Российская Федерация; Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва, ул. Саморы Машела 1, 117997 Москва, Российская Федерация; Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Ленинский просп. 38/1, 119334 Москва, Российская Федерация
E-mail: nikita_gb@mail.ru, ataullakhanov.fazly@gmail.com

Статья поступила 14 марта 2016 г., после доработки 4 апреля 2016 г.

1. Введение

Живые клетки участвуют в огромном количестве разнообразных движений как на уровне всей клетки, так и на уровне процессов, происходящих внутри её. Один из наиболее ярких примеров клеточных движений представляет собой митоз — процесс, в ходе которого клетка разделяется на две дочерние [1]. Важнейшей задачей при этом является точное распределение предварительно удвоенного набора хромосом, содержащих генетическую информацию об устройстве клетки [2–4]. Для безошибочной доставки каждой копии хромосом в образующиеся новые клетки необходим специальный митотический аппарат, называемый веретеном деления [5].

Вопросы о том, как веретено деления самопроизвольно формируется внутри клетки и каким образом оно совершает механическую работу по перемещению хромосом, являются центральными вопросами биофизики митоза. Согласно современным данным ключевую роль в этом процессе играют нетривиальные динамические свойства одного из главных компонентов веретена деления — микротрубочки [6].

Микротрубочка представляет собой белковую полимерную нанотрубку диаметром около 25 нм и длиной от нескольких сотен нанометров до нескольких десятков микрометров [7–9]. Этот полимер состоит из множества одинаковых блоков — молекул белка тубулина [10]. Формирование микротрубочек является неравновесным процессом: фаза длительного медленного удлинения, в течение которой к трубке присоединяется несколько тысяч молекул тубулина, спонтанно сменяется фазой быстрого укорочения, во время которой микротрубочка, состоящая из нескольких десятков или сотен тысяч молекул, может разорваться практически полностью. Эти процессы могут повторяться с одной и той же микротрубочкой несколько десятков раз. Момент перехода к

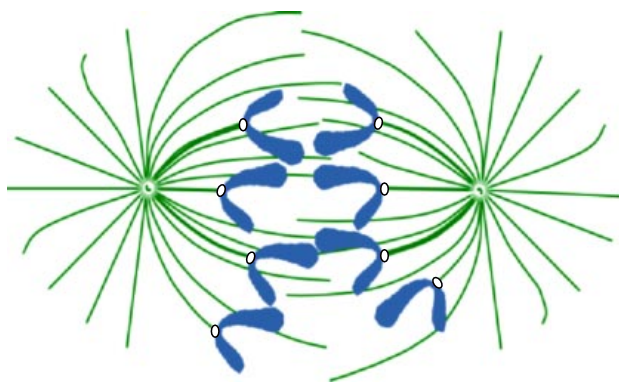


Рис. 1. (В цвете онлайн.) Схема веретена деления — аппарата для перемещения хромосом во время митотического деления клетки. Микротрубочки показаны зелёным цветом, хромосомы — синим. Микротрубочки растут из двух полюсов деления и прикрепляются к кинетохорам — крупным белковым комплексам, расположенным на каждой хроматиде (белые эллипсы с чёрным контуром).

укорочению микротрубочек называют "катастрофой", а переход их к росту — "спасением". Это свойство, называемое "динамической нестабильностью", лежит в основе функционирования митотического веретена деления.

Веретено деления построено из микротрубочек и большого количества разнообразных белков, связанных с микротрубочками и хромосомами [5]. Микротрубочки в веретене отходят из двух пространственно разделённых полюсов во все стороны (рис. 1) и вследствие динамической нестабильности непрерывно переключаются между фазами роста и укорочения. Такое поведение позволяет концам микротрубочек эффективно обследовать внутриклеточное пространство и прикрепляться к специальным участкам на поверхности каждой из двух сестринских хроматид в хромосоме — кинетохорам. После прикрепления к обоим полюсам веретена деления хромосомы под воздействием микротрубочек и моторных белков выстраиваются вдоль плоскости, перпендикулярной оси веретена. Когда каждая из хромосом окажется прикреплённой к микротрубочкам, растущим из противоположных полюсов таким образом, что один кинетохор в хромосоме прикреплён к микротрубочкам одного полюса, а другой — к микротрубочкам противоположного, начинается синхронизированное разделение хромосом. В результате сестринские хроматиды перемещаются за концами деполимеризующихся микротрубочек к противоположным полюсам клетки.

Динамическая нестабильность возникает при постоянных параметрах процесса и условий среды, включая концентрацию молекул белка, температуру и т.д. Такое поведение не наблюдается при образовании химических полимеров и противоречит термодинамике процессов вблизи состояния равновесия. Динамическая нестабильность, являющаяся результатом специальной конструкции, активно используется клеткой. Очевидно, что такая динамика может быть реализована только в сильно неравновесной системе и она сопровождается расходом химической энергии. Показано, что процесс "катастрофической" деполимеризации может быть использован для совершения работы [11–13]. Динамика микротрубочек лежит в основе механизма "поиска хромосом" для их захвата в начале митоза, а также позволяет укорачивающимся микротрубочкам переме-

щать хромосомы к полюсам клеток на завершающих стадиях митотического деления.

Механизмы, лежащие в основе динамической нестабильности микротрубочек — сосуществования двух состояний при неизменных внешних условиях, активно исследуются в течение уже более трёх десятилетий [14]. Их изучение необходимо как для выяснения фундаментальных вопросов механики клеточного деления, так и для получения возможности управлять этим процессом в медицинских целях, например для подавления деления клеток опухолей. Кроме того, микротрубочка — яркий пример сильно неравновесной молекулярной машины — по сути, простейшего молекулярного мотора. Это делает динамику микротрубочек чрезвычайно интересным физическим явлением.

2. Экспериментальные данные о строении и свойствах микротрубочек

2.1. Строение микротрубочек

Микротрубочки представляют собой структуры, образованные из гетеродимеров белка тубулина (рис. 2). Гетеродимеры состоят из α - и β -мономеров тубулина. Линейные цепочки молекул тубулина, называемые протофиламентами, расположены по образующей полого цилиндра диаметром около 25 нм.

Связи между тубулинами внутри одного протофиламента называются продольными или *лонгитудинальными*, а связи между тубулинами в соседних протофиламентах — боковыми или *латеральными*. В клетке

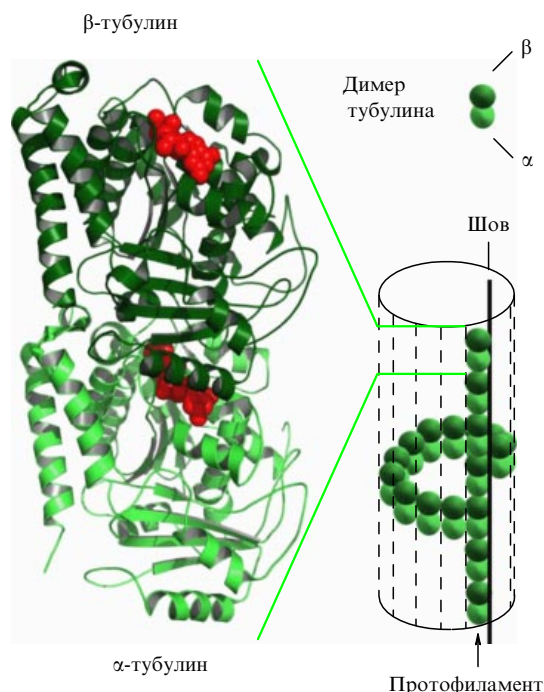


Рис. 2. (В цвете онлайн.) Строение микротрубочки. В левой части рисунка показана трёхмерная структура гетеродимера тубулина (PDB ID: 1JFF), в правой части рисунка — положение в решётке микротрубочки структурной субъединицы — гетеродимера тубулина. Красным цветом показаны молекулы ГТФ, связанные с каждым мономером, тёмно-зелёным — β -мономеры, светло-зелёным — α -мономеры. Шов, на котором происходит взаимодействие β - и α -мономеров, отмечен стрелкой.

микротрубочки имеют фиксированное число протофиламентов — 13, в то время как в растущих микротрубочках *in vitro* число протофиламентов колеблется от 10 до 18 [15, 16]. Микротрубочка имеет полярность: конец, который завершается β -субъединицами, называется плюс-концом, а противоположный конец с α -субъединицами на краю — минус-концом. Примечательно, что плюс- и минус-концы имеют разные характеристики: плюс-концы быстрее удлиняются, чем минус-концы, но медленнее укорачиваются [17–19]. Полярность микротрубочки также определяет направление движения таких моторных белков, как, например, кинезины [20], которые перемещаются в строго определённом направлении вдоль микротрубочки, используя для перемещения энергию гидролиза аденозинтрифосфата (АТФ).

Другое интересное структурное свойство микротрубочки — спиральность. Протофиламенты связаны между собой таким образом, что один виток по окружности микротрубочки происходит со сдвигом в три мономера (рис. 2). В основном все боковые поверхности протофиламентов соединены латерально, так что α -мономеры одного протофиламента взаимодействуют α -мономерами соседнего, а β -мономеры — с β -мономерами соседнего. Но нечётный шаг спирали приводит к тому, что в микротрубочке между одной парой протофиламентов образуется так называемый *шов* — область решётки микротрубочки, в которой происходит латеральное взаимодействие между α - и β -мономерами [21]. Неизвестно, есть ли у шва какие-нибудь молекулярные особенности и играют ли они какую-либо роль в функционировании микротрубочек.

Процесс роста микротрубочки представляет собой последовательное присоединение новых молекул тубулина к торцу любого протофиламента в случайном порядке. Это представление подтверждается результатами криоэлектронной микроскопии [22, 23], согласно которым концы растущих микротрубочек имеют прямую форму [24–26].

Изображения концов разбирающихся микротрубочек показывают, что димеры на конце сначала закручиваются в кольца, а только потом диссоциируют [24–26]. На основании этих данных был сделан вывод о том, что лонгитудинальные связи сильнее, чем латеральные, который объясняет, почему разборка происходит за счёт быстрого расщепления латеральных связей и только затем происходит разрыв лонгитудинальных связей. В этом случае от трубочки могут сразу отщепляться довольно большие фрагменты протофиламентов, вследствие чего скорость укорочения оказывается значительно больше скорости роста.

2.2. Экспериментальные данные о динамических и механических свойствах микротрубочек

Как упоминалось во введении, при наблюдении за ростом микротрубочек было сделано важное открытие: фаза медленного роста микротрубочек может спонтанно сменяться фазой их быстрой деполимеризации и наоборот [27]. На рисунке 3а, где приведён пример динамики одиночной микротрубочки, отчётливо видны "катастрофы" и "спасения".

Вообще говоря, в любом процессе обратимой полимеризации есть флуктуации скорости роста. Иногда флуктуации могут быть настолько велики, что полимер будет даже укорачиваться. Может быть, наблюдаемые

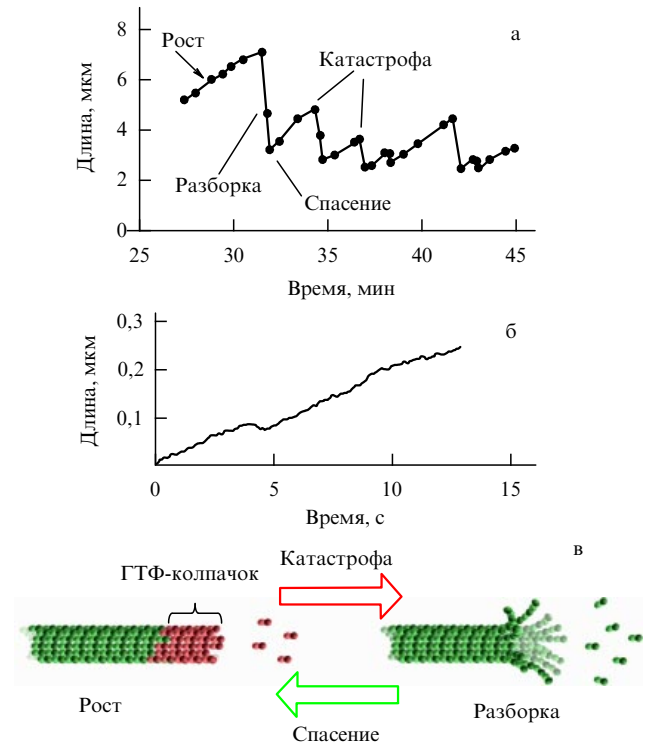


Рис. 3. Фазы динамической нестабильности микротрубочки. (а) Зависимость длины микротрубочки от времени, иллюстрирующая последовательно сменяющие друг друга фазы роста и укорочения микротрубочки. Наблюдение сделано методом микроскопии тёмного поля (данные из статьи [18]). (б) Зависимость скорости роста микротрубочки от времени в модели [28]. (в) Схема переключения микротрубочки между фазами роста и разборки.

катастрофы и спасения — это просто те самые термальные флуктуации? На рисунке 3б приведены результаты расчёта в рамках описанной ниже молекулярно-динамической модели, учитывающей термальные флуктуации [28]. Рассмотрен случай, в котором тубулины присоединяются и отсоединяются поштучно, как при полимеризации одноцепочечного полимера. Хорошо видно, что флуктуации роста существуют, но их амплитуда несоизмеримо меньше, чем укорочение, которое наблюдается после катастрофы.

Рост микротрубочки происходит благодаря присоединению к её концу димеров тубулина. Каждый мономер тубулина в димере связан с молекулой гуанозинтрифосфата (ГТФ). Вскоре после присоединения димера тубулина к микротрубочке связанная с β -мономером молекула ГТФ гидролизует и преобразуется в молекулу гуанозиндифосфата (ГДФ) [29, 30], в то время как другая молекула ГТФ в α -тубулине никогда не подвергается гидролизу [31]. Однако димеры, находящиеся в растворе, практически не гидролизуют ГТФ [32]. Гидролиз ГТФ сопровождается высвобождением значительного количества химической энергии. По-видимому, именно эта энергия и отвечает за "дестабилизацию" микротрубочки, делая систему термодинамически неравновесной.

Согласно современным представлениям молекулярный механизм, обеспечивающий способность микротрубочки время от времени переходить от фазы роста к фазе быстрой деполимеризации, связан с запасанием энергии, выделяющейся при гидролизе ГТФ, в виде напряжённой

конформации мономеров тубулина в теле трубки. Микротрубочка растёт в результате присоединения связанных с молекулой ГТФ димеров тубулина, которые выпрямлены в растворе. После присоединения к микротрубочке в димере происходят изменения конформации белка, вызывающие гидролиз ГТФ и высвобождение химической энергии молекулы ГТФ. Считается, что эта энергия не выделяется в виде тепла, а приводит к изменению равновесной конформации ГДФ-тубулина [6]. Однако тот факт, что молекула связана с соседями в стенке микротрубочки, не позволяет ей отрелаксировать в эту новую конформацию. Значит, к концу растущей микротрубочки постоянно присоединяются всё новые димеры в одной конформации (ГТФ), а почти всё тело микротрубочки начиная с некоторого расстояния от конца состоит из молекул в другой конформации (ГДФ). Поэтому большая часть микротрубочки оказывается неустойчивой, механически напряжённой.

Вследствие постоянного присоединения ГТФ-димеров к концу микротрубочки на нём почти всегда присутствует некоторое количество димеров, ещё не успевших гидролизовать молекулу ГТФ. Образующийся таким образом богатый ГТФ-димерами участок называется ГТФ-колпачком (рис. 3в). Он опоясывает конец микротрубочки и тем самым не даёт возможности отрелаксировать большей части димеров микротрубочки, уже перешедших в напряжённое состояние, предохраняя тем самым микротрубочку от разборки.

Детальный механизм работы ГТФ-колпачка остаётся предметом споров. Согласно классической модели ГТФ-димеры тубулина стабилизируют микротрубочку благодаря тому, что лонгитудинально связанные ГТФ-димеры стремятся образовать прямую линейную цепь, в то время как ГДФ-димерам энергетически выгодно изогнуться в "рожок" с радиусом кривизны около 20 нм [26, 33–35]. Альтернативная гипотеза предполагает, что оба вида тубулина (ГТФ и ГДФ) имеют примерно одинаковую изогнутую конформацию, а стабилизация микротрубочки ГТФ-димерами происходит из-за наличия между ними более сильных латеральных связей по сравнению с таковыми в ГДФ-димерах тубулина [36].

Таким образом, ключевая роль гидролиза ГТФ и важность сопутствующих этому процессу конформационных изменений в тубулине не подвергаются сомнению [37]. Действительно, микротрубочки, полимеризующиеся в присутствии негидролизованного аналога ГТФ, непрерывно растут и не испытывают катастроф [38]. Однако микротрубочки, состоящие из ГДФ-димеров, являются крайне нестабильными и испытывают разборку. В пользу последнего утверждения говорят результаты опытов с разрезанием микротрубочки сфокусированным ультрафиолетовым излучением или тонкой иглой [33, 39] — в этих опытах микротрубочки после отрезания их терминальных слоёв немедленно разбирались со стороны плюс-конца.

В настоящее время остаются в сильной степени неопределёнными константа и механизм гидролиза ГТФ. В связи с этим в научном сообществе пока не сложилось единого мнения о количестве ГТФ-димеров на растущем конце микротрубочки: оценки разнятся от одного слоя до нескольких десятков слоёв. В пользу малого размера ГТФ-колпачка свидетельствуют следующие данные.

Во-первых, ранние попытки детектировать наличие ГТФ-тубулина в микротрубочке биохимическими мето-

дами не увенчались успехом. Это даёт основания предполагать, что количество ГТФ-тубулинов внутри микротрубочки настолько мало, что оно находится за гранью чувствительности используемых методов его обнаружения [40, 41].

Во-вторых, были проведены эксперименты, в которых сначала полимеризовали микротрубочки при разных концентрациях тубулина, а затем резко разбавляли свободный тубулин с целью определить, насколько быстро микротрубочка перейдёт к разборке [42, 43]. Идея авторов эксперимента заключалась в том, что если количество ГТФ-субъединиц возрастает с увеличением концентрации, то и время перехода к разборке после разбавления свободного тубулина должно пропорционально увеличиваться. Однако это предположение не подтвердилось, что было интерпретировано как свидетельство того, что ГТФ-колпачок всегда сохраняет один и тот же малый размер. Последнее хорошо объясняло и наблюдаемую слабую зависимость частоты катастроф микротрубочек от концентрации тубулина в растворе [44]. И наконец, с помощью негидролизованного аналога ГТФ было продемонстрировано, что одного слоя ГТФ-тубулина достаточно для стабилизации микротрубочки, препятствующей её разборке [45, 46].

Однако имеется также ряд доводов в пользу существования ГТФ-колпачка с размером, значительно большим, чем в один слой. Во-первых, стало известно, что во время роста микротрубочки её конец часто локально укорачивается более чем на 40 нм (пять слоёв) без наступления катастрофы [47]. Во-вторых, было обнаружено, что белок EB1 (end-binding protein 1), предположительно связывающийся преимущественно с ГТФ-тубулинами в составе микротрубочки [48], распознаёт участок длиной в несколько десятков слоёв на конце микротрубочки [49]. При этом размер ГТФ-колпачка, оценённый с помощью EB1, возрастает с увеличением скорости роста микротрубочки, вызванным повышением концентрации тубулина, что противоречит модели о неизменном относительном ГТФ-колпачке.

Из экспериментально полученных *in vitro* зависимостей частоты катастроф от времени стало ясно, что вероятность перехода микротрубочки от роста к разборке увеличивается со временем [50, 51]. То есть более "молодые" микротрубочки с меньшей вероятностью склонны испытать катастрофу, чем более "старые" (рис. 4).

Феномен увеличения частоты катастроф со временем получил название "старение". Задержка во времени до наступления катастрофы у "молодых" микротрубочек говорит о том, что этот процесс носит многостадийный характер. Известно, что дифференциальное распределение времён наступления событий, характеризующихся одностадийным процессом, подчиняется экспоненциальному закону, в то время как неэкспоненциальная форма распределения говорит о многостадийности наблюдаемого процесса [52]. Экспериментально показано, что распределение времён жизни микротрубочки имеет форму, описываемую гамма-распределением [50]. То есть микротрубочке, прежде чем она испытает катастрофу, надо пройти через несколько последовательно сменяющихся стадий. И чем дольше "прожила" микротрубочка, тем на более поздней стадии она находится и тем более вероятно, что она разберётся. Если бы этот процесс был одностадийным, то не было бы задержки во времени катастрофы для микротрубочек в начале роста и зависи-

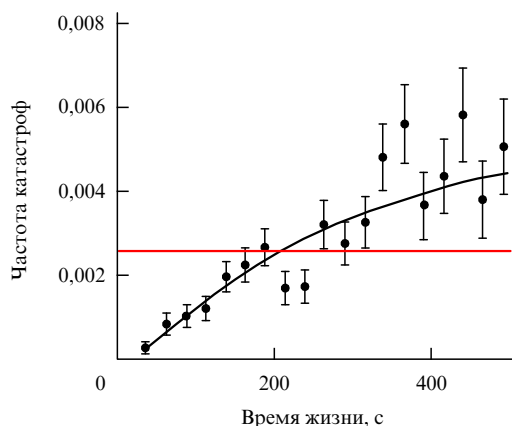


Рис. 4. (В цвете онлайн.) Зависимость частоты катастроф от времени (кружки с отрезками ошибок) — данные из работы [47], полученные в эксперименте *in vitro*. Точки для данной зависимости рассчитаны по формуле $Y = (f(t))/(1 - F(t))$, где $F(t)$ — интегральное распределение времён жизни микротрубочки, $f(t)$ — функция плотности вероятности наступления катастрофы (первая производная от $F(t)$). Красная прямая показывает, как выглядела бы зависимость при отсутствии "старения".

мость частоты катастроф от времени была бы постоянной (см. горизонтальную прямую на рис. 4) [51]. До сих пор окончательно не выяснено, что представляют собой множественные события, приводящие к катастрофе микротрубочек. Было высказано предположение, что в микротрубочке в процессе её роста могут возникать некие дестабилизирующие её дефекты [51, 53]. При этом, однажды возникнув, такие дефекты не исчезают, а накопление трёх дестабилизирующих дефектов приводит к катастрофе. Высказывалась также гипотеза о том, что одному дефекту может соответствовать случайно возникшая во время роста неспособность отдельного протофиламента связывать тубулин (рис. 5а). Другой вариант дестабилизирующего события — последовательное изменение структуры растущего конца микротрубочки [54]. Согласно этой альтернативной гипотезе конец микротрубочки в процессе его роста "заостряется" вследствие накопления разницы в длинах отдельных протофиламентов, и когда степень его заострённости становится критической, микротрубочка испытывает катастрофу (рис. 5б).

Какие-либо данные расчётов в рамках многопротофиламентных моделей или экспериментов, свидетельствующие в пользу гипотезы о трёх необратимых дестабилизирующих дефектах, в работах [51, 53] отсутствуют. В то же время в работе [54] в поддержку альтернативной гипотезы (о последовательном изменении растущего конца микротрубочки) приводятся данные математического моделирования и результаты экспериментов по оценке заострённости конца микротрубочки с помощью флуоресцентной микроскопии и электронных микрофотографий. Однако экспериментальные результаты работы [54] не нашли подтверждения в более поздних работах (см., например, [55]). Кроме того, результаты статистического анализа экспериментальных данных [56] не показывают достоверного монотонного увеличения заострённости конца микротрубочек со временем [28].

В результате катастрофы существенно меняется структура конца микротрубочки: его примерно цилиндрическая форма переходит в форму венчика с радиально

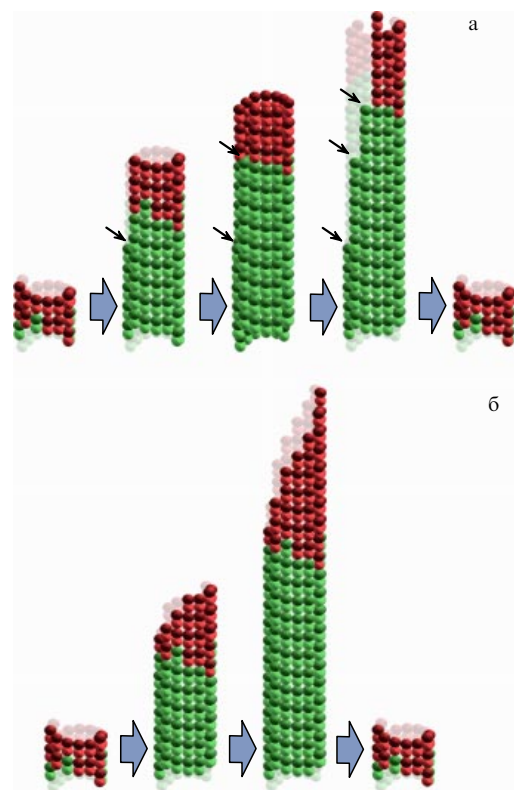


Рис. 5. Гипотезы, предложенные для описания "старения" микротрубочек. (а) Три последовательно накапливающихся необратимых дефекта приводят к катастрофе. (б) Непрерывно увеличивающаяся со временем заострённость микротрубочки дестабилизирует её и также приводит к катастрофе.

отогнутыми протофиламентами (рис. 3в). Сравнительно недавно было показано, что такое изменение формы конца микротрубочки имеет чрезвычайно важную, так как позволяет деполимеризующейся микротрубочке работать как молекулярный мотор, развивающий силу. Так, в экспериментах *in vitro* удалось непосредственно наблюдать, как отгибающиеся протофиламенты микротрубочки толкают микросферы, прикреплённые к их стенке [57]. Сила этих толчков была измерена с помощью оптического пинцета, представляющего собой сфокусированный луч лазера, способный втягивать в себя диэлектрические объекты размером порядка длины волны (рис. 6а). Поскольку в данных измерениях сила, развиваемая одним или двумя протофиламентами разрывающейся микротрубочки, прикладывается к поверхности микросферы, условием равновесия является равенство моментов сил микротрубочки и оптического пинцета:

$$F_{\text{опт}}R = F_{\text{МТ}}l. \quad (1)$$

Здесь $F_{\text{опт}}$ — измеряемая оптическая сила, стремящаяся вернуть микросферу в центр ловушки, R — плечо этой силы, равное радиусу микросферы (250 нм), $F_{\text{МТ}}$ — сила, развиваемая деполимеризующейся микротрубочкой, l — плечо силы $F_{\text{МТ}}$, примерно равное отклонению изогнутого протофиламента от стенки микротрубочки (≈ 20 нм). Так как плечо силы микротрубочки оказывается приблизительно в 10 раз больше плеча оптической силы, измеряемый оптическим пинцетом силовой

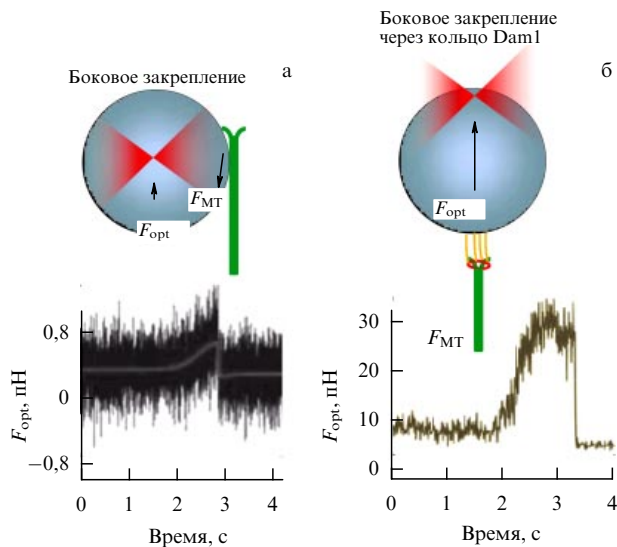


Рис. 6. (В цвете онлайн.) Эксперименты по измерению силы, развиваемой деполимеризующейся микротрубочкой. Микротрубочка показана зелёным цветом, лазерный луч — красным, измерительная микросфера — голубым. (а) Измерение силы отдельных протофиламентов при боковом закреплении микросферы за микротрубочку. (Данные из статьи [57]). (б) Измерение силы всех протофиламентов деполимеризующейся микротрубочки при торцевом закреплении микросферы через кольцо Dam1 комплекса. (Данные из статьи [13].)

сигнал сравнительно невелик. Однако с учётом соотношения плеч сила толчка одного протофиламента составляет около 2,5–5 пН.

В другой серии опытов конфигурация измерений была изменена, что позволило определить силу, развиваемую не отдельным протофиламентом, а всей микротрубочкой в условиях, имитирующих клеточные [13]. Для этого измерительная микросфера подвешивалась к микротрубочке на белковом кольце комплекса Dam1 с искусственно созданными белковыми линкерами (рис. 6б). Предположительно, очень близким образом устроено закрепление микротрубочки за хромосому в дрожжевых клетках, где роль кольца играет всё тот же белковый комплекс Dam1, а линкерами, скорее всего, служат белки комплекса NDC80 [58]. Такое изменение конфигурации измерения привело к многократному увеличению регистрируемого силового сигнала.

Проведённые в [13] измерения позволили оценить силу, развиваемую микротрубочкой, величиной порядка 30 пН с учётом неидеальности сопрягающего устройства в виде кольца Dam1 (коэффициент полезного действия ~ 40–50%). В масштабе клетки данная сила является очень существенной и многократно превосходит максимальную силу, развиваемую моторными белками кинезином (~ 7 пН [59]) и динеином (~ 1–7 пН [60,61]), ответственными за перемещение многих внутриклеточных грузов по микротрубочкам.

Таким образом, можно предположить, что микротрубочки являются основным источником механической работы по перемещению хромосом. Это предположение подтверждается также опытами, в которых клетки дрожжей были генетически лишены всех минус-концевых моторных белков, но хромосомы, тем не менее, продолжали успешно перемещаться в митозе с той же приблизительно скоростью, видимо, благодаря исключительно деполимеризации микротрубочек [62, 63].

Таким образом, уже накоплен целый ряд экспериментальных наблюдений о динамике, структуре и механике микротрубочек, которые должны учитываться при построении теоретических моделей динамически нестабильного поведения микротрубочек. К основным экспериментальным наблюдениям мы относим следующие: 1) структурные данные о формах концов растущих и разбирающихся микротрубочек; 2) зависимости скоростей роста и разборки, а также частот катастроф и спасений микротрубочек от концентрации тубулина в растворе; 3) данные по наблюдению разборки микротрубочек после резкого разбавления свободного тубулина; 4) распределение времён полимеризации микротрубочек, так называемый феномен "старения" микротрубочек; 5) данные, свидетельствующие о способности деполимеризующихся микротрубочек развивать существенные силы.

3. Математическое моделирование микротрубочки

Для того чтобы увязать воедино большое количество часто, на первый взгляд, противоречивых данных о динамике и структурных свойствах микротрубочки, активно используется математическое моделирование. С момента открытия феномена динамической нестабильности микротрубочек многократно проводилось моделирование этих филаментов [12, 53, 54, 64–81].

В недавнем обзоре [53] показано, что аналитические недискретные модели (не рассматривающие микротрубочку на уровне субъединиц) и дискретные однопротофиламентные стохастические модели динамики микротрубочек в принципе неспособны полноценно описать структуру, механику и динамическую нестабильность микротрубочек. Поэтому в настоящем обзоре вышеуказанные модели не обсуждаются и всё внимание уделяется моделям, в которых микротрубочки, состоящие из 13 протофиламентов, рассматриваются со степенью детализации на уровне отдельных димеров.

В рассматриваемых наиболее подробных моделях элементарной субъединицей является димер (иногда мономер) тубулина. Субъединицы тубулина могут присоединяться к микротрубочке, отсоединяться от неё и изменять своё нуклеотидное состояние в результате гидролиза ГТФ. Присоединение новых субъединиц тубулина на конце микротрубочки в указанных моделях происходит по одному из двух типов: 1) субъединица может присоединиться только там, где она образует и латеральную, и лонгитудинальную связи [64–67, 69] (рис. 7а); 2) для присоединения необходимым и достаточным считается образование только лонгитудинальной связи, и поэтому субъединицы могут присоединяться лонгитудинально ко всем протофиламентам микротрубочки [74]. Отсоединение субъединиц может не учитывать последовательного разрыва латеральной и лонгитудинальной связей [64–67, 69] либо, напротив, рассматривать в явном виде разрыв сначала латеральной связи, а затем лонгитудинальной [54, 70, 75, 80].

Изменение нуклеотидного состояния и, соответственно, свойств субъединиц происходит в соответствии с постулируемыми в моделях правилами гидролиза ГТФ. В литературе предложено и рассмотрено три основных правила гидролиза:

1) полностью случайный гидролиз [64, 82], в котором каждый ГТФ-димер в стенке микротрубочки может

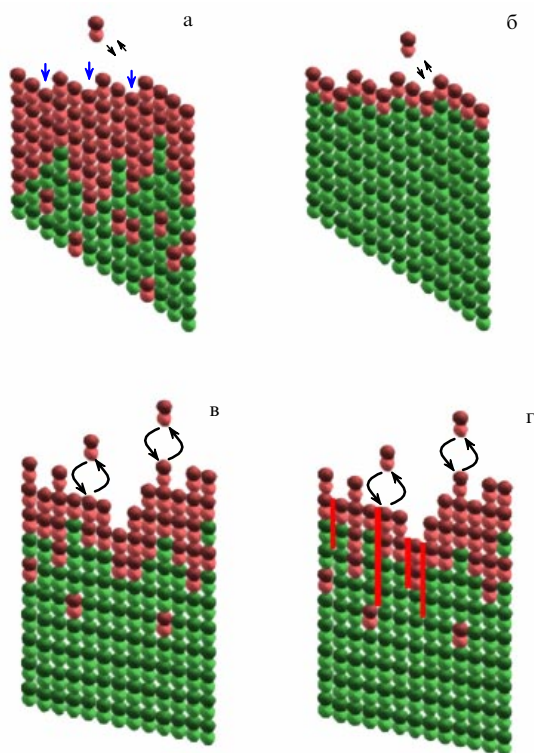


Рис. 7. (В цвете онлайн.) Схемы молекулярно-кинетических моделей микротрубочки. Микротрубочки показаны в развёрнутом виде. Зелёным цветом изображены ГДФ-тубулины, красным — ГТФ-тубулины. (а) Модель Чена и Хилла [64] (стрелками показаны участки, к которым может присоединиться субъединица тубулина). (б) Модель Бейли с соавторами [65–67]. (в) Модель Ван Бюрена с соавторами [74]. (г) Модель Марголина с соавторами [80]. Красными линиями показаны участки между протофиламентами, на которых разорваны латеральные связи.

гидролизовать молекулу ГТФ с одинаковой вероятностью;

2) индуцированный гидролиз [66], когда гидролиз ГТФ в данной молекуле происходит сразу после присоединения нового димера поверх неё вдоль того же протофиламента;

3) векториальный гидролиз [78, 83, 84], который происходит только на границе ГТФ/ГДФ-димеров вдоль оси микротрубочки.

В отличие от перехода ГТФ-димеров в ГДФ-состояние в соответствии с правилами 1 и 2, переход ГТФ-димеров в ГДФ-состояние при векториальном гидролизе (правило 3) происходит в виде бегущей с постоянной скоростью волны со стороны участка начала роста по направлению к растущему концу микротрубочки. Однако недавно было показано, что правило 3 является нежизнеспособным, поскольку катастрофы микротрубочек в моделях с векториальным гидролизом могут наблюдаться только в нереалистично узком диапазоне концентраций тубулина [53].

Были также предложены модели, в которых правила гидролиза являются комбинацией трёх вышеуказанных. К таким моделям относятся гибридная модель, совмещающая индуцированный и случайный гидролиз [85], а также гибридная модель, совмещающая векториальный и случайный гидролиз [68, 86].

По алгоритму расчётов можно выделить три основных класса моделей: молекулярно-кинетические, молеку-

лярные кинетико-механические и молекулярно-механические.

Молекулярно-кинетические модели (для краткости будем называть их также *кинетическими*) описывают эволюцию микротрубочки как последовательность дискретных переходов присоединения/отсоединения димеров и гидролиза. В таких моделях используется кинетический метод Монте-Карло [64–67, 69, 74, 80, 87], в рамках которого каждому элементарному событию ставится в соответствие своя фиксированная вероятность. При этом общее количество элементарных событий ограничено числом введённых параметров.

Молекулярно-механические модели используют информацию о положении субъединиц микротрубочки во времени и энергетические характеристики взаимодействия молекул для непрерывного набора состояний [12, 70, 71, 75]. Этот подход требует гораздо больших вычислительных ресурсов, но даёт возможность описывать влияние всевозможных геометрических и нуклеотидных состояний микротрубочки на отсоединение димеров [26, 88], тем самым позволяя не ограничиваться несколькими фиксированными вероятностями.

Молекулярные *кинетико-механические* модели представляют собой комбинацию кинетических и механических моделей.

В разделах 3.1–3.3 мы систематически рассмотрим основные классы моделей динамики микротрубочек, различающиеся по своим алгоритмам и степени детализации, а также обсудим, как менялись требования к моделям в связи с необходимостью описания новых экспериментальных данных.

3.1. Молекулярно-кинетические модели

Традиционно наиболее детальный метод описания эволюции системы химически взаимодействующих частиц — это метод молекулярно-динамических расчётов, так как он в явном виде учитывает тепловые флуктуации, а химические реакции при этом рассматриваются как отдельные физические взаимодействия. Поскольку реакции происходят в результате случайных соударений диффундирующих молекул, эволюция системы взаимодействующих частиц является не детерминированной, а стохастической.

Часто стохастичностью на уровне соударений отдельных молекул пренебрегают, как, например, в химической кинетике, и рассматривают детерминированное изменение концентраций или количества молекул реагентов. Основным уравнением, описывающим химические превращения, в этом случае является закон действующих масс, система дифференциальных уравнений следующего вида:

$$\frac{dX_i}{dt} = f_i(X_1, \dots, X_N), \quad i = 1, \dots, N, \quad (2)$$

где X_i — число молекул i -го вещества из набора реагирующих веществ S_i ($i = 1, \dots, N$), f_i — функции, зависящие от специфики реагирующих веществ.

Однако если количество реагирующих молекул хотя бы одного из компонентов достаточно мало, то стохастичность может вносить очень значительный вклад в процесс. В случае микротрубочки присоединение новых димеров происходит на торце, и поэтому число взаимодействующих в микротрубочке димеров с теми, что диффундируют в растворе, равно всего 13. Следовательно,

пренебречь стохастичностью и рассмотрением отдельных взаимодействий не представляется возможным [89]. Далее будут описаны методы, с помощью которых моделируется динамика микротрубочки на уровне отдельных взаимодействий.

Одним из наиболее часто применяемых алгоритмов в моделировании микротрубочки является кинетический метод Монте-Карло. Для пояснения этого метода рассмотрим хорошо перемешиваемую систему из N молекул различных реагентов $\{S_1, \dots, S_N\}$, которые взаимодействуют посредством M реакций $\{R_1, \dots, R_M\}$. Пусть система находится в некотором фиксированном объёме Ω при постоянной температуре. Обозначим количество молекул вещества S_i в момент времени t как $X_i(t)$. Ставится задача описать вектор состояния $\mathbf{X}(t) = (X_1(t), \dots, X_N(t))$ в каждый момент времени, если известен вектор состояния в начальный момент времени, $\mathbf{X}(t_0) \equiv \mathbf{x}_0$.

Каждый набор реакций можно характеризовать двумя следующими величинами: $\mathbf{v}_j \equiv (v_{1j}, \dots, v_{Mj})$, где v_{ij} — приращение количества молекул S_i , вызванное реакцией R_j . То есть если система находится в состоянии \mathbf{x} , то после завершения реакции R_j она переходит в состояние $\mathbf{x} + \mathbf{v}_j$. Другая величина, характеризующая реакцию R_j , — это вероятность в единицу времени a_j , т.е.

$$a_j(\mathbf{x}) dt \text{ — вероятность того, что в состоянии } \mathbf{X}(t) = \mathbf{x} \text{ произойдёт реакция в течение бесконечно малого интервала времени } [t, t + dt]. \quad (3)$$

Физический смысл величины $a_j(\mathbf{x})$ можно объяснить следующим образом. Для реакции типа $S_1 \rightarrow \dots$, в которой участвует одно вещество, существует константа c_j , такая, что $c_j dt$ является вероятностью превращения молекулы S_1 на следующем бесконечно малом шаге по времени dt . Если всего в реакционной смеси находится x_1 молекул вида S_1 , то вероятность одной из них вступить в реакцию на следующем интервале времени dt равна $x_1 c_j dt$. Таким образом, функция $a_j(\mathbf{x}) = x_1 c_j$.

Если имеется два реагирующих вещества, а R_j — реакция вида $S_1 + S_2 \rightarrow \dots$, то существует такая константа c_j , при которой величина $x_1 x_2 c_j dt$ равна вероятности вступления в реакцию какой-либо одной пары молекул, $S_1 - S_2$, на временном интервале dt , где x_1, x_2 — количество молекул вида S_1, S_2 . Тогда $a_j(\mathbf{x}) = x_1 x_2 c_j$. При этом для реакции $S_1 \rightarrow \dots$ величина c_j численно равна константе реакции k_j , а в случае различных реагирующих веществ $S_1 + S_2 \rightarrow \dots$ $c_j = k_j/\Omega$ [87, 89–91]. Для одинаковых реагирующих молекул $c_j = 2k_j/\Omega$.

Нас интересует условная вероятность перехода системы в состояние $\mathbf{X}(t) = \mathbf{x}$ из состояния $\mathbf{X}(t_0) = \mathbf{x}_0$. В методе Монте-Карло в численном виде находят стохастические траектории $\mathbf{X}(t)$ вместо аналитического нахождения функции плотности вероятности $F_{\mathbf{X}(t)}$. Для этого используют функцию вероятности

$$p(\tau, j|\mathbf{x}, t) dt \text{ — вероятность того, что в состоянии } \mathbf{X}(t) = \mathbf{x} \text{ произойдёт реакция в течение бесконечно малого интервала времени } [t + \tau, t + \tau + dt] \text{ и этой реакцией будет } R_j. \quad (4)$$

Точная формула для $p(\tau, j|\mathbf{x}, t)$ имеет вид [87, 91]

$$p(\tau, j|\mathbf{x}, t) = a_j(\mathbf{x}) \exp(-a_0(\mathbf{x}) \tau), \quad (5)$$

где

$$a_0(\mathbf{x}) = \sum_{j=1}^M a_j(\mathbf{x}). \quad (6)$$

Уравнение (5) является математической основой для моделирования с помощью стохастической химической кинетики. В (5) τ — экспоненциально распределённая случайная величина со средним значением, равным стандартному отклонению: $1/a_0(\mathbf{x})$, при этом j — статистически независимая случайная целочисленная величина с условной вероятностью $a_j(\mathbf{x})/a_0(\mathbf{x})$ (по сути, вес отдельного события).

Применительно к описанию эволюции микротрубочки используются следующие величины: параметр $j = 1, 2, 3$ — одно из трёх событий (присоединения, отсоединения либо гидролиза ГТФ), $a_j(\mathbf{x}) \equiv k_j$ — характерное время наступления каждого из возможных событий. Численный метод нахождения стохастической траектории эволюции микротрубочки $\mathbf{X}(t)$ основывается на формуле (5). Для этого делаются следующие шаги:

1) проводится инициализация времени $t = t_0$ и начального состояния системы $\mathbf{x} = \mathbf{x}_0$;

2) для каждого i -го мономера и возможного j -го элементарного события генерируется случайная величина r_{ij} , равномерно распределённая на интервале от 0 до 1;

3) находят все времена для каждого элементарного события:

$$t_{ij} = -\frac{\ln(1 - r_{ij})}{k_{ij}}; \quad (7)$$

4) произошедшим считается то событие, которому соответствует меньшее время t_{ij} ;

5) в соответствии с принятым событием обновляется конфигурация системы и производится замена $t \rightarrow t + t_{ij}$;

6) повторяются шаги 2–5.

Данный подход к описанию динамики микротрубочки был применён в работах Чена и Хилла [14, 64, 92]. В модели [64] 1985 года микротрубочка представлена спиралью из 13 протофиламентов со сдвигом в пять субъединиц на шве. В этой модели субъединицы могут встраиваться либо диссоциировать только единичными димерами и отсутствует отдельное рассмотрение разрыва латеральной и лонгитудинальной связей при диссоциации (рис. 7а). Димеры не могут также находиться на конце микротрубочки без обязательного наличия лонгитудинального соседа, и хотя бы одного латерального соседа. В модели использовано правило случайного гидролиза, т.е. гидролиз ГТФ происходит с некоторой вероятностью в любом месте микротрубочки: и в терминальном слое димеров, и в теле. Хотя в модели имеется возможность рассмотрения отдельных вероятностей перехода ГТФ – ГДФ в зависимости от положения димера, константы для этого перехода выбраны одинаковыми вдоль всей микротрубочки.

С помощью такого простого подхода были воспроизведены переходы между состояниями роста и укорочения, описана известная на тот момент зависимость усреднённой скорости полимеризации тубулина от его концентрации в растворе. Данные о динамике индивидуальных микротрубочек в то время отсутствовали, поэтому модель к ним не применялась.

Для того чтобы описать результаты новых экспериментов, в частности недавно обнаруженную слабую

зависимость времени перехода микротрубочек к деполимеризации после разбавления свободного тубулина, Бейли с соавторами предложили другую модель, с индуцированным правилом гидролиза, в которой ГТФ-тубулины находились строго только в терминальном слое, независимо от концентрации свободного тубулина (рис. 7б) [65, 66, 69]. Эта модель успешно описала опыты с разбавлением и слабую зависимость частот катастроф микротрубочек от концентрации тубулина.

Однако указанные кинетические модели имели один общий недостаток — в них не учитывалась конформация конца микротрубочки, а значит, они не могли описать структурные данные, соответствующие различным фазам роста микротрубочки. Попытка провести качественный учёт конфигурации конца микротрубочки была сделана в работе Ван Бюрена с соавторами 2002 года [74] (рис. 7в). Эта модель является существенным шагом вперёд по сравнению с предыдущими моделями и, по сути, она стала переходным этапом к последующим механистическим способам описания динамики микротрубочки. Модель [74] уже полностью соответствует современному представлению о решётке микротрубочки — как о решётке Б-типа, трёхзаходной левозакрученной спирали. Модель предполагает, что для присоединения молекул тубулина достаточно образования только одной лонгитудинальной связи.

Каждой связи в данной модели поставлена в соответствие энергия, зависящая от нуклеотидного состава димеров, участвующих во взаимодействии. То есть вероятность диссоциации димера зависит от того, гидролизован ли связанный с ним нуклеотид, и от количества образованных связей.

В работе [74] впервые была сделана попытка учесть влияние закручивающихся олигомеров на конце микротрубочки на динамическую нестабильность, при этом предполагалось, что формирование раскрывающегося венчика на конце микротрубочки необходимо для поддержания фазы разборки. Поскольку быстро разбирающаяся микротрубочка имеет на конце закручивающиеся олигомеры, присоединившиеся к ним ГТФ-димеры уже не будут оказывать стабилизирующего воздействия, так как они не смогут образовывать латеральные связи. Для того чтобы учесть это обстоятельство в рамках кинетической модели, было введено искусственное правило, позволяющее различать "закрученные" и "незакрученные" олигомеры тубулина.

Дальнейшим усовершенствованием описания микротрубочки стало рассмотрение раздельного разрыва латеральной и лонгитудинальной связей в работе Марголина с соавторами [80] 2012 года (рис. 7г). В виде искусственно введённых правил в модели [80] ограничено чередование разрыва и смыкания латеральных связей последовательным образом, "сверху-вниз" и "снизу-вверх" соответственно. Для имитации стабилизирующего действия соседних протофиламентов введён коэффициент, уменьшающий вероятность разрыва латеральной связи при наличии латеральных связей у соседних протофиламентов. Эти правила дают возможность более полно, чем в предыдущих моделях, учесть различия в структурах растущего и укорачивающегося конца микротрубочки. Уникальным результатом работы [80] стало предсказание "разломов" в теле микротрубочки. Эти разломы, которые существуют на концах как растущих, так и укорачивающихся микротрубочек, приводят к дестаби-

лизации. В частности, катастрофы происходили с большей вероятностью при увеличении количества разломов.

3.2. Молекулярные кинетико-механические модели

Другой важной моделью, описывающей микротрубочку с помощью кинетического метода Монте-Карло, явилась модель Ван Бюрена с соавторами [75] 2005 года, позднее использованная в работе [54]. Принципиальным отличием модели [75] от предыдущих была попытка учёта механики взаимодействий внутри микротрубочки с помощью энергетических потенциалов, влияющих на вероятности событий разрыва связей между димерами. Поэтому модель [75] мы будем относить к классу молекулярных кинетико-механических.

Геометрически микротрубочка представлена в виде цилиндра, протофиламенты описываются как цепочки соединённых векторов, начало и конец каждого из которых — это два лонгитудинальных сайта связывания соответствующего мономера (рис. 8).

Каждый мономер описывается тремя величинами: двумя углами поворота, φ и θ , а также длиной D . Углы θ и φ задают равновесное, ненапряжённое на изгиб, направление вектора мономера. Угол θ соответствует изгибанию наружу протофиламента таким образом, что для закручивающихся на конце микротрубочки ГДФ-димеров $\theta = 22^\circ$, а для прямых ГТФ-протофиламентов $\theta = 0$. Равновесный угол φ для обоих состояний равен нулю. Отклонение текущего положения вектора от равновесного описывается квадратичным потенциалом. Величина D является суммой длины мономера (4 нм) и величины растяжения вдоль протофиламента d . Взаимодействие между мономерами в соседних протофиламентах описывается с помощью расстояния между сайтами латерального взаимодействия S , которое вычисляется по координатам $\{\varphi, \theta, D\}$. Растяжения d и S описываются гуковскими потенциалами с разрывом по достижении максимальной энергии взаимодействия. Текущий вектор мономера отклоняется от равновесного на угол Φ . Энергетический потенциал по углу Φ также является квадратичным. Для нахождения координат $\{\varphi, \theta, D\}$ вблизи конца микротрубочки используется алгоритм минимизации энергии.

В данной модели по-прежнему присутствует приближение квазиравновесности: микротрубочка рассматривается в каждый момент времени как равновесная система. Константа равновесия выражается в виде

$$K = \frac{k_+}{k_-} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{total}}^0}{k_B T}\right), \quad (8)$$

где k_+ — константа реакции присоединения в единицах $[\text{M}^{-1} \text{c}^{-1}]$, k_- — константа отсоединения, $\Delta G_{\text{total}}^0$ — полное изменение свободной энергии связывания для данного димера, k_B — постоянная Больцмана. Отсюда рассчитывается вероятность диссоциации:

$$k_- = \frac{k_+}{\exp[-\Delta G_{\text{total}}^0/(k_B T)]}. \quad (9)$$

В случае, когда для данной связи сумма энергии связи и энергии напряжения больше нуля или равна нулю, связь считается разорванной.

Далее, когда энергия и константы диссоциации найдены, используется кинетический алгоритм Монте-

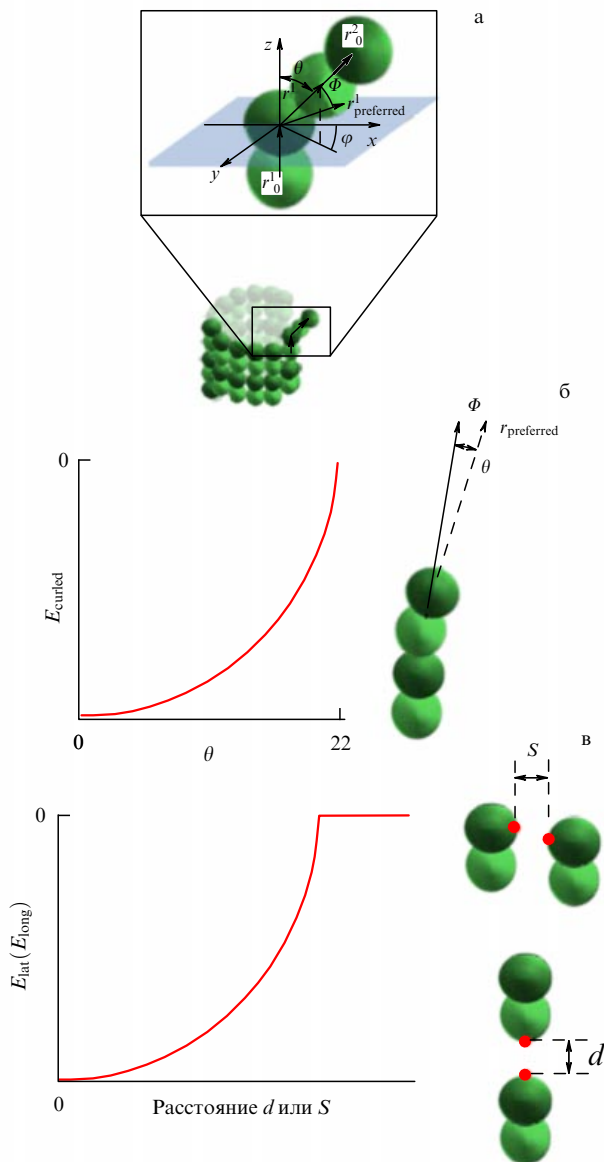


Рис. 8. Потенциалы взаимодействия в модели Ван Бюрена с соавторами [75]. (а) Углы, описывающие вращение димера (см. текст). (б) Энергия изгиба димеров в протофиламенте в зависимости от угла между осью димера и его предпочтительным направлением относительно нижележащего димера в решётке микротрубочки. Вектор предпочтительной ориентации по углу зависит от того, какой тубулин, ГТФ (нулевой угол) или ГДФ (угол 0,2 рад), рассматривается. (в) Латеральная и лонгитудинальная связи. S и d — расстояния между латеральным и лонгитудинальным сайтами взаимодействия соответственно, $E_{\text{lat}}(E_{\text{long}})$ — энергия латерального (лонгитудинального) взаимодействия.

Карло, как описано выше. Список возможных событий, реализуемых с помощью метода Монте-Карло, включает в себя разрыв связей и гидролиз ГТФ. После принятия каждого нового события применяется в дополнение к методу Монте-Карло процедура нахождения локального энергетического минимума энергии системы [93], затем все предыдущие шаги повторяются.

В применённом Ван Бюреном с соавторами подходе явно учитывались геометрия микротрубочки и её влияние на вероятность разрыва связей, так как вероятность диссоциации димера зависит от количества и напряжён-

ности связей, а также от нуклеотидного состава. Однако данная модель микротрубочки, несмотря на свою прогрессивность, не лишена недостатков. Так, форма потенциалов описывается негладкой функцией с особенностью в точке разрыва связи: градиент энергии в этой точке скачком убывает от максимального значения до нуля. А главное, применённый кинетико-механический подход не учитывает тепловых флуктуаций, которые на самом деле могут играть существенную роль в динамике микротрубочек.

3.3. Молекулярно-механические модели

3.3.1. Статические модели. В ранних работах [93, 94], где были подробно проанализированы механические свойства микротрубочки, поверхность микротрубочки моделировалась в виде двумерного однородного анизотропного материала с двумя ортогональными внутренними кривизнами. Одна кривизна стремится выгнуть поверхность наружу, а другая — свернуть её в цилиндр. Основной результат работ [93, 94] состоял в том, что была рассчитана форма конца микротрубочки, соответствующая минимальной энергии такого листа. Получившаяся форма была названа "структурным колпачком", и на основе этой формы было сделано предположение относительно различного динамического поведения микротрубочки. Однако абстрактное описание микротрубочки как двумерного материала не основывалось на реальных структурных данных, что сильно ограничивало интерпретацию результатов модели. Как указывалось ранее, механическое описание микротрубочки требует более детального — молекулярного — уровня рассмотрения.

В модели Молодцова с соавторами впервые было осуществлено механистическое моделирование микротрубочки на молекулярном уровне [12, 71]. Микротрубочка моделировалась как левозакрученная спираль со сдвигом в три мономера на каждый полный оборот спирали. Элементарная субъединица модели — димер тубулина, имеющий по две латеральные связи с димерами в соседних протофиламентах, а также по одной лонгитудинальной связи с димерами вдоль протофиламента. Латеральные взаимодействия описываются непрерывно дифференцируемыми потенциалами взаимодействия между димерами, соответствующими по форме потенциалам белок-белкового взаимодействия [95] (рис. 9а). Лонгитудинальные потенциалы в этой модели неразрывны. Изгибные потенциалы внутри протофиламента полагаются квадратичными:

$$g_{k,n}^{\text{bending}}(\chi_{k,n}) = \frac{1}{2} B(\chi_{k,n} - \chi_0)^2, \quad (10)$$

$$\chi_0 = \chi_0^D \text{ или } \chi_0^T. \quad (11)$$

Здесь B — параметр, характеризующий жёсткость продольных связей, которая предполагается одинаковой для Т- и D-форм тубулина, $\chi_{k,n} = \theta_{k,n} - \theta_{k-1,n}$ — угол отклонения k -й и $(k-1)$ -й субъединиц в n -м протофиламенте друг от друга.

Изгибание каждого протофиламента ограничено плоскостью (рис. 9б). Равновесный угол χ_0 может быть оценён из структурных данных [34]. Для ГДФ-тубулина угол $\chi_0^D \approx 0,2$ на каждый мономер, в то время как ГТФ-димеры склонны образовывать прямые конфигурации

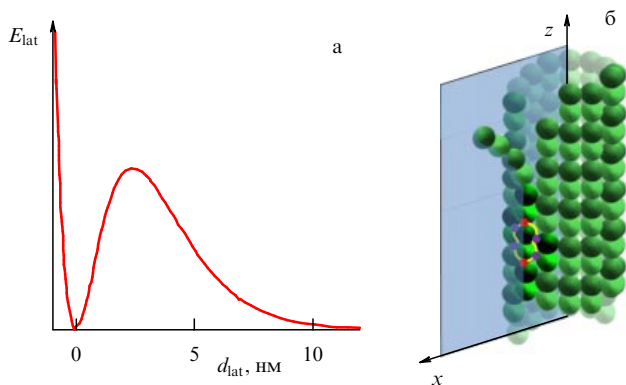


Рис. 9. (В цвете онлайн.) (а) Форма потенциала латерального взаимодействия в моделях Молодцова с соавторами [12] и Ефремова с соавторами [70]. Латеральная связь представлена потенциальной ямой с барьером. (б) Иллюстрация взаимодействий между мономерами и пространственного ограничения движения протофиламентов в микротрубочке. Фиолетовые точки показывают латеральное взаимодействие, красные — лонгитудинальное. Протофиламент с отогнутыми верхними димерами может изгибаться только в изображённой плоскости.

[26, 96]. Изгибная энергия G_n n -го протофиламента представляется в виде суммы:

$$G_n = \sum_k g_{k,n}^{\text{bending}}(\chi_{k,n}). \quad (12)$$

Для того чтобы описать разрыв латеральных связей, был взят потенциал [95]

$$V_{k,n}(r_{k,n}) = A \left(\frac{r_{k,n}}{r_0} \right)^2 \exp \left(-\frac{r_{k,n}}{r_0} \right), \quad (13)$$

где r_0 , A — параметры, характеризующие соответственно длину и энергию связи.

Таким образом, полная потенциальная энергия микротрубочки является суммой продольных и поперечных взаимодействий для всех участвующих в них точек, включающей в себя: 1) сумму потенциальных энергий продольных (изгибных) взаимодействий между субъединицами в протофиламенте, 2) сумму взаимодействий между всеми латеральными контактами в соседних протофиламентах.

Минимизация энергии микротрубочки с помощью метода сопряжённых градиентов позволяла проводить поиск и анализ локальных минимумов энергии системы, что дало возможность оценить стабильность микротрубочки в зависимости от размера ГТФ-колпачка и других параметров модели. Однако моделирование динамики микротрубочек было невозможно.

3.3.2. Псевдодинамический метод Метрополиса. Модель Молодцова и соавторов [71] вскоре была дополнена в работе Ефремова и др. [70] посредством введения в модели [71] алгоритма Метрополиса, представляющего собой модифицированный метод Монте-Карло, для описания динамики субъединиц тубулина в микротрубочке [70].

Алгоритм Метрополиса [97] часто используется для описания эволюции систем, состоящих из многих молекул, в потенциальном энергетическом поле. Алгоритм

Метрополиса можно описать следующим образом [98]. Рассмотрим систему из N частиц. Потенциальная энергия системы выражается как

$$E = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N V(d_{ij}), \quad i \neq j, \quad (14)$$

где V — потенциальная энергия между молекулами, d_{ij} — минимальное расстояние между частицами i и j .

Для того чтобы рассчитать равновесное значение некоей характеристики F системы, используют формулу для канонического ансамбля

$$\bar{F} = \frac{\int F \exp \left[-E/(k_B T) \right] d^{2N} p d^{2N} q}{\int \exp \left[-E/(k_B T) \right] d^{2N} p d^{2N} q}, \quad (15)$$

где $d^{2N} p d^{2N} q$ — дифференциал по объёму в $2N$ -мерном конфигурационном пространстве. Вычислить численно данный интеграл часто не представляется возможным, поэтому применяется приближённый метод Монте-Карло: интегрирование производится не по всему набору точек, а по их случайной выборке. То есть выбирается случайное положение N частиц внутри системы (иначе говоря, случайная точка в $2N$ -мерном пространстве конфигураций). Затем вычисляется энергия системы по формуле (14), после чего данной конфигурации присваивается статистический вес $\exp[-E/(k_B T)]$.

Для плотно упакованных систем статистический вес случайных конфигураций часто очень мал, поскольку для них с большой вероятностью очень мала величина $\exp[-E/(k_B T)]$. Метрополис с соавторами [98] предложили вместо случайного выбора конфигураций и присвоения им веса $\exp[-E/(k_B T)]$ выбирать конфигурации с вероятностью $\exp[-E/(k_B T)]$ и придавать им равный вес. А именно, из начальной конфигурации все частицы сдвигаются по правилу

$$\begin{aligned} X &\rightarrow X + \alpha \xi_1, \\ Y &\rightarrow Y + \alpha \xi_2. \end{aligned} \quad (16)$$

где α — максимальное разрешённое смещение, ξ_1 и ξ_2 — равномерно распределённые случайные числа из интервала $(-1, 1)$. Затем вычисляется изменение энергии ΔE , вызванное смещением. Если $\Delta E < 0$, т.е. смещение привело к уменьшению энергии, то конфигурация принимается. Если $\Delta E > 0$, то смещение принимается с вероятностью $\exp[-\Delta E/(k_B T)]$. Для этого каждый раз берётся заново сгенерированное случайное число ξ_3 из интервала $(0, 1)$, и если $\xi_3 < \exp[-\Delta E/(k_B T)]$, то система переходит в новое состояние, а если $\xi_3 > \exp[-\Delta E/(k_B T)]$, то она возвращается в старое. Причём, вне зависимости от того, принято смещение или нет, система считается перешедшей в новое состояние. Таким образом,

$$\bar{F} = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M F_j, \quad (17)$$

где F_j — значение F на j -м шаге.

Используя свойство эргодичности, можно показать, что данный метод выбирает конфигурации с вероятностью $\exp[-E/(k_B T)]$. Пусть v_r — количество систем ансамбля в состоянии r . Можно доказать, что после достаточно большого числа шагов ансамбль будет стремиться к распределению количества молекул по энерге-

тическим состояниям

$$v_r \sim \exp\left(-\frac{E_r}{k_B T}\right). \quad (18)$$

Допустим, системы ансамбля сделали шаг. Вероятность того, что этот шаг (вне зависимости от того, принят он или нет) привёл к переходу из состояния s в состояние r , обозначим как P_{rs} , $P_{rs} = P_{sr}$ (ξ_l распределены равномерно). Предположим, что $E_r > E_s$. Тогда количество систем, движущихся из состояния r в состояние s , будет равно $v_r P_{rs}$, так как разрешены переходы в состояния с меньшей энергией. Количество систем, совершающих переход в обратном направлении в конфигурационном пространстве, выражается как

$$N_f = v_s P_{sr} \exp\left(-\frac{E_r - E_s}{k_B T}\right). \quad (19)$$

Общее количество систем, перешедших из состояния s в состояние r :

$$N_b = P_{rs} \left[v_s \exp\left(-\frac{E_r - E_s}{k_B T}\right) - v_r \right]. \quad (20)$$

Таким образом, для любых двух состояний, s и r , если

$$\frac{v_r}{v_s} > \exp\left(-\frac{E_r - E_s}{k_B T}\right), \quad (21)$$

в среднем большее число систем перейдёт из состояния r в состояние s . Поскольку системы эргодичны, из любого положения может быть осуществлён переход в любое другое за один или несколько шагов. Таким образом, отсюда следует, что ансамбль по прошествии достаточно большого числа шагов должен описываться каноническим распределением. Поэтому при несостоявшемся переходе старая конфигурация считается заново реализовавшейся, что даёт больший статистический вес состояниям с меньшей энергией.

В работе Ефремова с соавторами [70] 2007 года метод Метрополиса позволил описать разборку микротрубочки как результат разрыва латеральных связей под действием тепловых флуктуаций и внутреннего напряжения в решётке микротрубочки. При разборке микротрубочка совершает работу, используемую в клетке для перемещения хромосом. Поэтому описание деполимеризации в модели, содержащей в явном виде потенциалы взаимодействия, дало возможность рассмотреть взаимодействие микротрубочки с хромосомами во время их движения. Однако в этой модели всё ещё не учитывались присоединение димеров из раствора и гидролиз ГТФ, а значит, с её помощью нельзя было описать динамическую нестабильность микротрубочки. Кроме того, разрыв лонгитудинальных связей на концах протофиламентов был введён искусственно, чтобы поддерживать заданную среднюю длину изогнутых протофиламентов на конце микротрубочки.

3.3.3. Броуновская динамика в моделировании микротрубочки. Существует альтернативный метод описания динамики взаимодействующих частиц, имеющих размер белковых молекул, — метод броуновской динамики, основанный на решении уравнений движения с

некоторыми приближениями, о которых будет сказано ниже. Было показано, что в пределе стремления приращений координат к нулю (соответственно, стремления шага по времени в динамике к нулю) метод Метрополиса, включая его последующую реализацию [99], эквивалентен методу броуновской динамики [100, 101]. Однако, поскольку в методе Метрополиса переходам между последовательными состояниями системы в явном виде не ставится в соответствие время, при применении этого метода необходимо проводить дополнительную калибровку временной шкалы, что требует использования одной экспериментальной зависимости в качестве калибровочной. При применении метода броуновской динамики такая дополнительная калибровка не требуется.

Использование алгоритма броуновской динамики в моделировании микротрубочки стало возможным с развитием технологий высокопроизводительных вычислений и появлением мощных суперкомпьютеров. Рассмотрим этот метод подробнее. Запишем уравнение Ланжевена

$$m \frac{d^2 q}{dt^2} = -\gamma \frac{dq}{dt} + F(t) + F_{\text{rand}}(t), \quad (22)$$

где m — масса частицы, γ — коэффициент вязкости броуновской частицы, q — её координата, $F_{\text{rand}}(t)$ — случайная сила, $F(t) = -dU/dq$ — систематическая сила, действующая на частицу в энергетическом поле U .

Свойства случайной силы следующие:

1) средняя по ансамблю частиц случайная сила равна нулю (сбалансированность флуктуаций), $\langle F_{\text{rand}}(t) \rangle = 0$;
2) для временных интервалов, больших длительности столкновения, случайная сила не обладает корреляцией: $\langle F_{\text{rand}}(t_1) F_{\text{rand}}(t_2) \rangle = \alpha \delta(t_1 - t_2)$, где $\delta(t_1 - t_2)$ — функция Дирака.

В уравнении (22) пренебрежём членом со второй производной координаты по времени ввиду быстрого затухания ускорения на рассматриваемых временных интервалах [102] и оставим в левой части только дифференциал координаты:

$$dq = -\frac{dt}{\gamma} \frac{dU}{dq} + \frac{dt}{\gamma} F_{\text{rand}} = dq_1 + dq_2, \quad (23)$$

где dq_1 — слагаемое, имеющее смысл приращения координаты, вызванного систематическими силами,

$$dq_1 \equiv -\frac{dt}{\gamma} \frac{dU}{dq}, \quad (24)$$

dq_2 — слагаемое, имеющее смысл стохастического смещения броуновской частицы за бесконечно малое время dt ,

$$dq_2 \equiv -\frac{dt}{\gamma} F_{\text{rand}}. \quad (25)$$

В случае, когда рассматривается достаточно большой интервал времени, существенно превышающий характерное время одного столкновения частиц раствора с броуновской частицей, мы можем найти среднеквадратичную амплитуду этого смещения, используя формулу Эйнштейна $\langle dq_2^2 \rangle = 2D dt$ и выражая коэффициент диффузии как $D = k_B T / \gamma$ (где T — температура в градусах

Кельвина). В результате получим среднеквадратичную амплитуду стохастического члена:

$$\overline{dq_2} = \sqrt{\frac{2k_B T \Delta t}{\gamma}}. \quad (26)$$

Здесь бесконечно малый дифференциал dt заменён приращением $\Delta t \gg \tau$, где τ — время взаимодействия частиц среды.

Сам стохастический член (26) выражается через свою амплитуду умножением на случайное число $N(0, 1)$ из нормального распределения [102]:

$$dq_2 = \overline{dq_2} N(0, 1) = \sqrt{\frac{2k_B T \Delta t}{\gamma}} N(0, 1). \quad (27)$$

Используя метод Эйлера первого порядка точности:

$$q^i = q^{i-1} + \frac{dq^{i-1}}{dt} \Delta t, \quad (28)$$

где i — номер итерации, получим разностную схему для нахождения декартовых координат на каждом следующем временном интервале:

$$q^i = q^{i-1} - \frac{\Delta t}{\gamma} \frac{\partial U_{\text{total}}}{\partial q^i} + \sqrt{2k_B T \frac{\Delta t}{\gamma}} N(0, 1), \quad (29)$$

где Δt — шаг по времени (0,2 нс), U_{total} — полная энергия системы, r — радиус мономера, η — коэффициент вязкости среды, $\gamma_q = 6\pi r \eta$ — поступательный коэффициент вязкости частицы, $\gamma_\tau = 8\pi r^3 \eta$ — вращательный коэффициент вязкости частицы [103].

Можно грубо оценить нижнюю границу $\Delta t \gg \tau$ шага по времени. Время отдельного соударения

$$\tau \sim \frac{2r_0}{\bar{u}}, \quad (30)$$

где размер частиц среды $2r_0 \sim 5 \text{ \AA}$, $\bar{u} \sim \sqrt{3k_B T/m}$. Отсюда $\tau \sim 10^{-12}$ с. В рассмотренной далее разностной схеме шаг по времени $\Delta t \sim 10^{-10}$ с.

Описанный выше метод броуновской динамики использован нами для создания молекулярно-механической модели микротрубочки [28]. С геометрической точки зрения модель повторяет наши более ранние модели, которые имели указанные выше ограничения и поэтому не могли полноценно описывать динамику микротрубочек [70, 71]. Элементарной структурной субъединицей микротрубочки является мономер тубулина, представленный как недеформируемая сфера радиусом 2 нм с двумя точками взаимодействия, слева и справа (латеральные связи), а также с двумя точками, сверху и снизу (лонгитудинальные связи), в решётке микротрубочки (рис. 10).

Рассматриваемая модель имеет то же пространственное ограничение, что и модель Ефремова с соавторами [70], в которой движение каждого протофиламента ограничено одной плоскостью, проходящей через ось микротрубочки и данный протофиламент. Поэтому каждый мономер описывается только тремя координатами (x_i, y_i, τ_i): двумя декартовыми координатами центра мономера в плоскости и углом поворота.

Потенциал латерального взаимодействия (рис. 11), который описывается в зависимости от расстояния r^{lat}

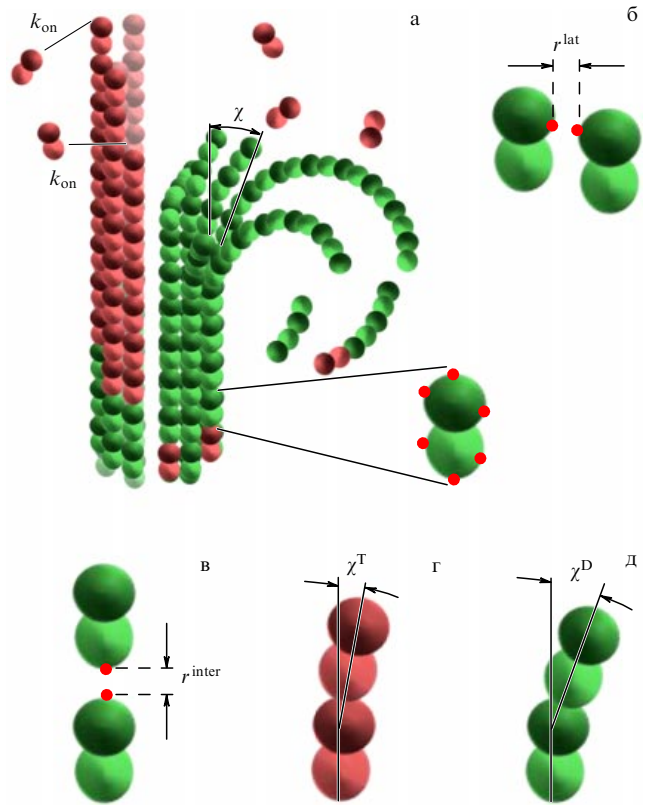


Рис. 10. (В цвете онлайн.) Описание взаимодействий в микротрубочке из работы Захарова с соавторами [28]. (а) Совмещённое изображение растущей (слева) и разбирающейся (справа) микротрубочки. Структурная субъединица микротрубочки — мономер с четырьмя сайтами связывания. ГТФ-димеры показаны красным и оранжевым цветами, а ГДФ — зелёным цветом. К концу каждого протофиламента микротрубочки с вероятностью k_{on} присоединяются димеры из раствора с образованием лонгитудинальной связи. (б) Латеральное взаимодействие между димерами. (в) Лонгитудинальное взаимодействие. (г) Изгибное взаимодействие для ГТФ-димера. (д) Изгибное взаимодействие для ГДФ-димера.

между взаимодействующими сайтами, представлен в виде ямы с отталкивающим барьером [70, 71, 95, 104]:

$$V_{k,n}^{\text{lat}}(r_{k,n}) = A_{\text{lat}} \left(\frac{r_{k,n}^{\text{lat}}}{r_0} \right)^2 \exp \left(- \frac{r_{k,n}^{\text{lat}}}{r_0} \right) - b_{\text{lat}} \exp \left[- \left(\frac{r_{k,n}^{\text{lat}}}{dr_0} \right)^2 \right]. \quad (31)$$

Лонгитудинальное взаимодействие между мономерами в соседних димерах рассчитывается по той же формуле, что и латеральное, но вместо параметров A_{lat} и b_{lat} берутся параметры A_{inter} и b_{inter} . Лонгитудинальное взаимодействие между мономерами внутри одного димера, которое считается неразрывным, вычисляется по формуле

$$V_{k,n}^{\text{intra}}(r_i) = \frac{1}{2} k r_{k,n}^2. \quad (32)$$

Изгиб протофиламентов в плоскости их движения описывается с помощью изгибного потенциала (см. формулу (10)).

Полная энергия системы как сумма энергий латерального, лонгитудинального и изгибного взаимодей-

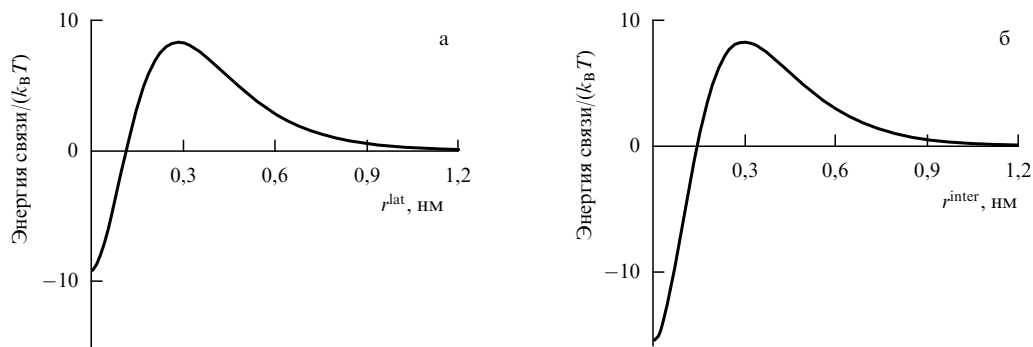


Рис. 11. Энергетические потенциалы взаимодействия в стенке микротрубочки в зависимости от расстояния между сайтами связывания. (а) Потенциал латерального взаимодействия между димерами. (б) Потенциал лонгитудинального взаимодействия.

ствий:

$$U_{\text{total}} = \sum_{n=1}^{13} \sum_{i=1}^{K_n} (V_{k,n}^{\text{lat}} + V_{k,n}^{\text{inter}} + V_{k,n}^{\text{intra}} + g_{k,n}^{\text{bending}}). \quad (33)$$

Суммирование проводится по всем 13 протофиламентам (индекс n) и по каждому мономеру в протофиламенте (индекс i).

Для нахождения положения частиц системы в заданные моменты времени мы рассматриваем численное решение уравнения движения Ланжевена в броуновском приближении (29).

Кинетическая часть алгоритма описывает прикрепление тубулина к концу любого протофиламента и гидролиз ГТФ. Проверка этих событий происходит каждую миллисекунду с вероятностью

$$p = k_{\text{on}} c_{\text{tub}} \text{ за } 1 \text{ мс}, \quad (34)$$

где k_{on} — константа присоединения, c_{tub} — концентрация тубулина в растворе. Было выбрано самое простое правило ГТФ-гидролиза: с фиксированной вероятностью, вне зависимости от положения и окружения присоединённого ГТФ-димера. При гидролизе равновесное (нулевое) значение угла $\chi^{\text{T(D)}}$ в формуле (11) сменяется значением 0,2.

Данная модель является наиболее детальной моделью динамики микротрубочки из предложенных на сегодня и даёт описание наиболее широкого набора экспериментальных данных в рамках одного набора параметров.

4. Достоинства и недостатки отдельных методов

И кинетические, и молекулярно-механические модели способны описать динамическую нестабильность микротрубочек на качественном уровне. В рамках кинетических моделей описать такую неравновесную систему, как микротрубочка, удаётся с помощью "равновесных констант перехода", благодаря тому что "неравновесность" микротрубочки заложена на уровне констант разрыва связей, значение которых меняется скачком при переходе димеров из ГТФ-состояния в ГДФ-состояние. В механических моделях резких скачков величины констант связей не наблюдается, а источником энергии для динамической нестабильности является энергия гидролиза ГТФ, запасаемая при полимеризации в виде упругой деформации протофиламентов в стенке микротрубочки.

С количественной точки зрения кинетические модели значительно хуже описывают динамику микротрубочек по сравнению с механическими. Так, кинетические модели, основанные на методе Монте-Карло, способны описывать следующие экспериментальные наблюдения: зависимости скорости роста от концентрации тубулина в растворе, переходы между фазами роста и укорочения [64–67, 69, 74, 80]. Однако они не описывают слабые зависимости частоты катастроф и скорости укорочения микротрубочки от концентрации тубулина. Кроме того, с помощью кинетических моделей не удаётся описать значительную задержку (более 1 с) до наступления катастрофы при разбавлении растворимого тубулина, так же как и отсутствие зависимости времени этой задержки от концентрации тубулина до разбавления [42, 43].

Также пока неизвестны кинетические модели, описывающие "старение" микротрубочки [64–67, 69, 80]. Безусловным недостатком кинетических моделей является и то, что они не описывают структуру конца микротрубочки в различных фазах динамической нестабильности, в частности образование отгибающихся протофиламентов, существенно влияющих на динамику микротрубочки [64–67, 69]. Хотя некоторые попытки учесть образование изогнутых протофиламентов при переходе к деполимеризации всё же делались [74, 80], они носили очень ограниченный и искусственный характер. Модели данного класса в принципе не способны описать результаты экспериментов по развитию силы динамической микротрубочкой, так как в них не рассматриваются механические аспекты взаимодействий между субъединицами.

Молекулярно-механическое моделирование микротрубочки является гораздо более затратным с вычислительной точки зрения, но имеет ряд преимуществ перед кинетическими подходами. Явное рассмотрение энергетических потенциалов взаимодействия тубулинов и их механики даёт возможность описать силы, развиваемые микротрубочкой, а также учесть влияние всевозможных конфигураций и нуклеотидных состояний на динамику микротрубочки.

С помощью созданной нами наиболее полной молекулярно-механической модели [28] впервые удалось непротиворечиво воспроизвести большой набор экспериментальных данных о структуре и динамической нестабильности микротрубочек в физиологическом диапазоне концентраций в рамках одного набора параметров. Были описаны: 1) концентрационные зависимости скорости роста, укорочения, частоты катастроф; 2) формы концов и распределение длин изогнутой части протофи-

ламентов разбирающейся микротрубочки; 3) зависимость частоты катастроф микротрубочек от времени и неэкспоненциальное распределение времён жизни микротрубочек; 4) зависимость интервала между удалением растворимого тубулина и катастрофой от скорости роста микротрубочки; 5) возможность развития деполимеризующейся микротрубочкой существенной силы. Было также показано, что "старение" может быть объяснено множественными быстрыми обратимыми переходами, происходящими на конце микротрубочки, такими как образование и исчезновение в популяции растущих микротрубочек искривлённых протофиламентов на растущем конце.

Основным недостатком молекулярно-механических моделей является их высокая вычислительная сложность, ввиду которой мы были вынуждены исследовать динамическую нестабильность при искусственно завышенной частоте гидролиза и затем экстраполировать результаты в область физиологических значений, а также снижать число степеней свободы, ограничивая движение протофиламентов радиальными плоскостями. В будущих работах планируется повысить скорость вычислений и проводить расчёты в области физиологических констант гидролиза без указанных геометрических ограничений.

5. Заключение

Несмотря на активное изучение свойств микротрубочки, остаётся много вопросов, на которые пока не удалось получить ответы. И чем больше появляется новых данных, тем сложнее их увязать в единую цельную картину. Поэтому математическое моделирование, с помощью которого разнородные экспериментальные данные анализируются в контексте общей картины, остаётся (и будет оставаться) исключительно важным инструментом изучения динамики микротрубочек.

Всё ещё ожидают теоретического объяснения различия свойств плюс- и минус-концов микротрубочек [44], особенно в экспериментах по перерезанию микротрубочек ультрафиолетовым излучением или иглой [33, 39]. Остаются неизвестными механизмы спасения микротрубочек [37]. Непонятны роль, свойства и причина формирования листообразных конфигураций, иногда наблюдаемых на концах полимеризующихся микротрубочек [56]. Без ответа остаётся множество вопросов о механизмах регуляции динамики микротрубочек белками и низкомолекулярными ингибиторами.

Одной из важных, на наш взгляд, нерешённых проблем является вопрос о самом базовом механизме работы динамической нестабильности микротрубочек, а именно о принципе работы ГТФ-колпачка. С одной стороны, и классические работы, и последняя разработанная молекулярно-механическая модель продемонстрировали жизнеспособность представлений о том, что ГТФ-колпачок может стабилизировать микротрубочку благодаря прямой конформации ГТФ-тубулинов, создающей участок, на котором протофиламенты не стремятся выгнуться наружу, в отличие от ГДФ-тубулинов протофиламентов. Однако число работ, указывающих на то, что и ГТФ-димеры, и ГДФ-димеры тубулина имеют одинаково изогнутую конформацию, всё время растёт. Это заставляет рассмотреть альтернативную модель, в которой ГТФ-колпачок удерживает микротрубочку от

разборки благодаря усилению латеральных связей между ГТФ-тубулинами или уменьшению их жёсткости, а не вследствие выпрямления протофиламентов [105]. Пока неясно, насколько удовлетворительной может быть такая модель, так как рост с изогнутыми протофиламентами представляется проблематичным. Действительно, добавление новых ГТФ-тубулинов не будет способствовать стабильности, поскольку эти тубулины, присоединяющиеся на концах изогнутых протофиламентов, разнесены в пространстве. Вероятность того, что изогнутые протофиламенты случайно выпрямятся, довольно мала, поскольку протофиламенты должны быть достаточно жёсткими, чтобы позволить микротрубочке развивать большие силы во время деполимеризации [57].

В связи с вышесказанным перспективным направлением для будущих исследований представляется совмещение существующих моделей с ещё более детальными молекулярно-динамическими расчётами, с помощью которых станет возможным непосредственно учитывать конформацию тубулина и её влияние на динамику микротрубочки.

Благодарности. Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-60113 мол_а_дк, грантом Президента РФ для молодых учёных (МК-4819.2015.4) и финансированием в рамках программ президиума РАН I.33П и "Молекулярная и клеточная биология".

Список литературы

1. Kline-Smith S L, Walczak C E *Mol. Cell* **15** 317 (2004)
2. Cimini D, Degraffi F *Trends Cell Biol.* **15** 442 (2005)
3. Bakhom S F, Compton D A *Curr. Opin. Cell Biol.* **24** 64 (2012)
4. Nicholson J M, Cimini D *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **315** 299 (2015)
5. Walczak C E, Heald R *Int. Rev. Cytol.* **265** 111 (2008)
6. Erickson H P, O'Brien E T *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21** 145 (1992)
7. Bouchet-Marquis C et al. *Biol. Cell* **99** 45 (2007)
8. Nogales E, Ramey V H, Wang H-W *Methods Cell Biol.* **95** 129 (2010)
9. Chrétien D et al. *Cell Struct. Funct.* **24** 299 (1999)
10. Kirschner M W, Mitchison T *Nature* **324** 621 (1986)
11. Asbury C L et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 9873 (2006)
12. Molodtsov M I et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 4353 (2005)
13. Volkov V A et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** 7708 (2013)
14. Hill T L, Chen Y *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** 5772 (1984)
15. Meurer-Grob P, Kasparian J, Wade R H *Biochemistry* **40** 8000 (2001)
16. Chrétien D, Flyvbjerg H, Fuller S D *Eur. Biophys. J.* **27** 490 (1998)
17. Hirose K, Fan J, Amos L A *J. Mol. Biol.* **251** 329 (1995)
18. Horio T, Hotani H *Nature* **321** 605 (1986)
19. Mitchison T J *Science* **261** 1044 (1993)
20. Vale R D et al. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355** 449 (2000)
21. Desai A, Mitchison T J *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** 83 (1997)
22. Mandelkow E M et al. *J. Cell Biol.* **102** 1067 (1986)
23. Wade R H, Chrétien D *J. Struct. Biol.* **110** 1 (1993)
24. Mandelkow E M, Mandelkow E J *J. Mol. Biol.* **181** 123 (1985)
25. Mandelkow E M et al. *EMBO J.* **7** 357 (1988)
26. Mandelkow E M, Mandelkow E, Milligan R A *J. Cell Biol.* **114** 977 (1991)
27. Mitchison T, Kirschner M *Nature* **312** 237 (1984)
28. Zakharov P et al. *Biophys. J.* **109** 2574 (2015)
29. David-Pfeuty T, Erickson H P, Pantaloni D *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** 5372 (1977)
30. Weisenberg R C, Deery W J, Dickinson P J *Biochemistry* **15** 4248 (1976)
31. Spiegelman B M, Penningroth S M, Kirschner M W *Cell* **12** 587 (1977)

32. Caplow M, Shanks J *J. Biol. Chem.* **265** 8935 (1990)
33. Tran P T, Walker R A, Salmon E D *J. Cell Biol.* **138** 105 (1997)
34. Müller-Reichert T et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 3661 (1998)
35. Wang H-W, Nogales E *Nature* **435** 911 (2005)
36. Rice L M, Montabana E A, Agard D A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 5378 (2008)
37. Brouhard G J *Mol. Biol. Cell* **26** 1207 (2015)
38. Hyman A A et al. *Mol. Biol. Cell* **3** 1155 (1992)
39. Walker R A, Inoué S, Salmon E D *J. Cell Biol.* **108** 931 (1989)
40. O'Brien E T, Voter W A, Erickson H P *Biochemistry* **26** 4148 (1987)
41. Stewart R J, Farrell K W, Wilson L *Biochemistry* **29** 6489 (1990)
42. Walker R A, Pryer N K, Salmon E D *J. Cell Biol.* **114** 73 (1991)
43. Voter W A, O'Brien E T, Erickson H P *Cell Motil. Cytoskeleton* **18** 55 (1991)
44. Walker R A et al. *J. Cell Biol.* **107** 1437 (1988)
45. Drechsel D N, Kirschner M W *Curr. Biol.* **4** 1053 (1994)
46. Caplow M, Shanks J *Mol. Biol. Cell* **7** 663 (1996)
47. Gardner M K et al. *Cell* **146** 582 (2011)
48. Maurer S P et al. *Cell* **149** 371 (2012)
49. Bieling P et al. *Nature* **450** 1100 (2007)
50. Odde D J, Cassimeris L, Buettner H M *Biophys. J.* **69** 796 (1995)
51. Gardner M K et al. *Cell* **147** 1092 (2011)
52. Olkin I, Gleser L J, Derman C *Probability Models and Applications* (New York: Macmillan, 1980)
53. Bowne-Anderson H et al. *BioEssays* **35** 452 (2013)
54. Coombes C E et al. *Curr. Biol.* **23** 1342 (2013)
55. Maurer S P et al. *Curr. Biol.* **24** 372 (2014)
56. Chrétien D, Fuller S D, Karsenti E *J. Cell Biol.* **129** 1311 (1995)
57. Grishchuk E L et al. *Nature* **438** 384 (2005)
58. Lampert F, Hornung P, Westermann S *J. Cell Biol.* **189** 641 (2010)
59. Carter N J, Cross R A *Nature* **435** 308 (2005)
60. Mallik R et al. *Nature* **427** 649 (2004)
61. Gennerich A et al. *Cell* **131** 952 (2007)
62. Grishchuk E L, McIntosh J R *EMBO J.* **25** 4888 (2006)
63. Tanaka K et al. *J. Cell Biol.* **178** 269 (2007)
64. Chen Y D, Hill T L *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** 1131 (1985)
65. Bayley P, Schilstra M, Martin S *FEBS Lett.* **259** 181 (1989)
66. Bayley P M, Schilstra M J, Martin S R *J. Cell Sci.* **95** 33 (1990)
67. Martin S R, Schilstra M J, Bayley P M *Biochim. Biophys. Acta* **1073** 555 (1991)
68. Flyvbjerg H, Holy T E, Leibler S *Phys. Rev. Lett.* **73** 2372 (1994)
69. Martin S R, Schilstra M J, Bayley P M *Biophys. J.* **65** 578 (1993)
70. Efremov A et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** 19017 (2007)
71. Molodtsov M I et al. *Biophys. J.* **88** 3167 (2005)
72. Sept D, MacKintosh F C *Phys. Rev. Lett.* **104** 018101 (2010)
73. Sept D, Baker N A, McCammon J A *Protein Sci.* **12** 2257 (2009)
74. VanBuren V, Odde D J, Cassimeris L *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** 6035 (2002)
75. VanBuren V, Cassimeris L, Odde D J *Biophys. J.* **89** 2911 (2005)
76. Gregoretti I V et al. *J. Cell Sci.* **119** 4781 (2006)
77. Brun L et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** 21173 (2009)
78. Ranjith P et al. *Biophys. J.* **96** 2146 (2009)
79. Piette B M et al. *PLoS ONE* **4** e6378 (2009)
80. Margolin G et al. *Mol. Biol. Cell* **23** 642 (2012)
81. Castle B T, Odde D J *Biophys. J.* **105** 2528 (2013)
82. Padinhateeri R, Kolomeisky A B, Lacoste D *Biophys. J.* **102** 1274 (2012)
83. Hinow P, Rezanian V, Tuszyński J A *Phys. Rev. E* **80** 031904 (2009)
84. Mazilu I, Zamora G, Gonzalez J *Physica A* **389** 419 (2010)
85. Margolin G et al. *Phys. Rev. E* **74** 041920 (2006)
86. Flyvbjerg H, Holy T E, Leibler S *Phys. Rev. E* **54** 5538 (1996)
87. Gillespie D T *J. Comput. Phys.* **22** 403 (1976)
88. Chrétien D, Fuller S D *J. Mol. Biol.* **298** 663 (2000)
89. Gillespie D T *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58** 35 (2007)
90. Gillespie D T *J. Phys. Chem.* **81** 2340 (1977)
91. Gillespie D T *Physica A* **188** 404 (1992)
92. Hill T L, Kirschner M W *Int. Rev. Cytol.* **78** 1 (1982)
93. Jánosi I M, Chrétien D, Flyvbjerg H *Eur. Biophys. J.* **27** 501 (1998)
94. Jánosi I M, Chrétien D, Flyvbjerg H *Biophys. J.* **83** 1317 (2002)
95. Jiang L et al. *Proteins* **46** 190 (2002)
96. Hyman A A et al. *Mol. Biol. Cell* **3** 1155 (1992)
97. Metropolis N, Ulam S *J. Am. Stat. Assoc.* **44** 335 (1949)
98. Metropolis N et al. *J. Chem. Phys.* **21** 1087 (1953)
99. Rossy P J, Doll J D, Friedman H L *J. Chem. Phys.* **69** 4628 (1978)
100. Chen J C, Kim A S *Adv. Colloid Interface Sci.* **112** 159 (2004)
101. Heyes D M, Branka A C *Mol. Phys.* **94** 447 (1998)
102. Ermak D L, McCammon J A *J. Chem. Phys.* **69** 1352 (1978)
103. Rotne J, Prager S *J. Chem. Phys.* **50** 4831 (1969)
104. Laue T, Demeler B *Nature Chem. Biol.* **7** 331 (2011)
105. Brouhard G J, Rice L M *J. Cell Biol.* **207** 323 (2014)

Microtubule: a dynamically unstable stochastic phase switching polymer

P.N. Zakharov⁽¹⁾, V.K. Arzhanik⁽²⁾, E.V. Ulyanov⁽³⁾, N.B. Gudimchuk^(3,4,1), F.I. Ataulakhanov^(3,4,1)

⁽¹⁾ Center for Theoretical Problem of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 38/1, 119334 Moscow, Russian Federation;

⁽²⁾ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Leninskie gory 1, str. 73, 119234 Moscow, Russian Federation;

⁽³⁾ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Leninskie gory 1, str. 2, 119991 Moscow, Russian Federation;

⁽⁴⁾ Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, ul. Samory Mashela 1, 117997 Moscow, Russian Federation

E-mail: ⁽¹⁾ pavel.n.zakharov@gmail.com, ⁽²⁾ arzhanik_work@mail.ru, ⁽³⁾ pi-mezon@mail.ru, ^(3,4,1) nikita_gb@mail.ru, ataulakhanov.fazly@gmail.com

One of the simplest molecular motors, a biological microtubule, is reviewed as an example of a highly nonequilibrium molecular machine capable of stochastic transitions between slow growth and rapid disassembly phases. Basic properties of the microtubule are described, and various approaches to simulating its dynamics, from statistical chemical kinetics models to molecular dynamics models using the Metropolis Monte Carlo and Brownian dynamics methods, are outlined.

Keywords: microtubule, GTP-cap, mathematical modeling, dynamic instability

PACS numbers: **87.10.-e**, **87.16.-b**, 87.16.A –

Bibliography — 105 references

Received 14 March 2016, revised 4 April 2016

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **186** (8) 853–868 (2016)

Physics – Uspekhi **59** (8) (2016)

DOI: 10.3367/UFNr.2016.04.037779

DOI: 10.3367/UFNe.2016.04.037779