

Микротрубочки — простейший биомеханический двигатель для расхождения хромосом при делении клетки

И.В. Гончар, Г.С. Тимошин, Н.Б. Гудимчук, **Ф.И. Атауллаханов**

Человечество изобрело множество устройств для совершения разнообразных движений и механической работы. Все эти устройства являются макрообъектами. Удивительно, но все механические двигатели в живой природе имеют молекулярные размеры, не более 100 нм. Даже когда нужно двигать слона или кита, Природа собирает комплексы из миллиардов таких моторов вместо того, чтобы сделать один большой двигатель. Мы пока не очень понимаем достоинства такого подхода, но один аспект очевиден. Молекулярные моторы используют химическую энергию для совершения механической работы, но при этом всё происходит без использования высоких температур или давлений. При этом КПД этих двигателей часто сильно превышает КПД двигателя внутреннего сгорания. Поэтому крайне интересно понимать, как работают молекулярные моторы и как они эволюционировали. Одним из наиболее примитивных молекулярных устройств, способных перемещать молекулярные объекты, являются микротрубочки. Микротрубочки — это вездесущие полимеры цитоскелета клетки, необходимые для обеспечения формы и структуры клетки, её жизнеспособности и полноценного функционирования. Помимо структурных функций, они обеспечивают движение хромосом при делении клетки — процесс, на котором зиждется вся жизнь. В динамике микротрубочек есть биохимическая стадия, в которой расщепляется макроэргическая молекула ГТФ, и выделяющаяся при этом энергия запасается микротрубочкой в виде напряжённой конформации. Относительно недавно стало окончательно ясно, что эта запасённая в конформации энергия может использоваться клеткой для совершения работы по разделению и переносу сестринских хромосом в противоположные концы клетки в процессе клеточного деления. Похоже, это наиболее древний молекулярный механохимический движитель в клетке.

Ключевые слова: микротрубочка, генерация силы, механохимический двигатель, оптическая ловушка, деление клеток

PACS numbers: 87.16.Ka, 87.16.Wd, 87.17.Ee

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2025.12.040069>

Содержание

1. Введение (829).
2. Микротрубочка как двигатель (830).
 - 2.1. Структура и динамика микротрубочки.
 - 2.2. Теоретический и экспериментальный анализ двигательных возможностей деполимеризующейся микротрубочки.
 - 2.3. Механика изгиба прото-

филамента и взаимодействие с прикреплённым шариком. 2.4. Влияние противодействующей нагрузки на изгиб протофиламента и разборку микротрубочки.

3. Молекулярные устройства для сопряжения деполимеризации микротрубочки с процессивным движением груза — "каплеры" (835).
 - 3.1. Первая физически реалистичная модель каплера — "рукав Хилла".
 - 3.2. Кольцевой каплер Dam1.
 - 3.3. Физические ограничения на процессивное сопряжение с помощью кольца, подобного Dam1.
 - 3.4. Экспериментальный анализ Dam1-зависимого сопряжения.
 - 3.5. Фибриллярные белковые комплексы как каплеры в клетках млекопитающих.

4. Заключение (839).

Список литературы (840).

И.В. Гончар^(1,a), Г.С. Тимошин^(1,b), Н.Б. Гудимчук^(1,2,c), Ф.И. Атауллаханов^(1,3,d)

⁽¹⁾ Центр теоретических проблем

физико-химической фармакологии РАН,
ул. Средняя Калитниковская 30, 109029 Москва,
Российская Федерация

⁽²⁾ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
физический факультет,
Ленинские горы 1, стр. 2, 119991 Москва, Российская Федерация

⁽³⁾ Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет),
Институтский пер. 9, 141701 Долгопрудный,
Московская обл., Российская Федерация

E-mail: ^(a) gonchar94@gmail.com, ^(b) timoshin.gs19@physics.msu.ru,
^(c) ngudimch@gmail.com, ^(d) ataullakhanov.fazly@gmail.com

Статья поступила 3 ноября 2025 г.

1. Введение

Живые клетки существуют вдали от термодинамического равновесия, непрерывно потребляя энергию для поддержания внутренней организации своего содержимого, генерации сил и проведения направленных процессов в среде, в которой непрерывно происходят тепловые флуктуации. Многие ключевые клеточные функции реализуются с помощью биомеханических устройств

на уровне отдельных молекул и их комплексов, которые в широком смысле называют молекулярными машинами [1]. Одна из разновидностей таких машин представляет собой линейные белковые моторы. К ним можно отнести кинезины и динеины, которые перемещаются вдоль жёстких магистральных элементов клеточного скелета — микротрубочек [2, 3]; миозины, которые перемещаются вдоль более гибких элементов клеточного скелета — актиновых филаментов [4]; а также моторы нуклеиновых кислот — хеликазы и транслоказы, которые направлены движутся по ДНК или РНК [5, 6]. Линейные моторные белки выполняют огромное разнообразие функций, например, обеспечивают внутриклеточный транспорт, опосредуют деление клеток, осуществляют движение ресничек и жгутиков, мышечное сокращение, участвуют в изменении формы клеток, выполняют механическую работу по раскручиванию, разделению или перестройке нуклеиновых кислот и нуклеопротеиновых комплексов в процессах репликации, транскрипции и репарации, а также в РНК-зависимых этапах экспрессии генов [5, 7, 8]. Другой разновидностью моторных белков являются вращательные молекулярные моторы, прежде всего F_1F_0 -АТФ-синтазы, которые генерируют крутящий момент, связывая ионные градиенты через мембрану с синтезом или гидролизом АТФ, а также родственные им АТФ-зависимые ионные насосы, обеспечивающие ионный транспорт и подкисление органелл, и моторы, приводящие в движение жгутики бактерий [9]. Все перечисленные виды молекулярных машин циклически потребляют энергию, чаще всего в виде энергии, высвобождающейся при гидролизе молекулы АТФ, или используя энергию трансмембранных градиентов ионов, преобразуя эту энергию в полезную механическую работу.

По сравнению с линейными и вращательными моторами весьма необычным биомеханическим двигателем являются микротрубочки, которые представляют собой динамически нестабильные биополимеры со спонтанными переключениями между фазовыми состояниями [10]. В отличие от линейных и вращательных моторов, которые работают во многом аналогично создаваемым человеком макроскопическим моторам, микротрубочки работают как активные транспортные треки. Они не только позволяют перемещать вдоль себя грузы линейным моторам — кинезинам и динеинам, — но и сами постоянно полимеризуются и деполимеризуются, генерируя силы на своих концах. Эти устройства не имеют явных человекоподобных аналогов, хотя являются базовыми и жизненно важными двигателями в клетках, и именно на них природой возложена ключевая роль в делении клеток — наиболее фундаментальном процессе воспроизводства жизни. В этой работе основное внимание уделяется одному конкретному классу процессов, зависящих от микротрубочек, — тем, которые обеспечивают развитие механических сил и совершение работы за счёт использования энергии деполимеризации микротрубочек.

2. Микротрубочка как двигатель

Микротрубочки участвуют в разнообразных задачах, решаемых клеткой в ходе жизни: они являются одним из основных каркасных элементов клетки [11, 12]; они обеспечивают транспортные магистрали (рельсы) для

движения моторных белков в клетке; они являются основным компонентом разнообразных ресничек и жгутиков, используемых клеткой для движения; наконец, они сами являются двигателем, который обеспечивает направленные механические движения хромосом в процессе деления клетки. В этой главе мы рассмотрим основные структурные и динамические свойства микротрубочки, которые позволяют решать последнюю и, может быть, самую важную задачу — деление клеток.

2.1. Структура и динамика микротрубочки

Стенка микротрубочки построена из димеров тубулина, организованных в спиральную структуру, обычно состоящую из 13 линейных цепей продольно связанных димеров тубулина, называемых протофиламентами (рис. 1). При таком расположении каждая субъединица тубулина контактирует с четырьмя соседями: двумя латеральными и двумя продольными. Меньшее количество контактов имеют только субъединицы тубулина, расположенные на концах микротрубочки, где из раствора могут присоединяться новые димеры тубулина. В цитоплазме концентрация димеров тубулина достигает 24 мкМ [13]. Динамика микротрубочек зависит от нескольких малых молекул, участников энергетического обмена клетки: гуанозинтрифосфата (ГТФ) и гуанозиндифосфата (ГДФ), концентрации которых в цитоплазме составляют 100–200 мкМ и 10–20 мкМ соответственно [14], а также ионов магния и фосфата, концентрации которых составляют ~ 15 –25 мМ и ~ 1 мМ соответственно [14, 15]. Все димеры тубулина способны связывать и расщеплять молекулу ГТФ. В цитоплазме большинство свободных димеров тубулина связано с молекулами ГТФ и ионами магния. Полимеризация и деполимеризация тубулина связаны с реакцией расщепления молекулы ГТФ до ГДФ, т.е. эти процессы связаны с расходом химической энергии, запасённой в молекуле ГТФ.

На рисунке 2 показан цикл полимеризации-деполимеризации микротрубочек. Основными стадиями этого цикла являются: (1) — полимеризация микротрубочек

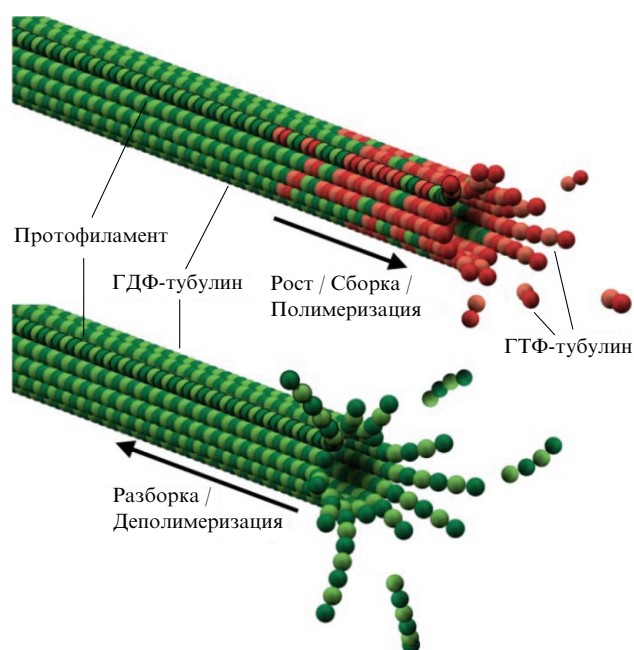


Рис. 1. Структура и динамика микротрубочек.

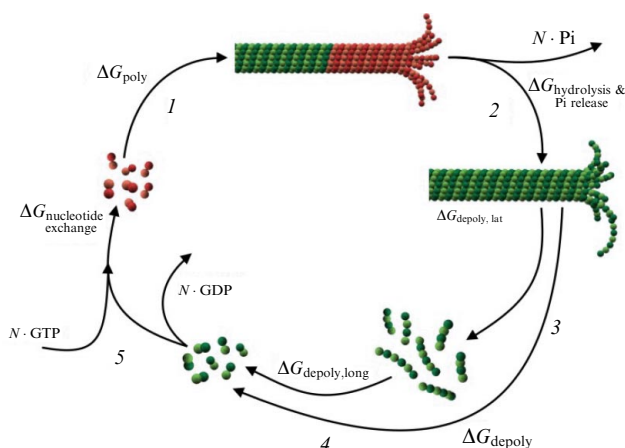


Рис. 2. Термодинамический цикл полимеризации и деполимеризации микротрубочек. Рисунок адаптирован из статей [16, 17]. Цифры в скобках соответствуют фазам термодинамического цикла. (Пояснения в тексте.)

из ГТФ-тубулинов; (2) — гидролиз ГТФ в решётке микротрубочек с последующим высвобождением фосфата; (3) — деполимеризация решётки ГДФ-микротрубочек в олигомеры ГДФ-тубулина; (4) — продольный разрыв олигомеров ГДФ-тубулина; и, наконец, (5) — обмен нуклеотидами, т.е. высвобождение молекул ГДФ и связывание молекул ГТФ с димерами тубулина. Очевидно, что динамика микротрубочек — это энергозатратный процесс: в результате цикла N молекул ГТФ превращаются в N молекул ГДФ и N неорганических фосфатов.

При включении ГТФ-тубулинов в стенку микротрубочек скорость гидролиза связанного с тубулином ГТФ увеличивается на два порядка, поскольку продольно прикреплённые димеры тубулина снижают барьер этой реакции [18, 19]. Таким образом, большинство молекул ГТФ, ассоциированных с тубулином, гидролизуются вскоре после их включения в микротрубочку [20]. Поэтому большая часть тубулина в стенке микротрубочки представляет собой ГДФ-тубулин. Однако, когда ГДФ занимает сайт β -тубулина на растворимых димерах тубулина, белок не полимеризуется [21]. Считается, что эта ситуация объясняет тот факт, что микротрубочки могут подвергаться "катастрофам", при которых медленная полимеризация внезапно превращается в быструю деполимеризацию. Такое поведение было названо "динамической нестабильностью" [22].

Структурные исследования предполагают, что димер тубулина с ГДФ, связанным с его β -субъединицей, изогнут, поэтому он не вписывается в стенку микротрубочки [23]. Таким образом, полимеризованный ГДФ-тубулин, по-видимому, не может принять свою нормальную конформацию из-за связей, образованных с соседними субъединицами в соседних протофиламентах. Когда микротрубочка деполимеризуется, эти ограничивающие связи диссоциируют, и укороченный конец микротрубочки заканчивается зоной латерально несвязанных протофиламентов, которые изгибаются примерно на 22° с каждым димером тубулина в цепи [24]. Эта форма обычно интерпретируется как отражение минимальной энергетической формы димеров ГДФ-тубулина. Таким образом, протофиламент в теле микротрубочки представляет собой линейную структуру из димеров ГДФ-тубулина, которые стремятся изогнуться. Растущий участок микро-

трубочки, содержащий свежестроенные тубулины, молекулы ГТФ которых ещё не подверглись гидролизу, образует стабилизирующую шапку (см. рис. 1) [20, 25]. Эта "ГТФ-шапка" защищает микротрубочку от перехода от сборки к разборке [26].

Хотя существует множество доказательств, подтверждающих существование ГТФ-шапки, её размер и механизм стабилизации остаются предметом дискуссий [12, 27]. Благодаря этой шапке микротрубочка может включать в себя многие сотни новых молекул ГТФ-тубулина, удлиняясь при этом на десятки микрометров. Когда случайно в структуре ГТФ-шапки оказывается довольно много молекул тубулина, успевших перейти в ГДФ-состояние из-за стохастической природы процесса расщепления ГТФ, или когда шапка ослабевает из-за асинхронного удлинения протофиламентов [28–30], происходит переход к укорочению, называемый катастрофой [31]. Деполимеризация идет иначе, чем полимеризация. Вместо пошагового отсоединения отдельных молекул ГДФ-тубулина происходит разрыв латеральных связей. Отдельные протофиламенты отсоединяются друг от друга, и только потом начинают рваться продольные связи. Последовательный разрыв связей резко облегчает процесс деполимеризации, поэтому микротрубочка деполимеризуется со скоростями на порядок большими, чем скорость полимеризации. Протофиламенты, высвободившиеся из тела микротрубочки, стремятся принять равновесную изогнутую конфигурацию. В процессе этого изгибания они могут совершить механическую работу.

Оценим, какова максимальная энергия, которую микротрубочка способна использовать для совершения механической работы при деполимеризации. Изменение свободной энергии в системе, равное энергии гидролиза N молекул ГТФ, распределяется между стадиями цикла [16]:

$$\Delta G_{\text{GTP}} = \Delta G_{\text{poly}} + \Delta G_{\text{hydrolysis, Pi release}} + \Delta G_{\text{depoly}} + \Delta G_{\text{nucl. exchange}}, \quad (1)$$

где ΔG_{poly} — энергия полимеризации ГТФ-тубулина; $\Delta G_{\text{hydrolysis, Pi release}}$ — энергия гидролиза ГТФ и высвобождения фосфата из решётки; ΔG_{depoly} — энергия разборки ГДФ-решётки; $\Delta G_{\text{nucl. exchange}}$ — энергия обмена ГДФ на ГТФ в свободных димерах тубулина.

Уравнение (1) здесь записано в расчёте на одну молекулу ГТФ. Это уравнение накладывает важные термодинамические ограничения на величины сил, которые могут быть развиты при росте и укорочении микротрубочек. Максимальную силу, генерируемую деполимеризацией микротрубочки, можно оценить, предположив, что вся энергия ΔG_{depoly} преобразуется в механическую работу на расстоянии d :

$$F = -\frac{\Delta G_{\text{depoly}}}{d}. \quad (2)$$

Энергию деполимеризации ГДФ-решётки, ΔG_{depoly} , можно рассчитать по уравнению (1), как описано в [16]. Общая энергия гидролиза ГТФ в клетках составляет около $-12,5$ ккал моль $^{-1}$; $\Delta G_{\text{poly}} = RT \ln(c/c_{\text{cr}}) = -3$ ккал моль $^{-1}$; свободная энергия обмена нуклеотидов равна $\Delta G_{\text{nucl. exchange}} = -2$ ккал моль $^{-1}$; свободная энергия гидролиза ГТФ и высвобождения фосфата из решётки оценивается примерно в $-2,5$ ккал моль $^{-1}$. Следо-

вательно, ΔG_{depol} составляет около -5 ккал моль $^{-1}$. Соответственно сила по формуле (2) составит ~ 60 пН на микротрубочку. В микромире это очень впечатляющее значение: оно намного превышает силу, необходимую для перемещения хромосомы млекопитающего через цитоплазму, и может объяснить поразительное наблюдение, что это движение не блокируется в экспериментах, в которых хромосому пытались остановить силами в сотни пиконьютонов [32].

2.2. Теоретический и экспериментальный анализ двигательных возможностей деполимеризующейся микротрубочки

В 2005 г. прецизионные эксперименты на одиночных микротрубочках впервые напрямую подтвердили, что при деполимеризации микротрубочки генерируются значительные по клеточным меркам силы [33]. В этих экспериментах на поверхности покровного стекла сформировали проточную камеру. К стеклу прикрепили затравки, из которых можно выращивать микротрубочки. При вымывании в камеру раствора тубулина из затравок росли искусственные микротрубочки. К раствору тубулина перед введением в камеру было добавлено примерно 10 % тубулина, ковалентно модифицированного биотином. После того как выросли микротрубочки длиной порядка 10 мкм, раствор тубулина был заменён на другой раствор, в котором тубулин, ковалентно окрашенный родамином, был ассоциирован с GMPCPP — медленно гидролизующим аналогом ГТФ. Таким образом на конце трубки вырастал стабилизирующий участок, который блокировал разборку (рис. 3). К поверхности нестабилизированной GMPCPP части микротрубочки лазерным пинцетом подносили шарик микронного размера, покрытый стрептавидином. Стрептавидин образует с биотином хорошо изученную и высокостабильную связь биотин–стрептавидин. Затем микротрубочка с шариком позиционировалась так, чтобы шарик помещался в центр лазерной ловушки, откалиброванной для измерения силы.

После этого камера облучалась интенсивным светом в полосе поглощения родамина. Это вызывало фотодеструкцию стабилизированного конца микротрубочки, и она начинала разбираться [34]. Шарик на поверхности микротрубочки был неподвижен до тех пор, пока не была запущена деполимеризация микротрубочки. По мере деполимеризации микротрубочки шарики часто демонстрировали небольшой рывок в направлении деполимеризации перед тем, как шарик оказывался свободно движущимся в ловушке, поскольку та часть микротрубочки, к которой шарик был прикреплён, деполимеризовалась.

Поскольку эта экспериментальная система не содержала растворимых белков, связанных с шариками, и растворимых нуклеотидов, рывок перед отрывом шарика должен был быть вызван конформационными изменениями, происходившими на укорачивающемся конце микротрубочки, когда волна деполимеризации проходила мимо шарика (рис. 4а) [33]. Регистрируемый при этом лазерной ловушкой "однократный" скачок силы был невелик — едва достигал 0,5 пН. Однако используя молекулярно-механическую модель микротрубочки, авторы пришли к неинтуитивному выводу, что эта измеренная амплитуда силы соответствует действию очень эффективного и мощного двигателя, зависящего от деполимеризации.

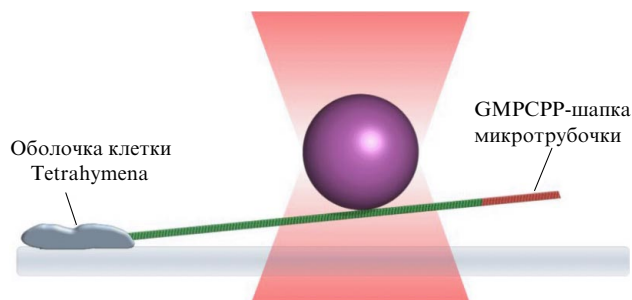


Рис. 3. Схема эксперимента по измерению силы, развиваемой деполимеризующейся микротрубочкой [33]. Первоначально шарик прикреплён латерально к ГДФ-содержащим тубулинам в стенке микротрубочки (зелёный сегмент). Деполимеризация микротрубочки индуцируется фоторазрушением меченного родамином GMPCPP-содержащего конца микротрубочки (красный сегмент). Оболочка клетки жгутикового организма *Tetrahymena* использовалась в качестве источника затравок для нуклеации микротрубочек.

2.3. Механика изгиба протофиламента и взаимодействие с прикреплённым шариком

Для описания поведения такой системы авторами работы [33] была использована математическая модель микротрубочки, которая дала следующую интерпретацию экспериментальных сигналов.

Принимая во внимание силу, которая действует на шарик, помещённый в центр неподвижной оптической ловушки (более подробную информацию см. в работе [35]), положение шарика описывается уравнением Ланжевена в общем виде:

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} + \gamma \frac{d\mathbf{r}}{dt} = -\frac{dU}{d\mathbf{r}} + F(t), \quad (3)$$

где U — потенциальная энергия полной системы, состоящей из микротрубочки, связанной с шариком в силовом поле оптической ловушки; m — масса шарика; γ — его коэффициент вязкого сопротивления; а $\mathbf{r}$ описывает векторное смещение центра шарика. Функция $F(t)$ описывает силу, задающую броуновские флуктуации. Деполимеризация микротрубочки — относительно медленный процесс ($10-500$ нм с $^{-1}$), поэтому всеми ускорениями в этой системе можно пренебречь. Для типичных скоростей разборки микротрубочки второй член в левой части уравнения (3) также на три порядка меньше развиваемых сил. Кроме того, для миллисекундных и более длительных процессов $\langle F(t) \rangle = 0$. Таким образом, положение шарика полностью определяется уравнением:

$$\frac{dU}{d\mathbf{r}} = 0 \quad (4)$$

и, следовательно, просто балансом всех приложенных сил.

Два геометрических объекта — сфера диаметром 1 мкм и цилиндр диаметром 25 нм — могут контактировать, по сути, только в геометрической точке. В реальном случае, например микротрубочка и покрытый белком шарик, имеют несколько большую площадь контакта, если учесть, что при связывании с микротрубочкой молекулы белка, пришитые к поверхности шарика, могут растягиваться. Расчёты показывают, что даже в этом случае покрытый стрептавидином шарик может связаться не более чем с тремя–пятью димерами тубулина вдоль длины одного или двух соседних протофиламен-

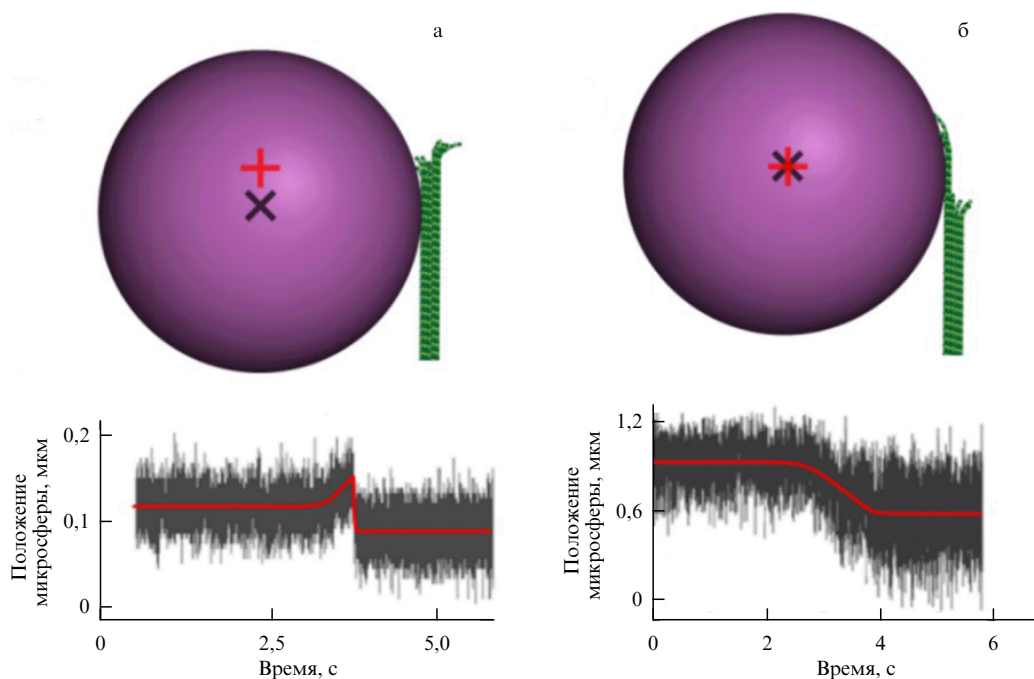


Рис. 4. Сценарии разборки микротрубочек, приводящие и не приводящие к развитию силы в экспериментах с лазерной ловушкой. (а) На графике показан экспериментальный сигнал, зарегистрированный на квадрантном фотодетекторе от покрытого стрептавидином шарика и деполимеризующейся биотинилированной микротрубочки. Положение шарика быстро осциллирует (чёрная кривая) из-за теплового шума (красная кривая — среднее положение). Диаграммы над сигналом иллюстрируют интерпретацию. Изначально шарик (не в масштабе) прикреплен к стабильной стенке микротрубочки и находится под действием небольшой силы, специально приложенной, чтобы выпрямить конфигурацию микротрубочки с шариком. Поэтому центр шарика (чёрный крест) смещён относительно центра ловушки (красный крест). В конце эксперимента микротрубочка деполимеризуется, и шарик отделяется от микротрубочки; средний шум такого свободного от микротрубочки шарика, все ещё захваченного ловушкой, немного больше, и шарик теперь находится в центре ловушки. Переход между этими состояниями содержит быстрый скачок: шарик смещается от центра ловушки под действием силы изгиба протофиламентов. Затем связанные с шариком тубулины отсоединяются от конца микротрубочки, и шарик резко падает в центр ловушки. (б) Пример экспериментального сигнала, демонстрирующего мягкость кончиков протофиламентов. Под действием сил со стороны ловушки протофиламенты могут изгибаться в направлении, противоположном тому, которое определяется их естественной кривизной. В результате микротрубочка не может отклонить центр шарика от центра ловушки (чёрный и красный кресты совпадают по положению).

тов [33]. Для простоты авторы рассмотрели механику этой системы, предполагая, что шарик прикреплен латерально только к одному протофиламенту в стенке микротрубочки. Диаметр шарика (1000 нм) намного больше линейной области прикрепления шарика (20–60 нм). Когда начинается деполимеризация, латеральные связи между соседними протофиламентами распадаются, и димеры тубулина, содержащие ГДФ, начинают изгибаться в сторону своей минимальной энергетической конфигурации. Локальная кривизна полностью изогнутого протофиламента, содержащего ГДФ, значительно больше, чем у шарика (кривизны определяются как обратные величины радиусов наиболее подходящих окружностей для этих форм). Поверхность шарика, таким образом, препятствует достижению прикрепленным протофиламентом своей равновесной конфигурации, а сила изгибающихся димеров, F_{PF} , толкает шарик в направлении, в первую очередь перпендикулярном оси микротрубочки (рис. 5).

Поскольку шарик помещен в силовое поле сфокусированного лазерного луча, он также испытывает восстанавливающую силу от ловушки, F_{trap} . Микротрубочка обладает присущей ей, хотя и небольшой, гибкостью, поэтому, когда ловушка тянет шарик, она деформирует микротрубочку (см. рис. 5). Прикрепленный к шарiku протофиламент также деформируется под действием

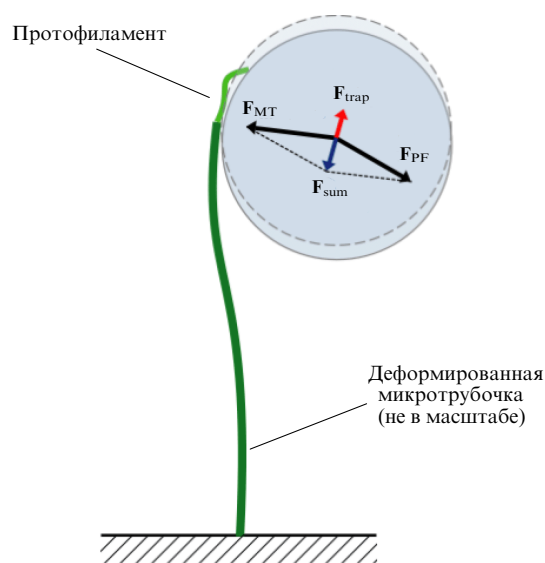


Рис. 5. Силы, действующие на шарик, связанный с протофиламентом. Начальное положение шарика, прикрепленного к неповрежденной микротрубочке, показано пунктирными линиями. Впоследствии шарик смещается (сплошной контур), вращаясь вокруг места прикрепления. (Подробности в тексте. Рисунок адаптирован по [36].)

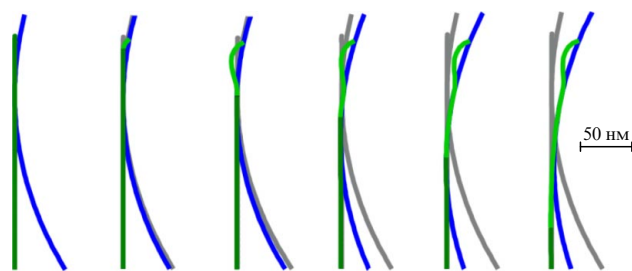


Рис. 6. Расчётные конфигурации шарика (синий контур) и деполимеризующейся микротрубочки (зелёный). Когда микротрубочка начинает укорачиваться, ассоциированные с шариком субъединицы тубулина (светло-зелёный) изгибаются и слегка поворачивают шарик. Серые контуры показывают начальную конфигурацию системы. (Рисунок адаптирован по [36].)

силы захвата ловушкой. Упругие силы, возникающие в результате этих деформаций, а также в результате растяжения связей биотин–стрептавидин между протофиламентом и прикреплённым к нему шариком, приводят к реакции F_{MT} .

В устойчивом состоянии векторная сумма F_{MT} и F_{RF} действует в основном вдоль оси микротрубочки и в направлении от разбирающегося кончика (F_{sum} ; рис. 5). Рисунок 6 показывает временную последовательность рассчитанных конфигураций "шарик–микротрубочка" в этой системе [33].

Легко видеть, что, поскольку шарик стабильно прикреплён к протофиламенту, он не может двигаться по его поверхности. Вместо этого шарик слегка вращается, пока система движется к своей устойчивой конфигурации (см. рис. 6). Расчёты показали, что баланс достигается при очень небольшом смещении шарика в направлении, перпендикулярном оси микротрубочки (около 7 нм для микротрубочки длиной 5500 нм с диаметром шарика 1000 нм и жёсткостью ловушки $0,01 \text{ пН нм}^{-1}$). Смещение шарика вдоль оси микротрубочки несколько больше (50–60 нм для этих значений параметров) и достигается, когда компоненты F_{trap} и F_{sum} , параллельные оси микротрубочки, становятся равны друг другу. Величина силы, измеренная в эксперименте (компонента F_{trap} , параллельная микротрубочке; рис. 5), значительно меньше силы F_{RF} , с которой протофиламент давит на шарик. Эта механическая интерпретация подтверждается экспериментальным наблюдением, что большие силы регистрируются в таком эксперименте при использовании шариков меньшего диаметра [37], как и предсказывает эта модель (рис. 7). Расчёты показали, что один протофиламент, нажимающий на прикреплённый шарик с силой около 5,8 пН, смещает шарик размером 1 мкм в силовом поле лазера на расстояние, соответствующее силе захвата 0,5 пН. Это значение прекрасно согласуется с величиной сил, измеренных в экспериментах с покрытыми стрептавидином шариками (максимальная измеренная сила составила 0,45 пН) [33]. Поэтому, если принять во внимание эффект "рычага", которым по сути является радиус шарика, эти экспериментальные результаты подразумевают, что сила, развиваемая изгибающимся протофиламентом в этой экспериментальной системе, составляет около 5,2 пН — всего на 1 пН меньше термодинамического максимума [35].

Интересно сравнить силы, развиваемые в этой механической системе с силами, которые действуют на

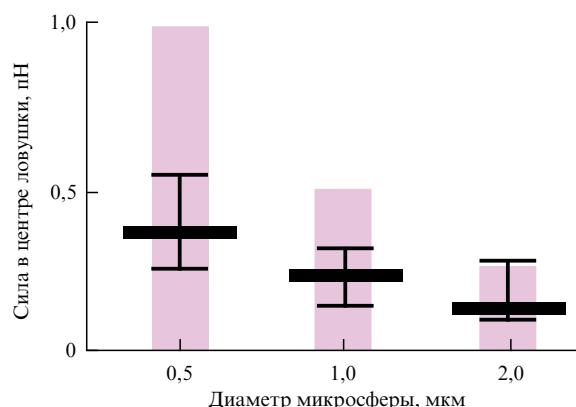


Рис. 7. Сила, измеренная в центре шарика, зависит от диаметра шарика. Горизонтальные линии соответствуют экспериментальным сигналам (среднее значение с интерквартильным размахом) [37]. Фиолетовые столбцы отображают диапазон амплитуд силы, предсказанных моделью.

шарик диаметром 1 мкм, движущийся вдоль прикреплённой к покровному стеклу микротрубочки под действием моторного белка кинезина. Эти системы имеют некоторое сходство; например, в обеих системах шарик прикреплён к микротрубочке с помощью белковых связей, которые имеют схожий характерный размер. Кроме того, как и в случае с движением, зависящим от деполимеризации, система на основе кинезина относительно статична, и членами, описывающими ускорение и вязкое трение можно пренебречь. Однако эти системы имеют разные геометрические свойства, поскольку кинезин движется по микротрубочке, которая не разбирается. Когда кинезин начинает движение, он прикладывает силу к поверхности шарика в направлении движения мотора, в то время как сила захвата ловушки в опыте с деполимеризующейся микротрубочкой прикладывается в центре шарика. Сила, развиваемая кинезином, создает крутящий момент, который вращает шарик и прижимает его к стенке микротрубочки. Эта сила компенсируется упругими силами со стороны стенки микротрубочки. Если трение шарика о микротрубочку пренебрежимо мало, достигается устойчивое состояние, в котором сила, развиваемая кинезином, равна противодействующей силе лазерной ловушки. При изгибании протофиламента геометрия системы более сложная и отличается для разных режимов соединения груза с концом микротрубочки. Чтобы избежать неверных толкований, следует проанализировать соответствующую механику для каждой экспериментальной системы и режима прикрепления.

2.4. Влияние противодействующей нагрузки на изгиб протофиламента и разборку микротрубочки

Проведённый в работе [33] анализ кинетики движения шарика под действием силы деполимеризации позволяет получить дополнительные детали взаимодействия шарика и микротрубочки. Вскоре после запуска деполимеризации микротрубочки прикреплённый шарик начинает двигаться к стабильно прикреплённому минус-концу микротрубочки, что уводит его от центра лазерной ловушки (см. рис. 4). Это движение можно отслеживать с точностью до нанометра, измеряя положение шарика с помощью квадрантного фотодетектора.

Кинетика изменений координат шарика должна дать информацию о скорости, с которой связанные с шариком протофиламенты генерируют силу. Если эта интерпретация верна, характерное время для этого движения должно соответствовать скорости, с которой разбирается микротрубочка. Скорость деполимеризации микротрубочки зависит от концентрации Mg^{2+} : при более высоких концентрациях Mg^{2+} микротрубочки разбираются быстрее. Это предсказание было проверено с использованием буферов с различными концентрациями ионов Mg^{2+} [38]. Действительно, характерное время для восходящей части сигнала силы уменьшалось с увеличением концентрации Mg^{2+} [33], как и следовало ожидать.

3. Молекулярные устройства для сопряжения деполимеризации микротрубочки с процессивным движением груза — "каплеры"

Как было описано ранее, деполимеризация микротрубочек играет ключевую роль в одном из фундаментальных процессов жизни — сегрегации хромосом во время деления клетки. Хромосомы в митозе связываются с концами микротрубочек с помощью специализированной белковой структуры, кинетохора. Во время деления клетки хромосомы перемещаются на концах деполимеризующихся микротрубочек, не теряя связи с деполимеризующимся концом. Более того, хорошо известно, что во многих типах клеток микротрубочки укорачиваются именно на том конце, который связан с кинетохором [39]. Открытие того факта, что деполимеризация микротрубочек может транспортировать хромосомы, вместе с этими особенностями движения хромосом означает, что белки, связанные с кинетохором, обеспечивают стабильную связь между хромосомой и укорачивающимися кончиками микротрубочек. Эти белки могут (1) эффективно использовать энергию деполимеризации микротрубочек для выполнения работы по процессивному движению хромосом и (2) обеспечивать стабильность крепления при больших и переменных нагрузках. Таким образом, мы приходим к понятию кинетохорного "каплера" — макромолекулярного устройства, которое служит для сопряжения процесса деполимеризации с устойчивым движением хромосомы. Полноценно процессивно работающим мотором становится только система — деполимеризующаяся микротрубочка и устройство сопряжения, каплер.

Сосредоточимся на определении основных особенностей теоретически возможных и реально существующих каплеров.

3.1. Первая физически реалистичная модель каплера — "рукав Хилла"

Террелл Лесли Хилл был бы знаменит своим выдающимся вкладом в теоретическую биофизику, даже если бы он не предложил первое явное описание устройства сцепления кинетохор-микротрубочка [40]. Но это умозрительное устройство, обычно называемое "рукавом Хилла", оказало большое влияние на исследователей митоза, и соответствующая публикация 1985 г. является обязательной ссылкой в любом обзоре по этой теме. Эта теоретическая модель, основанная на классической идее смещённой диффузии, была очень влиятельной, отчасти

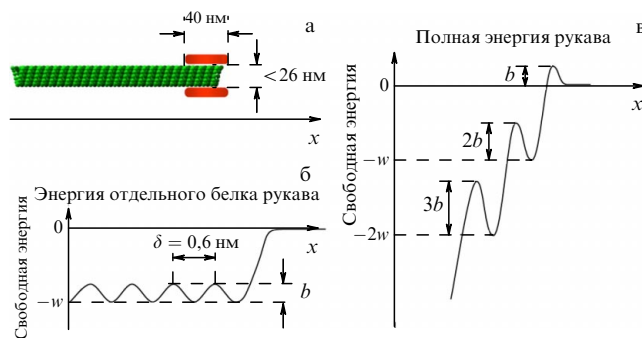


Рис. 8. Энергия взаимодействий в модели "рукава Хилла" [40]. (а) Схема рукава — узкого цилиндра, способного к смещённой диффузии и связанного с динамическим концом микротрубочки. (б) Профиль свободной энергии для движения отдельного белка рукава вдоль микротрубочки. С учётом наличия в составе микротрубочки 13 протофиламентов, расстояние между сайтами связывания белков рукава с микротрубочкой составляет $8 \text{ нм}/13 = 0,6 \text{ нм}$. В жёсткой структуре Хилла энергетический барьер b для переходов кинетохорного белка, связанного с микротрубочкой, из одного места связывания в другое ниже по модулю по сравнению с энергией w полного отрыва белка от микротрубочки на её конце. (в) Рукав блуждает вдоль поверхности микротрубочки, синхронно перемещая все свои связывающие элементы. Большее перекрытие рукава и микротрубочки соответствует более низкой свободной энергии, но требует больше энергии для переходов. (Рисунок адаптирован из [40].)

потому, что она была как конкретной, так и количественной. Термин "смещённая диффузия" — это не очень удачный перевод с английского классического термина "biased diffusion", который означает диффузионное движение, в котором присутствует тенденция системы дрейфовать, двигаться с некоторым предпочтением в определенном направлении. Хилл [40] подробно описал конструкцию "рукава" — цилиндрического устройства, охватывающего и взаимодействующего с концом микротрубочки (рис. 8). Он продемонстрировал, что при разумных значениях параметров модели этот рукав может двигаться вместе с укорачивающимся концом микротрубочки — фундаментальное открытие.

Рукав, предложенный Хиллом, представляет собой жёсткую узкую трубку на кинетохоре, которая лишь немного шире микротрубочки и имеет длину около 40 нм (рис. 8а). Можно было бы задаться вопросом о вероятности того, что кончик растущей микротрубочки попадёт в такой узкий канал, но Хилл подсчитал, что это не будет невероятным событием [40]. Однако последующие работы других исследователей показали, что для захвата всех 46 хромосом (как в клетках человека) за разумное время необходимо ввести некоторые дополнительные предположения о взаимодействиях микротрубочки с хромосомой [41]. Но не будем на этом останавливаться и предположим, что это реально. Канал длиной 40 нм соответствует примерно длине пяти димеров тубулина в одном протофилamente. В микротрубочке, состоящей из 13 протофиламентов, рукав может взаимодействовать с 65 димерами. Внутренняя часть рукава Хилла должна была быть выстлана белками, связывающими микротрубочки; в опубликованной модели число таких белков также составляло 65. Хилл также указал, что расстояние между соседними сайтами для связывания каплера с тубулином должно составлять $6,15 \text{ \AA}$. Из этого следовало, что либо каждый димер тубулина, либо белок рукава имел 13 уча-

стков связывания по своей длине. Это предположение представляется довольно спекулятивным. Ключевой особенностью белков рукава Хилла является то, что они позволяют рукаву одномерно диффундировать по поверхности микротрубочки. Диффузия по поверхности микротрубочки означает, что белки рукава могут перескакивать из одного сайта связывания на микротрубочке в другой, не теряя связи с микротрубочкой. В модели Хилла предположение о диффузии по поверхности без отрыва является естественным следствием конструкции рукава, поскольку положение каждого белка зафиксировано в жёстком каркасе рукава. Эта особенность модели оказывает выраженное влияние на энергетику взаимодействия рукава с микротрубочкой. Структура рукава эффективно снижает энергетические барьеры для отсоединения отдельных сайтов связывания рукава во время его диффузии (параметр b , рис. 8б, в) по сравнению с энергетическим барьером, который рукав должен преодолеть, чтобы полностью отделиться от тубулина на конце микротрубочки (параметр w). Более того, каждый сайт связывания рукава может двигаться только синхронно с другими 64 связывающими белками в рукаве — специфическая и уникальная характеристика этого рукава. Такой ансамбль белков, будучи приведённым в контакт с концом микротрубочки, движется вместе с рукавом как с целым, демонстрируя смещённую диффузию к положению, которое даёт большее перекрытие с поверхностью микротрубочки. Более полное погружение микротрубочки внутрь рукава соответствует большему количеству связей между белками рукава и тубулина, а следовательно, и более низкой свободной энергии взаимодействия каплера с микротрубочкой. Молекулярная "шероховатость" взаимодействия белков рукава с микротрубочкой, выражаемая параметром b , предотвращает полное погружение микротрубочки в рукав, и каплер достигнет динамического стационарного состояния при некоторой глубине. Легко видеть, что если конец микротрубочки, который вставлен в этот рукав, начинает укорачиваться, это вызывает диффузионное смещение рукава к новому положению равновесия. Рукав и прикрепленная к нему хромосома будут следовать за укорачивающимся концом микротрубочки, пытаясь восстановить перекрытие с уменьшенной энергией связи [42]. Для известной скорости движения хромосомы (около 1 мкм мин^{-1}), коэффициента диффузии хромосомы и геометрической структуры рукава Хилл определил энергетические параметры взаимодействия рукава и микротрубочки: $b = 0,3 k_B T$ и $w = 2,5 k_B T$. Такой рукав может выдерживать относительно широкий диапазон нагрузок, двигаясь при этом с постоянной скоростью. Последняя особенность перекликается с зависимостью силы от скорости, измеренной для хромосом в сперматоцитах кузнечика, где скорость начала падать только при очень высоких нагрузках (около 100 пН; нагрузка на одну микротрубочку, конечно, меньше, поскольку эти кинетохоры связывают много микротрубочек) [32]. Однако в модели Хилла перекрытие между рукавом и микротрубочкой сокращается с увеличением нагрузки, пока рукав окончательно не отсоединяется при нагрузке от 9 до 15 пН на микротрубочку [42]. Таким образом, рукав не очень эффективен в преобразовании энергии, выделяющейся при деполимеризации микротрубочки — КПД около 20–25 %, что согласуется с более общими оценками эффективности смещённой диффузии.

Несмотря на то, что прошло 40 лет с публикации работы о рукаве Хилла, по-прежнему существует значительный интерес к модели рукава для зацепления хромосом. Тем не менее, сделанные за это время открытия делают гипотезу о существовании чего-то похожего на рукав Хилла или другого устройства, использующего механизм смещённой диффузии, маловероятной. Одно из таких открытий — обнаруженная на конце деполимеризующихся и полимеризующихся микротрубочек структурная особенность в виде венчика из раскрывающихся изогнутых протофиламентов [43–46]. Рукав плохо согласуется с такой геометрией. Во время публикации Хилла этот факт был неизвестен. Второе открытие — это установление способности гетеродекамера белков с общим названием Dam1 образовывать кольца вокруг микротрубочек [47, 48]. Сначала казалось — вот, наконец, найдена структура, хоть в чем-то похожая на рукав. Но дальнейшие исследования этого комплекса показали, что механизм движения кольца ни в какой степени не является механизмом смещённой диффузии. Работает, вероятно, другой механизм — "силового удара" протофиламента, который активно смещает кольцевой каплер по мере деполимеризации микротрубочки. Рассмотрим этот каплер более подробно.

3.2. Кольцевой каплер Dam1

Кольцевой каплер был теоретически предложен Кошландом и др. [49] в 1988 г. на основе их открытия того, что укорачивающиеся *in vitro* микротрубочки могут сохранять связь с кинетохорами на иммобилизованных хромосомах, а также на основе более ранних описаний кольцевых и спиралевидных олигомеров тубулина, которые образуются при определенных условиях деполимеризации микротрубочки [50]. Первый теоретический анализ передачи силы плоским жёстким кольцом, которое не связывается со стенкой микротрубочки, был проведен после разработки количественной молекулярно-механической модели микротрубочки [35]. Было показано, что механизм силового удара по кольцу при изгибании отсоединяющегося от микротрубочки протофиламента может обеспечить максимальное использование энергии деформации, запасённой в решётке микротрубочки, и, следовательно, может генерировать максимально возможную силу, пока кольцевой каплер не ограничивает полную диссоциацию боковых связей между димерами тубулина. Это означает, что кольцо не должно иметь слишком маленький внутренний диаметр; его оптимальное значение составляет 35–40 нм при диаметре микротрубочки 25 нм. По этой причине механизм силового удара не может работать в пределах узкого рукава, постулированного Хиллом [40]. Исследования кольцевых структур получили мощный импульс, когда был обнаружен первый кинетохорный комплекс с кольцевой геометрией. Две команды — лаборатория Барнс/Друбина и лаборатория Харрисона — обнаружили, что мульти-субъединичный комплекс из почкующихся дрожжей, называемый Dam1 (или DASH), спонтанно собирается в кольца из 15–16 субъединиц вокруг микротрубочки [47, 48]. Электронно-плотное ядро кольца Dam1 отделено от внешней стенки микротрубочки зазором в 3–6 нм — расстояние, очень похожее на зазор в 4–5 нм, предсказанный для энергоэффективного кольцевого соединения [35]. Однако типичное расстояние для белок-белковых взаимодействий намного короче зазора

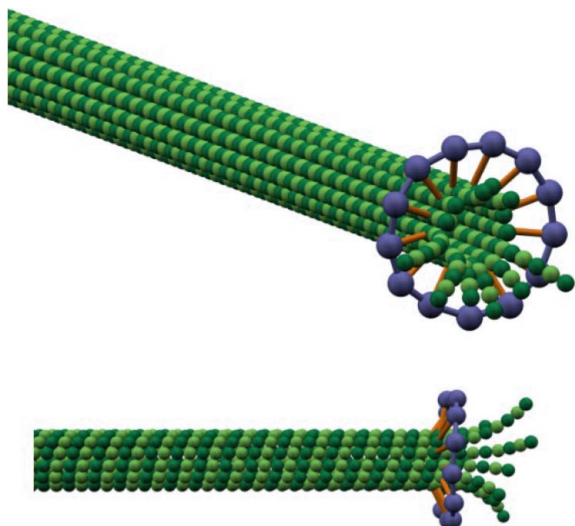


Рис. 9. Кольцевой каплер Dam1 на микротрубочке. Субъединицы белкового комплекса Dam1 показаны в виде сиреневых шариков; линкеры, обеспечивающие прикрепление к микротрубочке, изображены оранжевым.

между ядром кольца Dam1 и стенкой микротрубочки. Опираясь на эти данные, в работе [35] была предложена идея, что широкий диаметр служит для максимизации энергетической эффективности кольца Dam1, тогда как адгезию к стенке микротрубочки обеспечивают некоторые радиальные линкеры (рис. 9), которые плохо визуализированы в структурных данных.

Разработанная на этой основе теория подчеркивает, что оптимальная производительность такого соединителя будет достигнута, если линкеры будут гибкими, поскольку жёсткие связи эффективно уменьшают диаметр кольца. Это предсказание ещё не было проверено напрямую, хотя структурные исследования предполагают, что направленные внутрь выступы в кольце Dam1 не являются жёсткими [51]. Более того, предсказание модели о том, что такие линкеры должны способствовать определённым предпочтительным ориентациям кольца Dam1 на стенке микротрубочки, было подтверждено экспериментально [37]. Стоит подчеркнуть, что гибкость линкеров обеспечивает их несколько независимое поведение, в отличие от рукава Хилла, где все связи между микротрубочкой и рукавом диссоциируют и повторно связываются синхронно.

3.3. Физические ограничения на процессивное сопряжение с помощью кольца, подобного Dam1

Точно так же, как рукав Хилла был олицетворением механизмов смещённой диффузии, кольцо Dam1 обычно обсуждалось в связи с силовыми ударами протофиламента. Однако моделирование показывает, что механизм движения любого кольца определяется не столько его геометрией, сколько параметрами, описывающими связывание кольца с микротрубочкой. В зависимости от прочности этих связей кольцо может двигаться либо с помощью смещённой диффузии, либо с помощью вынужденного блуждания и, по сути, даже с помощью комбинации этих механизмов [52].

Если энергия, с которой каждый радиальный линкер связывается со стенкой микротрубочки, относительно низкая ($0,5 k_B T$), кольцо с 13 такими связями будет де-

монстрировать одномерную диффузию на стенке микротрубочки. Когда микротрубочка деполимеризуется, отгибающиеся протофиламенты могут служить барьером, поскольку их радиальный охват значительно больше диаметра кольца. В этом случае тепловые движения кольца становятся смещёнными. Хотя технически эти изгибающиеся протофиламенты толкают слабосвязанное кольцо, когда оно соприкасается с ними, при отсутствии нагрузки этот аспект их взаимодействия механически незначителен из-за низкого сопротивления скольжению кольца. Этот сценарий, по-видимому, даёт хорошее объяснение тому, как кольцо обеспечивает процессивное соединение хромосом с деполимеризующейся микротрубочкой. Но, как и в случае других механизмов смещённой диффузии, "ахиллесова пята" такого процесса заключается в его поведении под нагрузкой. Во-первых, тепловые флуктуации не могут поддерживать транспорт больших грузов на конце полимера, который укорачивается с физиологически значимыми скоростями. Во-вторых, слабосвязанное кольцо вряд ли способно обеспечить поддержание стабильного прикрепления к укорачивающемуся концу микротрубочки. Например, энергия связи в $3 k_B T$ на линкер не может предотвратить отсоединение кольца, образующего 13 прикреплений к стенке микротрубочки, когда нагрузка составляет более 6 пН [52].

Авторы работы [52] приходят к выводу, что такой механизм кольцевой связи теоретически возможен и может быть приемлемым решением для зависимого от микротрубочек транспорта в некоторых биологических системах, где медленная кинетика движения или большие нагрузки не являются проблемой. Однако слабо связанное кольцо не может сохранять свое прикрепление к концу микротрубочки при больших и переменных нагрузках. Во время митоза кинетохор может иногда испытывать большую нагрузку; переменная нагрузка или какое-либо случайное событие могут приостановить деполимеризацию или вызвать её переключение в рост. Чем слабее сцепление кольца со стенкой микротрубочки, тем легче оно отсоединяется. Более высокая стабильность прикрепления кольца достигается, если спицы сильнее связываются со стенкой микротрубочки. Однако, если связывание чрезмерно сильное, даже мощные силовые удары протофиламента больше не смогут перемещать кольцо вдоль стенки микротрубочки, и оно будет блокировать деполимеризацию. Это рассмотрение демонстрирует дихотомию кольцевого каплера, возникающую из-за антагонистических требований к стабильности прикрепления каплера (более высокая энергия связи) и к скольжению каплера (более низкая энергия связи). Теория помогает указать диапазон средств кольца, который обеспечивает приемлемый компромисс — от 10 до $14 k_B T$ на связь [52]. Например, при $13 k_B T$ сила отсоединения, как прогнозируется, увеличится до 40 пН, тогда как такое кольцо все ещё может двигаться под действием силы изгиба протофиламентов. Оно не будет иметь обнаружимых диффузионных движений и, следовательно, будет двигаться исключительно вместе с концом микротрубочки. В этом случае каждый линкер движется вдоль одного протофиламента, перескакивая с одного места связывания на другое, подобно АТФ-зависимому моторному белку типа кинезина, только энергия для движения кольца обеспечивается гидролизом ГТФ, связанного с тубулином.

3.4. Экспериментальный анализ Dam1-зависимого сопряжения

Теоретическое моделирование выявило связь между прочностью сцепления кольца с микротрубочкой, скоростью диффузии этого кольца и степенью, в которой кольцо без нагрузки должно замедлять скорость деполимеризации микротрубочки [52]. Все эти и другие Dam1-зависимые явления отражают аспекты взаимодействия гетеродекамеров Dam1 со стенкой микротрубочки, поэтому их количественные характеристики должны соответствовать друг другу. Однако сложность этой системы и значительное расхождение опубликованных экспериментальных измерений привели к противоречивым взглядам на механизм сопряжения реальным кольцом Dam1. Два наиболее важных параметра взаимодействия Dam1-тубулин — их энергия связывания и скорость диффузии Dam1 на поверхности микротрубочки — всё ещё обсуждаются.

Вестерманн и др. [47] использовали биохимический подход для оценки константы диссоциации между гетеродекамером Dam1 и микротрубочкой; их данные предполагают, что это значение находится в субмикромольном диапазоне. Однако без знания пути олигомеризации Dam1 и особенностей связывания микротрубочки эта константа не определяет однозначно энергию связывания тубулина с Dam1. Часть наблюдаемой энергии связывания могла быть результатом взаимодействий компонентов Dam1-комплекса между собой, поэтому это значение можно использовать только как верхнюю оценку для связывания Dam1-микротрубочка ($\sim 1 k_B T$). Однако сродство к микротрубочке мутантного комплекса Dam1 с пониженной способностью образовывать кольца аналогично сродству Dam1 дикого типа [47, 53], что позволяет предположить, что большая часть наблюдаемого взаимодействия соответствует связыванию Dam1-микротрубочка. Гесто и др. [54], используя анализ на основе микроскопии, пришли к выводу, что сродство Dam1-микротрубочка на два порядка сильнее. Однако можно показать, что гидролиз ГТФ не может обеспечить достаточно энергии для перемещения кольца со столь сильным связыванием. Наиболее простая мера взаимодействия между кольцом Dam1, окружающим микротрубочку, получается из анализа *in vitro* скорости движения кольца без нагрузки [55]. Наблюдаемая скорость, с которой кольцо Dam1 отслеживает укорачивающуюся микротрубочку, подразумевает энергию от 13 до $15 k_B T$ на связь Dam1-тубулин, что согласуется с биохимическими данными [47].

Как было сказано ранее, кольцо с такими умеренно сильными связями не должно показывать наблюдаемой диффузии в биологически значимой временной шкале многих минут. Однако в первой публикации такого рода был сделан вывод о том, что кольца Dam1 диффундируют очень быстро ($0,05 \text{ мкм}^2 \text{ с}^{-1}$) [56], хотя эта интерпретация не учитывала способность гетеродекамеров Dam1 образовывать различные олигомерные комплексы, которые различаются по размеру и геометрии [55]. Последующие количественные исследования диффузии комплексов Dam1 показали, что этот высокий коэффициент диффузии характеризует тепловые движения только одной–двух субъединиц Dam1 [54, 55]; более крупные олигомеры Dam1 диффундируют гораздо медленнее [55]. Эти наблюдения оценивают диффузию полного кольца Dam1 в $10^{-7} \text{ мкм}^2 \text{ с}^{-1}$, что предполагает более $7 k_B T$ энергии связывания Dam1-тубулин.

3.5. Фибриллярные белковые комплексы как каплеры в клетках млекопитающих

Несмотря на убедительные данные о способности комплекса Dam1 выступать в роли каплера, сопрягающего движение хромосом с микротрубочками в дрожжах, гомологи и даже аналоги, способные создавать кольца вокруг микротрубочек в высших организмах, таких как животные, не были обнаружены [57, 58].

Электронная томография кинетохоров млекопитающих, однако, позволила обнаружить тонкие фибриллы, соединяющие изогнутые протофиламенты непосредственно с внутренней зоной кинетохора. Количественное исследование формы концов микротрубочки, связанных с кинетохорами, показало, что протофиламенты этих микротрубочек имеют иную форму, чем протофиламенты на концах микротрубочек, растущих или укорачивающихся *in vitro* [58]. Ассоциированность протофиламентов с фибриллами коррелирует с их локальным выпрямлением, что позволяет предположить, что эти конформационные изменения вызваны силами, действующими через фибриллы.

Эти экспериментальные результаты вдохновили авторов работы [58] на создание компьютерной модели каплера, состоящего из фибрилл. Используя ранее разработанную молекулярно-механическую модель деполимеризующихся микротрубочек и вводя в неё кинетохорные фибриллы, в качестве пружин, соединяющие тубулин в изгибающихся протофиламентах с хромосомой, удалось проанализировать теоретическое устройство каплера нового типа (рис. 10).

В рассмотренной модели предполагалось, что фибриллы присутствуют в неограниченных количествах и

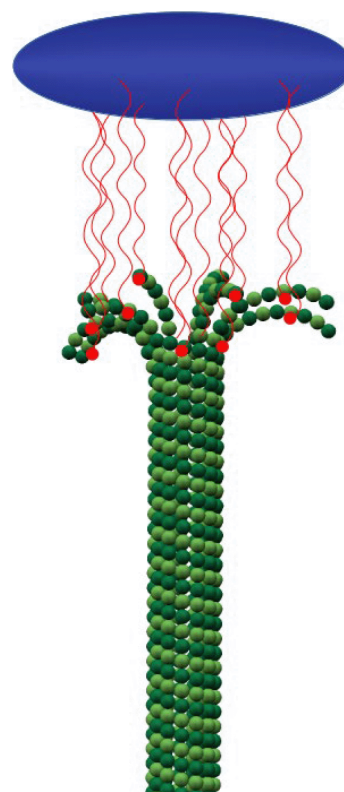


Рис. 10. Модель фибриллярного каплера, предложенного в статье [58]. Красным показаны фибриллярные белки, соединяющие конец микротрубочки с хромосомой.

могут связываться с тубулином в случайных местах вдоль протофиламентов, но не могут связываться с растворимым тубулином. Поскольку протофиламенты стремятся к своей минимальной энергетической конформации, они оказывают силовой удар на связанную фибриллу, тем самым приводя к перемещению хромосомы. Когда тубулин деполимеризуется с кончика изгибающегося протофиламента, связанная фибрилла высвобождается и пополняет множество фибрилл, взаимодействующих с протофиламентами.

С этими предположениями модель продемонстрировала, что силовые удары протофиламентов могут устойчиво перемещать груз против значительной нагрузки. Проведённый анализ показывал, что такой гипотетический каплер был бы даже более энергоэффективен, чем кольцо Dam1. Кольцо, которое связывает микротрубочки достаточно сильно, чтобы обеспечить процессивное сцепление, препятствует укорочению микротрубочки и снижает полезную работу, которую может выполнить деполимеризация микротрубочки [37]. Напротив, фибриллярный каплер не должен перемещаться от одного места связывания к другому на стенке микротрубочки; фибриллы подвергаются циклам отсоединения и повторного присоединения, поэтому эффективность двигателя деполимеризации не ограничена. Эта особенность может быть особенно ценной в клетках, где хромосомы большие или испытывают значительную противодействующую силу их движению.

Однако у фибрилл есть явный недостаток: они соединяются с протофиламентами микротрубочки стохастически и независимо друг от друга. Таким образом, если некоторые из них не смогли образовать прочные связи, несвязанные протофиламенты могут потерять связь с хромосомой. В реальной микротрубочке появление свободно отсоединяющихся протофиламентов, скорее всего, приведёт к распаду микротрубочки и связь с хромосомой будет потеряна. Этот тип связи может работать только в клетках, в которых кинетохоры прикреплены к многочисленным микротрубочкам; потеря одной такой связи не будет иметь серьезных последствий. Эта модель на основе фибрилл далека от того, чтобы дать удовлетворительные ответы на все физиологические вопросы о сопряжении деполимеризации микротрубочки с кинетохором. Например, она не объясняет, как хромосомы могут двигаться на концах удлиняющихся микротрубочек. Скорее, эту модель следует рассматривать как прототип новой стратегии сопряжения, управляемой механизмом, зависящим от рабочего хода, и не полагающейся на жёсткую охватывающую структуру, но способной работать без скольжения вдоль стенки микротрубочки.

На роль фибриллярного каплера "примерялись" различные белки, обладающие соответствующей вытянутой структурой, такие как белок CENP-F [59], CENP-E [60, 61] и кинетохорный комплекс Ndc80 [62]. Большая часть текущих работ сосредоточена именно на последнем — мульти-субъединичном комплексе Ndc80, который обнаружен в кинетохорах всех изученных до сих пор эукариот [63]. Это сильно удлиненный белковый комплекс (около 60 нм) [64], без которого кинетохор практически не связывается с концом микротрубочки.

Отдельные молекулы комплекса Ndc80 не способны процессивно следовать за концами собирающихся и разбирающихся микротрубочек. Однако, они приобретают

такую способность, будучи объединенными в кластеры [65, 66]. Интересно, что в клетках дрожжей именно комплекс Ndc80 выполняет роль своеобразных подвесок для Dam1 комплекса, посредством которых кольцевой каплер закрепляется за хромосому [67]. *In vitro* эксперименты показали, что взаимодействие Dam1 с Ndc80 обеспечивает способность Ndc80 следовать за концами растущих и укорачивающихся микротрубочек, что говорит о том, что эти комплексы эффективно работают в тандеме [68, 69].

Совсем недавнее исследование взаимодействия единичных молекул комплекса Ndc80 с микротрубочкой методом сверхбыстрой силовой спектроскопии обнаружило удивительную способность этого белка двигаться по поверхности микротрубочки с сопротивлением, сильно меняющимся в зависимости от направления движения и приложенной силы [70]. Когда сила направлена так, что пытается сдернуть молекулу с плюс-конца микротрубочки, т.е. оторвать от хромосомы, сопротивление резко возрастает с увеличением силы. Сила связи одной молекулы Ndc80 с микротрубочкой постепенно возрастает с $6-7k_B T$ до $12-13k_B T$. Напомним читателю, что стабилизация скорости в широком диапазоне сил была ранее задокументирована ещё в классических экспериментах в сперматоцитах кузнечика, где скорость хромосом, движущихся с концами деполимеризующихся микротрубочек, начинала падать только при существенных останавливающих нагрузках [32]. Таким образом способность комплекса Ndc80 менять сопротивление в зависимости от приложенной силы является дополнительным весомым аргументом в пользу фибриллярного каплера, но также указывает на более сложное его устройство, чем считалось ранее.

4. Заключение

Исследования последних двух десятилетий показали, что микротрубочки не только используются клеткой как статические структурные элементы цитоскелета. Деполимеризующиеся микротрубочки способны генерировать очень значительные по клеточным меркам силы. Эти силы возникают из-за уникальных механохимических особенностей полимеризации тубулина. Каждая микротрубочка похожа на заряжаемую пружину: связанный с тубулином ГТФ гидролизует, и значительная часть высвобождаемой при этом химической энергии сохраняется в напряженной конформационной деформации в стенке микротрубочки и высвобождается при изгибе тубулина во время его деполимеризации. Линейные нити тубулина, называемые "протофиламентами", изгибаются по мере деполимеризации, что позволяет им работать как моторам. Теория предсказывает, что результирующая сила, развивающаяся в процессе такого механохимического процесса, может быть большой.

Способность белков менять свою конформацию в результате биохимических реакций, видимо, является одной из древнейших особенностей белков. Простейшее изменение — небольшой изгиб молекулы тубулина — приводит к развитию значительных сил в силу линейной конструкции протофиламентов, способных изгибаться. Эти силы Природа в первую очередь использовала для движения хромосом в эукариотических клетках, ибо пока не был изобретён способ механически разносить сестринские копии ДНК в пространстве, не мог возникнуть про-

цесс самовоспроизведения клеток. По сути, без этого существенного этапа процесс размножения клеток невозможен. А без размножения клеток нет жизни и нет эволюции всего живого. В ходе дальнейшей эволюции в природе появились другие, разнообразные и в чем-то более эффективные молекулярные моторы, которые в наших организмах выполняют разнообразные механические задачи. Но процесс расхождения хромосом (митоз) продолжает использовать этот примитивный и, видимо, самый древний движитель. Ни в одном типе клеток или организме Природа не заменила его на более продвинутый. Видимо, все эволюционные попытки изменить этот механизм неизбежно приводили к нарушению процессов деления клеток, а стало быть, — к выбыванию из эволюции.

Открытым и наиболее важным остается вопрос об устройстве каплеров — белковых комплексов на кинетохоре, обеспечивающих сопряжение механических движений протофиламентов в процессе деполимеризации микротрубочек с движением хромосом. Они обеспечивают устойчивое прикрепление хромосомы к деполимеризующемуся концу микротрубочки даже в присутствии больших противодействующих сил и несмотря на стохастичность динамики тубулина. Несколько конструкций каплеров — одна на основе рукава Хилла, другая на основе кольца и третья на основе удлиненных фибрилл — в настоящее время неплохо изучены теоретически, поэтому можно сравнить их характерные особенности, такие как эффективность передачи энергии, стабильность прикрепления и соотношение силы и скорости. Кольцевой каплер особенно хорошо изучен; открытие мультибелкового кольца Dam1 позволило провести глубокий анализ его конструкции и функции. Биомеханические свойства дрожжевого кольца Dam1, такие как его большой диаметр, гибкие линкеры и относительно прочное связывание, по-видимому, тонко настроены, чтобы позволить этому каплеру двигаться под нагрузкой без отсоединения. Однако природа отказалась от этого изящного устройства во всех типах клеток в подавляющем большинстве многоклеточных организмов — по всей видимости, в пользу более эффективного каплера, скорее всего фибриллярного. Активные исследования в этой области продолжаются, и есть основания надеяться, что ближайшее будущее принесет такой же прогресс, который наблюдался в последние годы в понимании механизмов работы кольцевого каплера.

Благодарности. Авторы благодарны профессору Е.Л. Гришук и профессору Дж.Р. МакИнтошу за многочисленные полезные дискуссии. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 25-74-20038, <https://rscf.ru/project/25-74-20038/>.

Список литературы

- Бломенфельд Л А *Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики* (М.: URSS, 2002)
- Reck-Peterson S L et al. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **19** 382 (2018)
- Yildiz A *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **26** 86 (2025)
- Titus M A *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10** (3) a021972 (2018) DOI:10.1101/cshperspect.a021972
- Clapier C R et al. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **18** 407 (2017)
- Bourgeois C F, Mortreux F, Auboeuf D *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **17** 426 (2016)
- Murrell M et al. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **16** 486 (2015)
- Sweeney H L, Holzbaur E L F *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10** (5) a021931 (2018) DOI:10.1101/cshperspect.a021931
- Романовский Ю М, Тихонов А Н *УФН* **180** 931 (2010); Romanovsky Yu M, Tikhonov A N *Phys. Usp.* **53** 893 (2010)
- Захаров П Н и др. *УФН* **186** 853 (2016); Zakharov P N et al. *Phys. Usp.* **59** 773 (2016)
- Alberts B et al. *Molecular Biology of the Cell* 7th ed., Intern. Student Ed. (New York: W.W. Norton and Co., 2022)
- Gudimchuk N B, McIntosh J R *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **22** 777 (2021)
- Gard D L, Kirschner M W J. *Cell Biol.* **105** 2203 (1987)
- Traut T W *Mol. Cell. Biochem.* **140** (1) 1 (1994)
- Romani A, Scarpa A *Arch. Biochem. Biophys.* **298** (1) 1 (1992)
- Desai A, Mitchison T J *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** (1) 83 (1997)
- Gudimchuk N B, Alexandrova V V *Biophys. Rev.* **15** 1095 (2023)
- Nogales E et al. *Nature Struct. Biol.* **5** 451 (1998)
- Beckett D, Voth G A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **120** e2305899120 (2023) DOI:10.1073/pnas.2305899120
- Carlier M F, Pantaloni D *Biochemistry* **20** 1918 (1981)
- Maccioni R, Seeds N W *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** 462 (1977) DOI:10.1073/pnas.74.2.462
- Mitchison T, Kirschner M *Nature* **312** 237 (1984)
- Nogales E *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30** 397 (2001)
- Mandelkow E M, Mandelkow E, Milligan R A J. *Cell Biol.* **114** 977 (1991)
- Duellberg C et al. *eLife* **5** e13470 (2016)
- Hyman A A et al. *Mol. Biol. Cell.* **3** 1155 (1992)
- Bowne-Anderson H et al. *BioEssays* **35** 452 (2013)
- Gardner M K et al. *Cell* **147** 1092 (2011)
- Coomes C E et al. *Curr. Biol.* **23** 1342 (2013)
- Alexandrova V V et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **119** e2208294119 (2022) DOI:10.1073/pnas.2208294119
- Farmer V J, Zanin M *BioEssays* **45** 2200081 (2023)
- Nicklas R B J. *Cell. Biol.* **97** 542 (1983)
- Grishchuk E L et al. *Nature* **438** 384 (2005)
- Grishchuk E L, Ataullakhanov F I *Meth. Cell. Biol.* **95** 657 (2010)
- Molodtsov M I et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 4353 (2005)
- Grishchuk E L et al., in *Comprehensive Biophysics* Vol. 4 (Ed. E Egelman) (New York: Elsevier, 2012) pp. 93–117, DOI:10.1016/B978-0-12-374920-8.00409-4
- Grishchuk E L et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 15423 (2008)
- O'Brien E T et al. *Biochemistry* **29** 6648 (1990)
- Rieder C L, Salmon E D *Trends Cell Biol.* **8** (8) 310 (1998)
- Hill T L *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** 4404 (1985)
- Wollman R et al. *Curr. Biol.* **15** 828 (2005)
- Joglekar A P, Hunt A J *Biophys. J.* **83** (1) 42 (2002)
- Höög J L et al. *J. Cell Sci.* **124** 693 (2011) DOI:10.1242/jcs.072967
- McIntosh J R et al. *J. Cell Biol.* **217** 2691 (2018)
- Gudimchuk N B et al. *Nature Commun.* **11** 3765 (2020) DOI:10.1038/s41467-020-17553-2
- Iyer S S et al. *J. Cell Biol.* **224** e202406061 (2025)
- Westermann S et al. *Mol. Cell* **17** (2) 277 (2005)
- Miranda J L et al. *Nature Struct. Mol. Biol.* **12** (2) 138 (2005)
- Koshland D E, Mitchison T J, Kirschner M W *Nature* **331** 499 (1988)
- Kirschner M W, Honig L S, Williams R C J. *Mol. Biol.* **99** 263 (1975) DOI:10.1016/S0022-2836(75)80144-6
- Miranda J L, King D S, Harrison S C *Mol. Cell Biol.* **18** 2503 (2007)
- Efremov A et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** 19017 (2007)
- Wang H-W et al. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14** 721 (2007)
- Gestaut D R et al. *Nature Cell Biol.* **10** 407 (2008)
- Grishchuk E L et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 6918 (2008)
- Westermann S et al. *Nature* **440** 565 (2006)
- McIntosh J R et al. *J. Cell Biol.* **200** 459 (2013)
- McIntosh J R et al. *Cell* **135** (2) 322 (2008)
- Volkov V A et al. *J. Cell Biol.* **209** 813 (2015)
- Putkey F R et al. *Developmental Cell* **3** 351 (2002)
- Gudimchuk N et al. *Nature Cell Biol.* **15** 1079 (2013)
- Ustinov N B, Korshunova A V, Gudimchuk N B *Biochemistry Moscow* **85** 448 (2020) DOI:10.1134/S0006297920040057
- Wei R R, Sorger P K, Harrison S C *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 5363 (2005)
- Welburn J P I, Cheeseman I M *Developmental Cell* **15** 645 (2008)
- Powers A F et al. *Cell* **136** 865 (2009) DOI:10.1016/j.cell.2008.12.045
- Volkov V A et al. *eLife* **7** e36764 (2018) DOI:10.7554/eLife.36764

67. Jenni S, Harrison S C *Science* **360** 552 (2018)
 68. Tien J F et al. *J. Cell Biol.* **189** 713 (2010)
 69. Lampert F, Hornung P, Westermann S J. *Cell Biol.* **189** 641 (2010)
 70. Demidov V M et al. *Sci. Adv.* **11** eadx0005 (2025)

Microtubules are the simplest biomechanical engine that drives chromosome separation during cell division

I.V. Gonchar^(1,a), G.S. Timoshin^(1,b), N.B. Gudimchuk^(1,2,c), **F.I. Ataulakhanov**^(1,3,d)

⁽¹⁾ Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology RAS,
 ul. Srednyaya Kalitnikovskaya 30, 109029 Moscow, Russian Federation

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

⁽³⁾ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
 Institutskii per. 9, 141701 Dolgoprudny, Moscow region, Russian Federation

E-mail: ^(a) gonchar94@gmail.com, ^(b) timoshin.gs19@physics.msu.ru,

^(c) ngudimch@gmail.com, ^(d) ataulakhanov.fazly@gmail.com

Humanity has invented many devices capable of performing diverse movements and mechanical work. All of these devices are macroscopic objects. Remarkably, however, every mechanical engine found in living nature is of molecular scale, no larger than 100 nm. Even to move an elephant or a whale, the Nature assembles complexes made of billions of such molecular motors instead of constructing a single large engine. We do not yet fully understand the advantages of this strategy, but one aspect is clear. Molecular motors utilize chemical energy to perform mechanical work, but they do not rely on elevated temperatures or pressures. Remarkably, the efficiency of these engines often greatly exceeds that of an internal combustion engine. Therefore, it is of great interest to understand how molecular motors function and how they have evolved. Among the most primitive molecular devices capable of moving molecular cargo are microtubules. Microtubules are ubiquitous cytoskeletal polymers that are critical for maintaining the cell's shape and structure, its viability, and its proper functioning. Besides their structural roles, microtubules enable the separation of chromosomes during cell division — a key process for all life. Microtubule dynamics involve a biochemical stage in which the high-energy molecule GTP is hydrolyzed, and the released energy becomes stored in the strained conformation of the microtubule. Only recently has it become fully clear that this stored conformational energy can be harnessed by the cell to perform the work of separating and transporting sister chromosomes to the opposite cellular poles during cell division. This appears to be some of the most ancient molecular mechanochemical engines operating within the cell.

Keywords: microtubule, force generation, mechanochemical engine, optical trap, cell division

PACS numbers: 87.16.Ka, 87.16.Wd, 87.17.Ee

Bibliography — 70 references

Received 3 November 2025

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **196** (8) 829–841 (2026)

Physics – Uspekhi **69** (8) (2026)

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNr.2025.12.040069>

DOI: <https://doi.org/10.3367/UFNe.2025.12.040069>