

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Гудимчук Никита Борисович

**ДИНАМИКА МИКРОТРУБОЧЕК И МЕХАНИЗМЫ
ТРАНСПОРТА ХРОМОСОМ ПРИ ДЕЛЕНИИ КЛЕТОК**

Специальность 1.5.2. «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Москва 2022

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный консультант: **Атауллаханов Фазоил Иноятович,** доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Аветисов Владик Аванесович,** доктор физико-математических наук, главный научный сотрудник, отдел строения вещества, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова** Российской академии наук

Надеждина Елена Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, отдел клеточной биологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт белка** Российской академии наук

Шайтан Алексей Константинович, доктор физико-математических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова**», биологический факультет, кафедра биоинженерии

Защита диссертации состоится «09» июня 2022 г. в 15.30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.011.1(МГУ.01.04) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, аудитория 5-68.

E-mail: info@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский пр-т, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/443804158/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.011.1(МГУ.01.04),
кандидат технических наук

А.Э. Сидорова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Диссертация посвящена разработке многомасштабной модели тубулиновых микротрубочек и определению механизмов их работы в качестве молекулярных машин, осуществляющих транспорт хромосом во время клеточного деления. Исследование включает анализ структуры микротрубочек, экспериментальное определение параметров их динамики, взаимодействия с ключевыми кинетохорными белками, а также теоретическое описание этих процессов посредством компьютерного моделирования.

Актуальность темы исследования

Тубулиновые микротрубочки - один из трех основных компонентов клеточного скелета. Они присутствуют во всех эукариотических организмах и выполняют разнообразные функции, от транспорта везикул и позиционирования органелл до участия в миграции всей клетки. Микротрубочки динамически нестабильны: они осуществляют циклы сборки и разборки при наличии источника свободной энергии в форме высокой концентрации димеров тубулина в комплексе с молекулами гуанозинтрифосфата (ГТФ) в растворе. Силы, генерируемые микротрубочками в клетках, управляют рядом жизненно важных процессов, включая перемещение хромосом во время клеточного деления. При этом концы микротрубочек прикрепляются к хромосомам при помощи крупного специализированного комплекса белков – кинетохора. Многие фундаментальные механизмы, лежащие в основе динамической нестабильности микротрубочек и их работы в качестве молекулярных машин для совершения механической работы по перемещению хромосом, а также принципы устройства кинетохора как сопрягающего устройства для передачи сил от микротрубочек к хромосомам до сих пор неизвестны.

Научная новизна

В работе впервые разработана многомасштабная теория работы микротрубочек от атомарного до клеточного уровня. Впервые выполнены прямые измерения максимальных сил, развиваемых разбирающейся микротрубочкой *in vitro* в присутствии кольцевого кинетохорного комплекса Dam1; обнаружены изогнутые протофиламенты на концах микротрубочек при сборке в широком диапазоне условий; открыта роль неструктурированных доменов тубулинов в регуляции скорости сборки микротрубочек; проведены оригинальные по постановке эксперименты для исследования перехода микротрубочек от разборки к сборке; открыта и исследована способность кинезина CENP-E следовать за динамическими концами микротрубочек.

Степень разработанности выбранной темы

Начало исследованиям динамической нестабильности микротрубочек и ее роли в митозе было положено в 1984 году работой Митчисона и Киршнера [1]. Несмотря на значительный прогресс в этой области исследований, на момент начала выполнения диссертационной работы множество важных фундаментальных механизмов оставались неизвестны. В частности, не были определены взаимосвязи между структурой субъединиц микротрубочек – $\alpha\beta$ -гетеродимеров белка тубулина и динамическими свойствами целой микротрубочки. Не были установлены детали механохимического цикла тубулина, механизмы и величины генерируемых микротрубочками сил, механизмы взаимодействия кинетохорных белков и динамических концов микротрубочек.

Целью исследования являлось создание многомасштабной модели тубулиновых микротрубочек и определение механизмов их работы в качестве молекулярных машин, транспортирующих хромосомы во время клеточного деления.

Задачи работы

1) На основе метода броуновской динамики и динамического метода Монте-Карло разработать модель граничной зоны (концов) микротрубочки,

описывающую её сборку и разборку, а также её переключение между этими динамическими фазами.

2) Провести полноатомные молекулярно-динамические расчеты конформационной динамики олигомеров тубулина и сопоставить их с данными криоэлектронной томографии. Предложить модели сопряжения гидролиза ГТФ и структурных перестроек тубулинов.

3) Исследовать роль неструктурированных С-концов тубулина как модуляторов динамической нестабильности микротрубочек.

4) Экспериментально проверить основные постулаты и предсказания многомасштабной модели, касающиеся структуры и механических характеристик протофиламентов на концах микротрубочек в клетках различных организмов, а также в очищенной системе *in vitro*.

5) Экспериментально измерить максимальные силы, развиваемые микротрубочками, и определить теоретически механизм генерации силы.

6) Экспериментально установить вклад кинезина CENP-E в прикрепление концов микротрубочек к хромосомам. Количественно охарактеризовать движение отдельных молекул кинезина CENP-E вдоль микротрубочки под воздействием механической нагрузки. Определить роль каждого из доменов кинезина CENP-E при транспорте грузов вдоль микротрубочки и следовании за динамическими концами микротрубочки и механизм их совместной работы.

7) Обобщить полученные данные в виде многомасштабной функциональной модели и на ее основе выдвинуть гипотезы относительно механизмов регуляции работы микротрубочек при различных внутриклеточных процессах, включая взаимодействие микротрубочек и хромосом в митозе.

Объект и предмет исследования

Основным объектом исследования являлись микротрубочки и кинетохорные белки комплекса Dam1 и кинезина CENP-E. Предметом исследования были механизмы динамического поведения микротрубочек и генерации микротрубочками сил для перемещения хромосом.

Теоретическая значимость

В результате работы построена многомасштабная модель микротрубочек на пространственных масштабах от нанометров до десятков микрометров и на временных масштабах от микросекунд до часов. Предложен и обоснован новый механизм сборки тубулиновых микротрубочек, а также новый механизм переключения микротрубочек от сборки к разборке. Теоретически описан процесс генерации силы микротрубочкой при сборке и разборке. Определены основные параметры тубулинов, влияющие на величину максимальных сил, которые микротрубочки могут развивать. Полученные теоретические результаты вносят вклад в понимание фундаментальных принципов работы микротрубочек и зависящих от этих филаментов процессов, в частности процесса деления клеток.

Практическая значимость

Полученные в работе данные могут помочь установить молекулярные основы патологических изменений в работе клеток при нарушениях динамики микротрубочек. Построенные теоретические модели позволяют уточнить механизмы действия существующих препаратов химиотерапии, направленных на ингибирование процессов сборки и разборки микротрубочек, и указывают на возможности разработки принципиально новых препаратов, нацеленных на блокирование эффективного взаимодействия кинетохорных белков и микротрубочек при делении клеток.

Методология и методы диссертационного исследования

В работе используется ряд методов компьютерного моделирования: молекулярная динамика, метод нормальных мод, броуновская динамика, динамический метод Монте-Карло. Эксперименты проводятся с использованием методов геной инженерии, биохимии, криоэлектронной микроскопии, оптической микроскопии, лазерного пинцета.

Положения, выносимые на защиту

1) С помощью метода броуновской динамики и динамического метода Монте-Карло построена детальная модель конца микротрубочек, на основе

которой предложены механизмы полимеризации тубулинов и переключения микротрубочек между фазами сборки и разборки.

2) Теоретически продемонстрировано, что димеры и продольно связанные олигомеры тубулина имеют изогнутую конформацию независимо от связанного с ними нуклеотида. Гидролиз ГТФ повышает изгибную жесткость интерфейса между димерами тубулина

3) Теоретически предсказано, что гибкие неструктурированные С-концевые цепочки α -тубулинов взаимодействуют с продольными полимеризационными интерфейсами димеров тубулина и могут модулировать динамику сборки микротрубочки

4) Обнаружено, что изогнутые протофиламенты являются общей структурной особенностью микротрубочек при их разборке и сборке в различных организмах от дрожжей до животных, а также в широком диапазоне экспериментальных условий в очищенных системах *in vitro*.

5) Показано, что микротрубочки, работая как молекулярные машины с КПД около 37% при разборке и около 15% при сборке, способны в процессе деполимеризации развивать силы порядка 30 пН в присутствии кольцевого сопрягающего устройства. Необходимым условием для эффективного развития силы при деполимеризации микротрубочек является наличие существенного активационного барьера латеральных связей между тубулиновыми протофиламентами.

6) Экспериментально обнаружено, что кинетохорный кинезин CENP-E – моторный белок, который развивает силы до 6 пН и способствуют закреплению хромосом и других микрогрузов за концы полимеризующихся и деполимеризующихся микротрубочек. Показано, что механизм данной активности кинезина CENP-E основан на совместной работе его моторного домена, компактно сложенного гибкого «стебля» и дополнительного сайта связывания с микротрубочкой на неструктурированном С-конце.

7) Полученные данные обобщены в виде многомасштабной функциональной модели, на основе которой сформулированы гипотезы относительно механизмов регуляции работы микротрубочек

ассоциированными белками, механизмов воздействия на динамику микротрубочек ряда низкомолекулярных ингибиторов, а также механизмов динамического закрепления хромосом за концы микротрубочек во время митоза.

Степень достоверности результатов

Результаты теоретических расчетов верифицированы сопоставлением предсказаний моделирования с опубликованными и полученными в данной работе экспериментальными данными. Достоверность экспериментальных данных подтверждена методами статистической обработки. Результаты представленных исследований опубликованы в рецензируемых журналах и доложены на крупных международных конференциях.

Личный вклад автора

Представленные в диссертации результаты теоретических исследований выполнены лично автором. Разработанные автором многомасштабные модели динамики микротрубочек и взаимодействия микротрубочек и кинетохорных белков полностью оригинальны. Экспериментальные исследования свойств кинетохорного кинезина CENP-E, характеристик его движения вдоль микротрубочек под механической нагрузкой и его взаимодействия с концами динамических микротрубочек, а также исследования свойств отдельных доменов этого белка выполнены лично автором. Белковые конструкции для работы были получены Б.Витре и Ю.Ким в лаборатории Д.Кливленда (Университет Сан Диего, США) и предоставлены автору диссертационной работы в рамках совместного проекта для проведения исследований *in vitro*. Эксперименты, на которых основаны выводы работы, выполнены лично автором или под его руководством. Эксперименты по измерению силы, развиваемой микротрубочкой выполнены В.А.Волковым и Е.Л.Грищук (Университет Пенсильвании) при участии автора диссертационной работы, который внес вклад в планирование и анализ проведенных экспериментов. Личный вклад автора в работы №№ 1, 5, 9, 11, 15, 16 (статьи с «первым авторством» или «совместным первым авторством») состоял в проведении экспериментов,

расчетов и написании текста статьи. Личный вклад автора в работы №№ 1, 3-7, 12, 20, 21, 23 (автор или соавтор - корреспондент) состоял в постановке задачи, разработке экспериментальной методики и схемы компьютерной модели, частичном проведении расчетов, анализе данных, написании и подготовке статьи к публикации. Личный вклад автора в работы №№ 8, 10, 13, 14, 24 состоял в разработке в частичной постановке задачи, анализе данных и написании статьи. Личный вклад автора в работы №№ 2, 17-19, 22 состоял в участии в проведении расчетов, экспериментов и анализе данных.

Публикации

Всего опубликовано 24 статьи. По теме диссертации опубликовано всего 24 статьи, из них 18 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI и 6 статей, рецензируемых в базе данных РИНЦ.

Апробация работы

Основные результаты диссертации были представлены и обсуждены на 25 всероссийских и международных конференциях.

Структура работы

Диссертация представлена на 207 страницах и состоит из введения, четырех глав, посвященных обзору литературы, описанию материалов и методов исследования, а также изложению результатов и их обсуждению; заключения; выводов, списка литературы, содержащего 353 наименования. Работа проиллюстрирована 78 рисунками и содержит 11 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, кратко охарактеризованы методы исследования, приводятся основные положения, выдвигаемые на защиту, дана оценка достоверности полученных результатов и личного вклада автора в их получение.

Глава 1. Обзор литературы.

Первая глава начинается с части **1.1. «Устройство клеточного скелета»** - обзора существующей литературы, посвященного современным представлениям об организации и функциях цитоскелета.

В части **1.2. «Физиологическая значимость динамической нестабильности микротрубочек»** подробно описываются микротрубочки – тип цитоскелетных филаментов, исследованию которого в основном посвящена данная диссертационная работа.

В части **1.3. «Развитие представлений о механизмах динамики микротрубочек»** приводится справка об истории развития представлений о структуре, свойствах микротрубочек, механизмах их полимеризации и динамической нестабильности. Обсуждаются наиболее важные экспериментальные данные, позволившие построить современную теорию динамической нестабильности микротрубочек [Gudimchuk and McIntosh, 2021].

В части **1.4. «Регуляция динамики микротрубочек»** описаны эффекты наиболее хорошо изученных белков и низкомолекулярных ингибиторов на динамику микротрубочек.

В части **1.5. «Моторные белки»** приводятся литературные сведения о принципах работы АТФ-зависимых ферментов, способных совершать работу по перемещению грузов вдоль микротрубочек. Кратко описываются особенности строения и функций кинезинов и динеинов.

В части **1.6. «Компьютерные модели динамики микротрубочек»** описывается развитие теоретических представлений о динамике микротрубочек от простейших одномерных моделей к двумерным стохастическим моделям и сложным трехмерным моделям на основе методов броуновской и молекулярной динамики. Критически обсуждаются сильные и слабые стороны различные вычислительных подходов и моделей, степень их разработанности, их соответствие накопленным в литературе экспериментальным данным. Делается вывод о том, что несмотря на значительный прогресс в некоторых отдельных направлениях, существующие модели пока не способны непротиворечиво описать

экспериментальные данные о биохимии, структуре, динамике и механике микротрубочек.

Далее в части **1.7. «Митотическое деление клеток»** описывается одна из наиболее фундаментальных стадий жизненного цикла клетки – процесс митотического деления, в ходе которого микротрубочки и другие белки образуют специализированный аппарат для распределения генетического материала материнской клетки между образующимися дочерними клетками. Дается подробный литературный обзор об общем строении кинетохоров – белковых комплексов, служащих для прикрепления хромосом к концам микротрубочек в эукариотических клетках: от дрожжей до животных. Описывается структура, свойства и функции отдельных кинетохорных белков и комплексов, таких как Dam1 комплекс, Ska комплекс, NDC80 комплекс, моторные белки кинетохора: динеин и кинезин-7 (CENP-E), и другие. Указывается на пробелы в понимании архитектуры и механики прикрепления хромосом к микротрубочкам, особенно высших организмах, включая животных.

Глава 2 «Многомасштабное моделирование динамической нестабильности микротрубочек» начинается с части **2.1 «Концепция многомасштабного моделирования»**, в которой объясняется использованный в работе подход для теоретического описания микротрубочек и их частей на пространственных масштабах от нанометров до десятков микрометров и временных масштабах от наносекунд до сотен минут (Рис. 1).

Для расшифровки механизмов динамической нестабильности микротрубочек критически важно понимать особенности механо-химического цикла ее базовых элементов – димеров и олигомеров тубулина. Поэтому в качестве наиболее детального слоя мультимасштабной модели был выбран метод полноатомной молекулярной динамики с явно заданным растворителем. Этот подход позволяет использовать структурные данные высокого разрешения о строении тубулиновых решеток в комплексе с аналогами ГТФ и ГДФ для расчета важных динамических характеристик

тубулинов, таких как равновесные конформации и жесткости интерфейсов между тубулинами внутри протофиламента в зависимости от связанного с ними нуклеотида. Важной особенностью моделирования методом полноатомной молекулярной динамики является полный учет всех степеней свободы тубулинов, в том числе радиальных и тангенциальных движений по отношению к оси микротрубочки. Для выделения наиболее значимых степеней свободы были использованы методы главных компонент. Ограничение метода – сравнительно небольшое время (~ 1 микросекунды) и размер объектов (несколько десятков нанометров), которые доступны для моделирования, что не исключает возможность описания сборки и разборки целой микротрубочки, хотя и дает важную информацию о свойствах элементов микротрубочки.

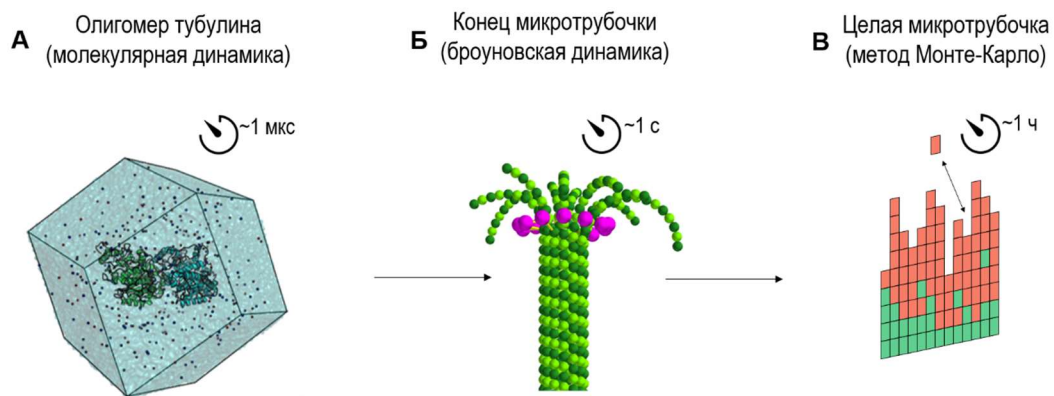


Рис. 1. Иллюстрация многомасштабного подхода к описанию динамики микротрубочек и генерируемых ими сил. А. Молекулярная динамика (слой 1). Моделируется структура и конформация тубулинов на уровне отдельных атомов. Б. Броуновская динамика (слой 2). Каждый тубулин моделируется как сферическая частица. Показана микротрубочка (зеленые частицы) и Dam1 кольцо, также представленное как совокупность сферических частиц (показаны сиреневым цветом). В. Метод Монте-Карло (слой 3). Каждый тубулин моделируется как одно из состояний ячейки двумерной матрицы.

Менее детальный слой многомасштабной модели, реализуемый с использованием метода броуновской динамики, позволяет рассмотреть взаимодействие тубулинов с учетом их молекулярных характеристик, таких как жесткости протофиламентов и параметры потенциалов межмолекулярного взаимодействия с целью определить, как эти взаимодействия обеспечивают режимы сборки и разборки микротрубочек, которые могут быть сопоставлены с данными электронной, оптической

микроскопии и наблюдений генерации сил микротрубочками с помощью оптических ловушек на временах порядка нескольких секунд и масштабов порядка сотен нанометров. И наконец, последний, наименее подробный слой модели, реализуемый динамическим методом Монте-Карло, призван описать редкие стохастические переходы микротрубочек между фазами сборки и разборки, происходящие на масштабе десятков минут и масштабах десятков микрометров.

Наиболее детальный уровень многомасштабного моделирования описан в части 2.2. «**Полноатомная молекулярная модель конформационной подвижности олигомеров тубулина**». Используя данные криоэлектронной микроскопии, строились полноатомные молекулярные модели димеров, тетрамеров, гексамеров и октодекамеров тубулинов в комплексе с ГТФ и ГДФ. В общей сложности было создано 8 молекулярно-динамических систем [Fedorov et al., 2018], [Fedorov et al., 2019].

Подготовка расчетов проводилась следующему алгоритму. Неразрешенные подвижные аминокислотные цепи были достроены с использованием программы Modeller. Затем на основании значений pKa аспарагиновой и глутаминовой кислот, рассчитанных в программе Propka с учетом их локального окружения, с использованием программы pdb2gmx пакета Gromacs 5 определялись степени протонирования данных аминокислотных остатков. После этого программой Dowser были добавлены молекулы воды в доступные растворителю внутренние полости белка. Далее с использованием Gromacs 5 вокруг белка создавался виртуальный реакционный объем таким образом, что расстояние от молекулы белка до ближайшей его границы было не менее 2 нм, и в этот виртуальный реакционный объем добавлялся растворитель (вода) и ионы K^+ и Cl^- для создания ионной силы 100 мМ и нейтрализации суммарного отрицательного заряда системы. Для ускорения расчетов использовался временной шаг 4 фс с применением частичного переноса масс по Берендсену. Продуктивные расчеты были выполнены в ансамбле NPT при

температуре 300К с использованием алгоритма Парринелло-Рамана и термостата V-rescale.

Сравнения структур тубулина в комплексе с ГТФ (PDB: 3j6e) и ГДФ (PDB: 3j6f) проливают свет на механизм динамической нестабильности микротрубочки. Путем описания взаимного расположения мономеров тубулина на каждом интерфейсе олигомера с помощью трех углов поворота было показано, что конформации внутри- и междимерных интерфейсов мало зависят от связанного с ними нуклеотида. При этом углы согласуются с углами в кристаллографических моделях тубулинов.

С целью определить влияние нуклеотида на гибкость внутри- и междимерных интерфейсов тубулина, их жесткости были оценены двумя методами. Во-первых, жесткость была определена из теоремы равномерного распределения энергии по степеням свободы:

$$\kappa = (k_B T) / \sigma^2, \quad (1)$$

где k_B – постоянная Больцмана, T – температура, σ^2 – дисперсия угла поворота, характеризующего конформацию интерфейса между тубулинами. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Гармоническая жесткость конформационных углов тубулина, $k_B T / \text{рад}^2$.

Код PDB	Нуклеотид	Интерфейс	Изгибная жесткость	Крутильная жесткость
3J6F	ГДФ	внутридимерный	930 ± 120	990 ± 150
3J6E	ГТФ	внутридимерный	1100 ± 120	1160 ± 100
3J6F	ГДФ	междимерный	1290 ± 510	760 ± 60
3J6E	ГТФ	междимерный	350 ± 110	410 ± 70

Полученные оценки характеризуют относительные жесткости интерфейсов между тубулинами в зависимости от связанного с ними нуклеотида. Эти соотношения гибкостей меж-тубулиновых интерфейсов были дополнительно подтверждены с помощью метода нормальных мод.

Совокупно полученные данные свидетельствуют о том, что хотя нуклеотид существенно не влияет на конформацию межтубулиновых интерфейсов, гидролиз ГТФ в кармане тубулина приводит к увеличению жесткости интерфейса между димерами тубулина. Это повышает энергию деформации тубулиновых протофиламентов в теле микротрубочки, дестабилизируя их решетку, а значит, может лежать в основе механизма динамической нестабильности микротрубочек.

В части 2.3. «Исследование роли неструктурированных заряженных С-концов тубулина при сборке микротрубочек» излагается ранее неизвестный механизм влияния гибких цепей тубулина на процесс полимеризации микротрубочек. Проведенные молекулярно-динамические расчеты указывают на то, что С-конец α -тубулина способен специфично связываться торцевой поверхностью глобулы α -тубулина, наиболее вероятно взаимодействуя с положительно заряженными аминокислотными остатками K352, K336 [Chen et al., 2021]. При этом поверхность междимерного интерфейса, доступная растворителю, уменьшается на величину до 33%. Данный результат говорит о возможности прямого ингибирования сборки микротрубочек неструктурированными С-концами тубулинов (Рис. 2). Предсказания моделирования подтверждаются экспериментальными данными лаборатории А. Ролл-Мекак (NIH, США).

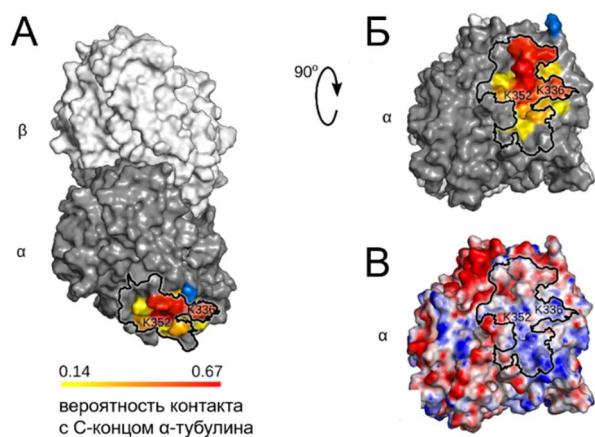


Рис. 2. Результаты молекулярно-динамических расчетов взаимодействия неструктурированного С-конца тубулина с поверхностью глобулярных доменов тубулина А) Вид сбоку, вероятность контакта отображена цветом. Черная линия обводит полимеризационный интерфейс тубулина. Синим обозначена аминокислота S439, соединяющая глобулу с неструктурированным С-концом тубулина. Подписаны

важные для взаимодействия положительно-заряженные аминокислоты. Б) То же, вид с торца α -тубулина. В) Электростатический потенциал на поверхности тубулина. Красные и синие цвета соответствуют отрицательным и положительным значениям потенциала. Рисунок из статьи [Chen et al., 2021].

Часть 2.4. «Моделирование сборки и разборки микротрубочек методом броуновской динамики» посвящена описанию модели микротрубочки на пространственном масштабе порядка нанометров и на временном масштабе порядка нескольких секунд.

Вкратце, в данной модели тубулины были представлены в виде сферических частиц, на поверхности которых локализованы точечные центры продольных и латеральных взаимодействий [Zakharov et al., 2015], [McIntosh et al., 2018], [Gudimchuk et al., 2020]. Эти центры были расположены таким образом, что взаимодействующие мономеры тубулинов образовывали левозакрученную трехзаходную спираль из тринадцати протофиламентов (Рис. 3А).

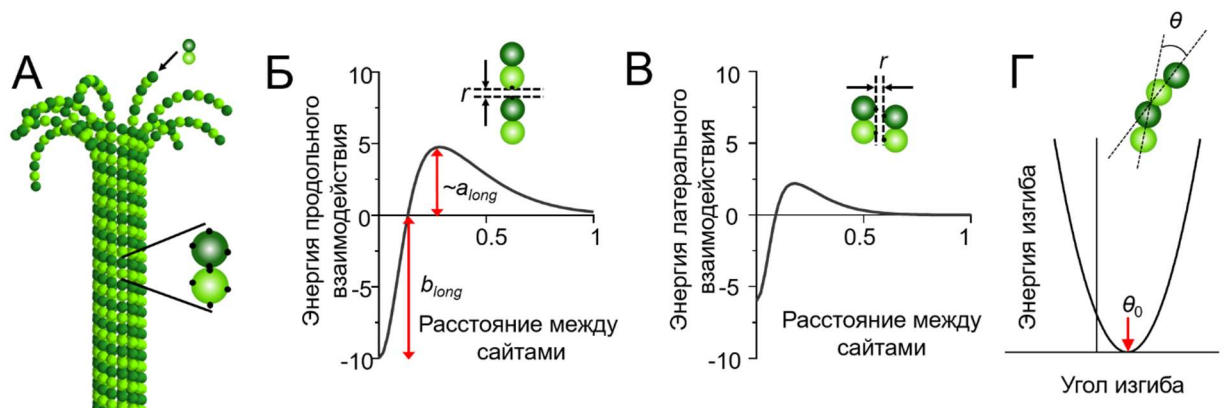


Рис. 3. Модели микротрубочки на основе метода броуновской динамики. А. Схема модели. α -тубулины показаны в виде светлых, а β -тубулины в виде темных сфер. Б, В. Потенциалы продольных и латеральных взаимодействий между тубулинами. Г. Энергия изгиба димера как функция угла между соседними мономерами тубулина. Рисунок из статьи [Gudimchuk et al., 2020].

Алгоритм моделирования включал два вычислительных слоя: 1) медленный кинетический слой, в котором использовался метод Монте-Карло для реализации редких случайных событий присоединения димеров тубулина к концам протофиламентов и случайных событий гидролиза ГТФ в теле микротрубочки; и 2) быстрый динамический слой, реализующий броуновскую динамику мономеров тубулина внутри решетки микротрубочки.

События медленного слоя были реализованы с временным шагом порядка миллисекунд. Вероятность добавления нового димера тубулина была одинаковой для концов всех протофиламентов и зависела только от концентрации растворимого тубулина, c_{tub} и константы скорости ассоциации тубулина k_{on} :

$$P = k_{on} c_{tub} t_{kin} \quad (2)$$

Случайный гидролиз ГТФ мог происходить с одинаковой константой скорости k_{hydr} в любом из ГТФ-тубулинов, приводя к изменению прочности бокового связывания (b_{lat}) или жесткости протофиламента на изгиб (B).

В быстром слое производились расчеты динамики мономеров тубулина внутри микротрубочки с шагом 100 пс. Важное упрощающее допущение и ограничение модели на данном уровне многомасштабной модели состояло в том, что мономеры тубулинов микротрубочки могли двигаться только в радиальных плоскостях, которые проходят через ось микротрубочки. Таким образом, положение каждого мономера описывалось всего двумя координатами центра (x, y), а также углом его ориентации в радиальной плоскости (θ). Тем самым в модели были запрещены тангенциальные смещения мономеров из радиальных плоскостей протофиламентов и вращения мономеров протофиламента вокруг своей оси. Это ограничение было обосновано тем, что согласно данным криоэлектронной томографии отдельные протофиламенты на концах микротрубочек существенно не смещаются из своих радиальных плоскостей [McIntosh et al., 2018]. Это позволило значительно упростить расчеты.

Продольные связи между субъединицами тубулина в димере моделировали как растяжимые Гуковские пружины жесткости k :

$$U(r) = \frac{k}{2} r^2 \quad (3)$$

Здесь U - энергия растяжения пружин, r - расстояние между сайтами взаимодействия мономеров тубулина внутри одного димера.

Продольные и боковые связи между димерами были разрывными и описывались энергетическим потенциалом с активационным барьером (Рис. 3 Б,В):

$$E_{long}(r) = 2a_{long} \left(\frac{r}{r_{long}} \right)^2 \exp \left(-\frac{r}{r_{long}} \right) - b_{long} \exp \left(-\frac{r^2}{r_{long}^2} \right), \quad (4)$$

$$E_{lat}(r) = 2a_{lat} \left(\frac{r}{r_{lat}} \right)^2 \exp \left(-\frac{r}{r_{lat}} \right) - b_{lat} \exp \left(-\frac{r^2}{r_{lat}^2} \right). \quad (5)$$

Здесь $E_{long}(r)$ - энергия междимерного продольного взаимодействия, $E_{lat}(r)$ - энергия бокового взаимодействия, r - расстояние между парой точек взаимодействия, r_{long} и r_{lat} - параметры, определяющие ширину связей и крутизна энергии активации, вдоль и a_{lat} - параметры, характеризующие высоту активационных барьеров, b_{long} и b_{lat} - глубины потенциальных ям для продольных и боковых связей, соответственно.

Ориентация соседних мономеров тубулина относительно друг друга в пределах протофиламента описывалась квадратичным энергетическим потенциалом (Рис. 3Г):

$$W(\theta) = \frac{B}{2} (\theta - \theta_0)^2. \quad (6)$$

Здесь B – изгибная жесткость протофиламента, θ_0 – равновесный угол изгиба, равный в модели 0.2 рад и для ГТФ, и для ГДФ тубулинов.

Таким образом, полная энергия всех субъединиц в микротрубочке составляла

$$U_{total} = \sum_{n=1}^{13} \sum_{k=1}^{K_n} (E_{lat}^{k,n} + E_{long}^{k,n} + U^{k,n} + W^{k,n}), \quad (7)$$

где n - номер протофиламента, k - количество мономера в n -м протофиламента, K_n - общее количество субъединиц тубулина в n -м протофиламента.

Координаты всех мономеров системы на i -м вычислительном цикле были получены путем решения уравнений движения Ланжевена:

$$x_i = x_{i-1} - \frac{dt}{6\pi R\eta} \cdot \frac{\partial U_{total}}{\partial x} + \sqrt{2k_B T \frac{dt}{6\pi R\eta}} \cdot N(0,1), \quad (8)$$

$$y_i = y_{i-1} - \frac{dt}{6\pi R\eta} \cdot \frac{\partial U_{total}}{\partial y} + \sqrt{2k_B T \frac{dt}{6\pi R\eta}} \cdot N(0,1), \quad (9)$$

$$\theta_i = \theta_{i-1} - \frac{dt}{8\pi R^3\eta} \cdot \frac{\partial U_{total}}{\partial \theta} + \sqrt{2k_B T \frac{dt}{8\pi R^3\eta}} \cdot N(0,1), \quad (10)$$

где (x,y) - положения центра каждой субъединицы тубулина, θ - угол поворота субъединицы тубулина, dt - временной шаг вычисления; U_{total} дается формулой (10); k_B - постоянная Больцмана; T - температура; $N(0,1)$ - случайное число из нормального распределения; R – радиус тубулина, η – вязкость среды. Любой олигомер тубулина, который отделился от своего протофиламента из-за броуновской флуктуации на расстояние, при котором его энергия продольного взаимодействия с протофиламентом стала ниже $0.1 k_B T$, считался «отсоединенным» и был исключен из моделирования. Вычислительный алгоритм реализован на языке C++, расчеты проводились на суперкомпьютере МГУ «Ломоносов-2».

Согласно литературным данным значения динамической персистентной длины протофиламентов тубулина, характеризующие их гибкость, лежат в пределах от 200 нм до 2 мкм. Проведенные в рамках диссертационной работы расчеты показывают, что изгибная жесткость $300 k_B T / \text{rad}^2$, соответствует персистентной длине примерно в середине этого диапазона. При этом, подсчет частоты спонтанных конформационных переходов нижнего звена протофиламента тубулина из изогнутой ($\theta > 0.15$ рад) в прямую конфигурацию ($\theta < 0.05$ рад) за счет тепловых флуктуаций в процессе симуляции указывает на то, что частота таких выпрямлений достигает мегагерц для изолированного протофиламента. Таким образом, тепловых флуктуаций вполне достаточно для обеспечения наблюдаемой скорости сборки микротрубочек путем выпрямления изогнутых протофиламентов их на конце и формирования боковых связей между

протофиламентами. Этот вывод был подтвержден прямыми симуляциями сборки микротрубочек. При заданной концентрации тубулина и константе скорости его присоединения к концам протофиламентов, скорость сборки микротрубочки в расчетах зависела от соотношения энергии изгиба протофиламента и величины потенциальной ямы латерального взаимодействия между тубулинами (Рис. 4).

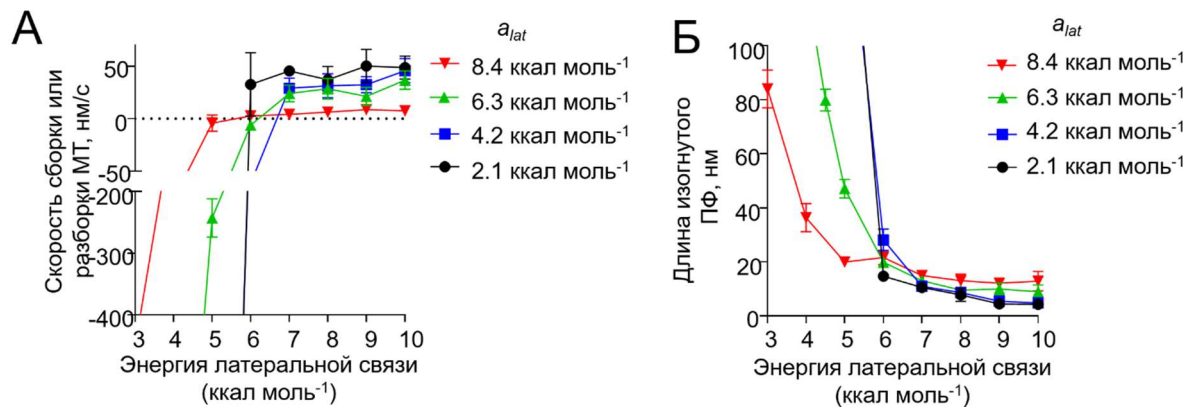


Рис. 4. Зависимости скорости сборки/разборки и длины изогнутых протофиламентов на конце микротрубочки от энергии латеральной связи при фиксированной изгибной жесткости протофиламента. Графики из статьи [Gudimchuk et al., 2020].

При фиксированной жесткости протофиламента, крутизна зависимости скорости сборки микротрубочек от энергии латеральной связи определялась величиной активационного барьера для латеральной связи. Если данный барьер отсутствовал или его величина была мала, как ранее предполагалось в литературе, зависимость скорости сборки микротрубочки от энергии латеральных связей оказывалась слишком резкой. С помощью введения в модель кинеторного белкового комплекса Dam1, было продемонстрировано, что такая резкая зависимость скорости сборки микротрубочки от энергии латеральных связей приводит к тому, что деполимеризацию микротрубочек может остановить даже небольшая сила, приложенная вдоль оси микротрубочки к ее концу (Рис. 5А).

Так, в случае когда энергия активации латеральной связи равна нулю, силы 2.5 пН достаточно для полной остановки разборки микротрубочки. Увеличение энергии активации латеральной связи (a_{lat}), во-первых,

приводит к более плавной зависимости скорости сборки микротрубочки от латеральной связи и, во-вторых, позволяет описать генерацию микротрубочкой силы до 30 пН при разборке.

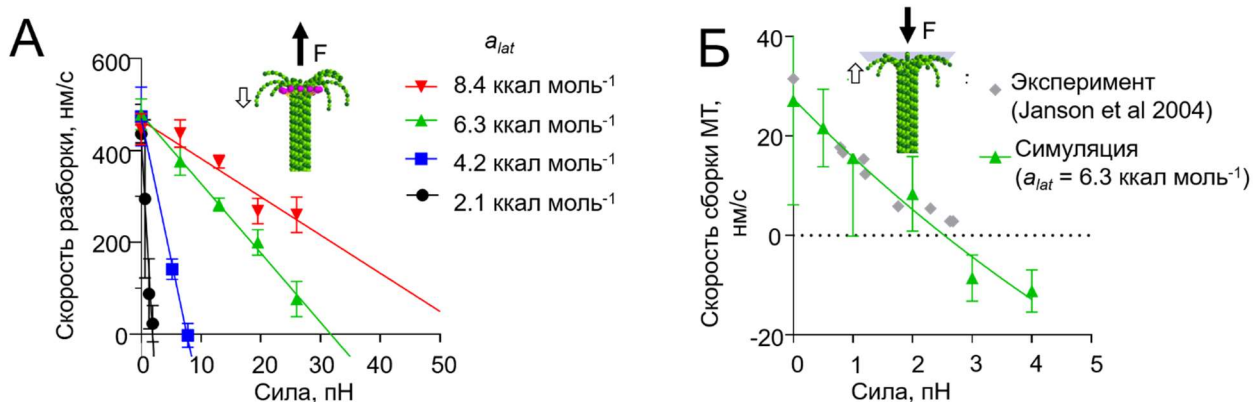


Рис. 5. Результаты моделирования генерации сил разбирающимися и собирающимися микротрубочками. А. Серия зависимостей скорости разборки микротрубочки от силы, приложенной к кольцевому кинетохорному комплексу Dam1, расположенному на конце микротрубочки при различных значениях параметра латеральной энергии активации (a_{lat}). Б. Зависимость скорости сборки конца микротрубочки, упирающегося в механический барьер, от силы, придвигающей барьер. Графики из статьи [Gudimchuk et al., 2020]. Серыми точками показаны экспериментальные данные из статьи [Janson et al., 2014].

Модель, параметризованная таким образом, чтобы описывать скорости сборки и разборки микротрубочки при фиксированной концентрации тубулина (10 мкМ), а также морфологию конца микротрубочек в этих условиях и способность генерировать силу ~ 30 пН при разборке, также хорошо описывает толкающие силы, развиваемые микротрубочками при сборке (Рис. 5Б), а также скорости сборки и разборки и морфологию концов микротрубочек в широком диапазоне концентраций тубулина (Рис. 6). Кроме того, модель описывает более тонкие особенности конфигурации концов микротрубочек, а именно дисперсию прямых частей протофиламентов (координат вдоль оси микротрубочки, от которых происходит отщепление изогнутых протофиламентов). Эта дисперсия в симуляциях и в экспериментах увеличивается по мере увеличения скорости сборки микротрубочек. С помощью модели впервые продемонстрирован механизм ускорения темпа сборки микротрубочек под воздействием

механической силы, приложенной к изогнутым протофиламентам через кольцевое сопрягающее устройство Dam1.

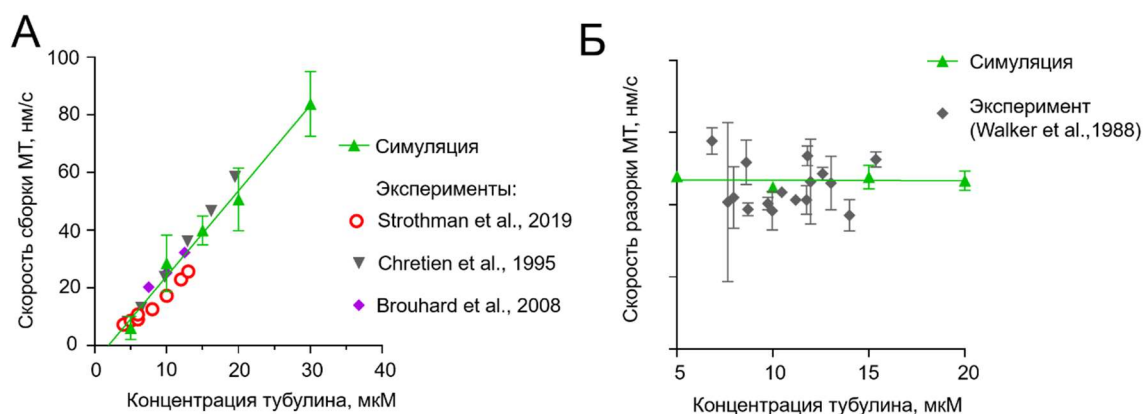


Рисунок 6. Зависимости скорости сборки (А) и разборки (Б) от концентрации свободного тубулина в модели и в опубликованных экспериментах. Графики из статьи [Gudimchuk et al., 2020].

В части 2.5. «Применение динамического метода Монте-Карло для моделирования динамической нестабильности микротрубочек» разрабатывается подход для описания динамики микротрубочек на пространственном масштабе нескольких десятков микрометров и временах порядка сотен минут с учетом ранее выявленных структурных, механических и биохимических свойств тубулинов и открытых закономерностей сборки и разборки микротрубочек. На этом наименее детальном слое моделирования, микротрубочка представляется как матрица, каждый элемент которой несет информацию о нуклеотидном и конформационном состоянии тубулина (Рис. 7). Состояние элементов матрицы обновляется на каждом шаге модели в соответствии с кинетическими константами скоростей реакций, характеризующих молекулярные переходы различного типа, такие как присоединение-отсоединение тубулинов, выпрямление или изгиб димеров тубулина, гидролиз ГТФ. Состояние системы обновляется на каждом шаге расчета в соответствии с динамическим алгоритмом Монте-Карло. В согласии с выводами более детальных слоев мульти-масштабной модели:

молекулярно-динамических расчетов и расчетов методом броуновской динамики, в Монте-Карло модели микротрубочки предполагается, что равновесная конформация ГТФ- и ГДФ-тубулинов одинакова, а гидролиз изменяет энергию деформации протофиламентов.

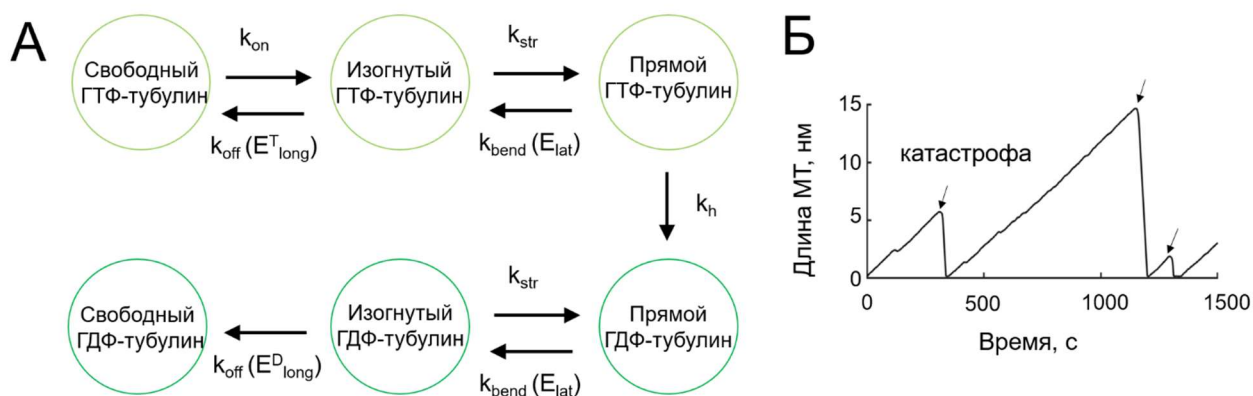


Рис. 7. Монте-Карло модель динамической нестабильности микротрубочек. А. Схема основных состояний и переходов в модели. Б. Характерная зависимость длины микротрубочки от времени, полученная с помощью расчетов в рамках данной модели. Стрелками отмечены катастрофы – переходы от сборки к разборке.

Описанная выше модель была построена и реализована в пакете Matlab 2017b аспиранткой В.А. Александровой под руководством автора данной диссертационной работы. Эта модель описывает кинетику сборки и разборки микротрубочек, морфологию концов микротрубочек, их зависимость от концентрации свободного тубулина. Кроме того, продемонстрировано, что при введении в модель конформационно-зависимого гидролиза ГТФ и кинетических штрафов присоединения димеров тубулина к сайтам, частично стерически ограниченных присутствием соседних протофиламентов, модель также описывает два важных экспериментальных наблюдения: 1) времена дестабилизации микротрубочек в опытах с резким снижением концентрации свободного тубулина, 2) феномен «старения» микротрубочек, выражающийся в медленном увеличении вероятности катастрофы микротрубочек по мере их полимеризации. Механизмы многостадийной катастрофы заключается в постепенной дестабилизации конца микротрубочки за счет изменения

относительной длины протофиламентов со временем: чем больше дисперсия длин прямых частей протофиламентов, тем меньше стабильность микротрубочки. Продемонстрировано, что параметризация модели, в которой возможно непротиворечивое описание все вышеперечисленных экспериментальных наблюдений о динамике микротрубочек, не совместима с наблюдением спонтанных спасений. При этом наличие стабилизирующего «островка» размером около 10 димеров ГТФ-тубулина в решетке микротрубочки способно вызвать остановку деполимеризации и переход к сборке при физиологически значимых концентрациях свободного тубулина порядка 10 мкМ. Этот вывод полностью согласуется с экспериментальными наблюдениями, изложенными в части 5 главы 3 диссертационной работы.

Глава 3. Экспериментальное исследование динамической нестабильности микротрубочек и генерации ими механической силы.

Первая часть данной главы «**3.1 Формулировка целей и задач экспериментальных исследований микротрубочек**» перечисляет некоторые важные нерешенные биофизические проблемы и противоречия, касающиеся механизмов динамики микротрубочек и их работы в качестве молекулярных машин, транспортирующих хромосомы, и участвующих в ряде других жизненно важных внутриклеточных процессов. Обосновывается актуальность решения этих проблем и необходимость проведения новых экспериментальных исследований. Формулируются цели и задачи экспериментальных исследований динамики микротрубочек, которым посвящена эта глава диссертационной работы. Кратко эти экспериментальные задачи были сформулированы как выявление ключевых аспектов работы микротрубочек: 1) определение структуры конца микротрубочки и ее взаимосвязи с механизмом сборки тубулиновых филаментов; 2) измерение силы, развиваемой микротрубочкой при деполимеризации; 3) поиск условий и количественная характеристика частоты переключений микротрубочек от разборки к сборке.

В части 3.2. «Получение препаратов очищенных белков» описываются методы приготовления белков и белковых комплексов, использованных при проведении экспериментальных исследований механизмов динамической нестабильности микротрубочек и ее регуляции. Тубулины приготавливались путем термического циклирования в высокосолевоом буфере. Рекомбинантные белки комплекса Dam1, полноразмерного кинетохорного кинезина CENP-E и его усеченного варианта получались путем экспрессии соответствующих плазмид в культурах бактериальных клеток или в клетках насекомых (в сотрудничестве с лабораторией проф. Д.Кливленда, Университет Сан Диего, США). Очистка проводилась методами аффинной и ионнообменной хроматографии. Степень очистки оценивалась с помощью электрофореза на полиакриламидном геле.

В части 3.3. «Анализ структуры концов микротрубочек при сборке и разборке методом криоэлектронной томографии» описан анализ структуры протофиламентов на концах микротрубочек в шести различных организмах и в очищенной системе. Данные электронной криотомографии были получены лабораторией Ричарда МакИнтоша (Университет Колорадо, г. Боулдер, США). Образцы клеток для анализа приготавливались методами быстрой заморозки при высоком давлении. Образцы микротрубочек в очищенной системе замораживались методом быстрого погружения в жидкий этан. Автор диссертационной работы участвовал в планировании экспериментов, полностью выполнил количественную обработку и анализ полученных данных. Измерялись длины и кривизны протофиламентов, степень разброса точек отклонения протофиламентов от микротрубочки. Зависимость кривизны протофиламентов от расстояния до их конца, а также гибкость протофиламентов. Для оценки гибкости использовалось понятие динамической персистентной длины. Были определены характеристики

протофиламентов полимеризующихся интерполярных микротрубочек в анафазе Б митоза в шести видах организмов (таблица 2).

Таблица 2. Характеристики изогнутых протофиламентов на концах интерполярных микротрубочек в анафазе Б митоза в различных организмах. Данные из статьи [McIntosh et al., 2018].

Организм	Длина ПФ (нм)	Кривизна ПФ (град/димер)	Персистентная длина, нм	Число ПФ
<i>Arabidopsis thaliana</i>	44 ± 21	13.6 ± 11.3	227 ± 25	469
<i>S.Cerevisiae</i>	32 ± 12	14.7 ± 13.0	234 ± 48	128
<i>C.reinhardtii</i>	36 ± 13	20.4 ± 14.4	165 ± 10	329
<i>Potorous tridactylis</i>	33 ± 14	17.2 ± 11.6	206 ± 17	429
<i>C.Elegans</i>	34 ± 12	18.4 ± 13.4	154 ± 25	123
<i>S.Pombe</i>	33 ± 13	15.5 ± 12.0	162 ± 10	711

Кроме того, найдены характеристики протофиламентов на концах микротрубочек, деполимеризующихся и полимеризующихся в очищенной системе *in vitro* в различных условиях (таблица 3). Совокупно полученные данные свидетельствуют о том, что вопреки ранее существовавшим представлениям, изогнутые протофиламенты являются общей структурной особенностью концов собирающихся микротрубочек. При этом характеристики этих протофиламентов практически неизменны в широком диапазоне экспериментальных условий за исключением добавления высокой концентрации ингибитора деполимеризации микротрубочек, паклитаксела, что приводит к увеличению длины и уменьшению кривизны протофиламентов (Рис. 8).

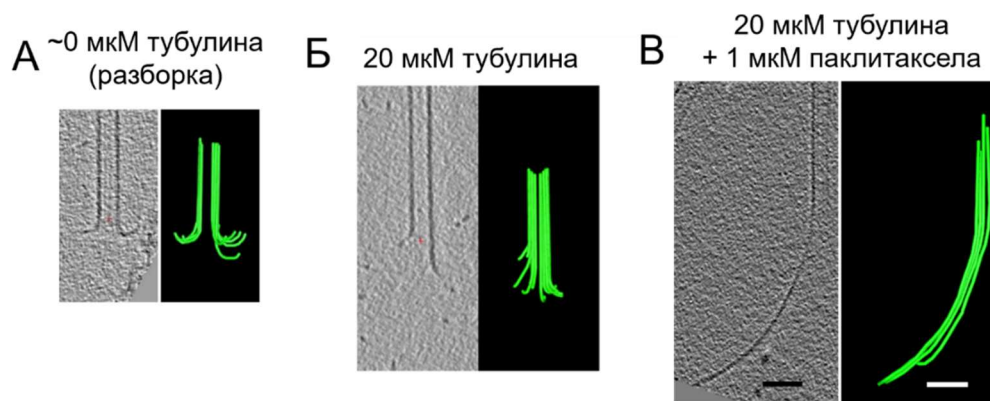


Рис.8. Проекция криоэлектронных томограмм концов микротрубочек и соответствующие им 3D-модели. А. Конец разбирающейся микротрубочки при изотермическом разбавлении раствора тубулина. Б. Конец собирающейся микротрубочки при концентрации тубулина в растворе 20 мкМ. В. Конец собирающейся микротрубочки. Концентрация тубулина 20 мкМ, концентрации паклитаксела - 1 мкМ. Данные из адаптированы из статьи [Gudimchuk et al., 2020].

Таблица 3. Характеристики изогнутых протофиламентов на концах микротрубочек в экспериментах в очищенных системах *in vitro*

Условия эксперимента	Длина ПФ, нм	Кривизна ПФ, (град/димер)	Число ПФ
10 мкМ тубулина	34 ± 13	21 ± 13	374
20 мкМ тубулина	35 ± 14	21 ± 14	362
40 μМ тубулина	39 ± 20	18 ± 13	369
~0 мкМ тубулина (разборка)	43 ± 16	20.2 ± 12.1	365

Часть 3.4. «Исследование механизма перехода микротрубочек от разборки к сборке» посвящена одному из наименее изученных аспектов динамической нестабильности микротрубочек. Эксперименты, описанные в данном разделе, были выполнены студентом магистратуры физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, А.Н.Анисимовым и частично аспирантом физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, А.В. Зайцевым под руководством автора данной диссертационной работы.

Спонтанная остановка деполимеризации микротрубочек и их последующий переход к сборке (так называемое «спасение») происходит в очищенных системах довольно редко. Поэтому в работе были предприняты меры по оптимизации условий наблюдения спасений микротрубочек.

Затравки микроотрубочек, полимеризованные в присутствии медленно гидролизуемого аналога ГТФ, GMPCPP, были иммобилизованы на поверхности покровного стекла проточной микроскопной камеры. Далее в камеру вводился раствор тубулина в присутствии ГТФ и осуществлялась съемка в режиме дифференциального интерференционного контраста сразу 10 регионов проточной камеры, путем быстрого перехода от одного участка к другому с помощью запрограммированного микроскопного столика (Prior Scientific). Данные эксперимента обрабатывались в программе ImageJ. Для анализа отбирались микроотрубочки, которые не имели пересечений друг с другом или с другими рельефными объектами в проточной камере. Строились кимограммы, отображающие кинетику изменения длины плюс-концов и минус-концов микроотрубочек вдоль заданного направления. Было обнаружено, что распределение положений спасений микроотрубочек немонотонное, вопреки тому, что можно было бы ожидать, если бы спасение происходило равновероятно в любой точке при деполимеризации микроотрубочек или если бы вероятность спасения была повышена вблизи плюс-конца микроотрубочки. Напротив, данное распределение имело четко выраженный пик, сдвинутый к затравке микроотрубочки.

В связи с этим было сделано предположение, что спасение индуцируется при неспецифическом взаимодействии микроотрубочки и покровного стекла. Для проверки этой гипотезы с помощью метода фотолитографии на поверхность покровного стекла был нанесен рельеф в виде пьедесталов из фоторезиста SU-8 (Рис. 9).

В этих условиях микроотрубочки демонстрировали ту же скорость сборки и ту же частоту катастроф, что при сборке из затравок, закрепленных на немодифицированном покровном стекле, однако частота спасений микроотрубочек была существенно ниже (Рис. 10).

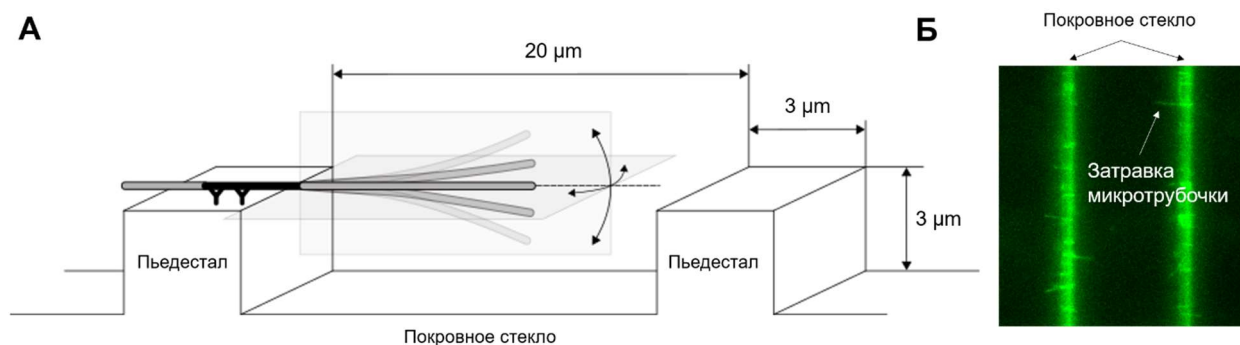


Рис. 9. Иллюстрация эксперимента, в котором микротрубочки полимеризуются из затравок на микрорельефах. А. Схема покровного стекла с нанесенным микрорельефом из фоторезиста SU-8. Б. Флуоресцентная фотография затравок микротрубочек на пьедесталах.

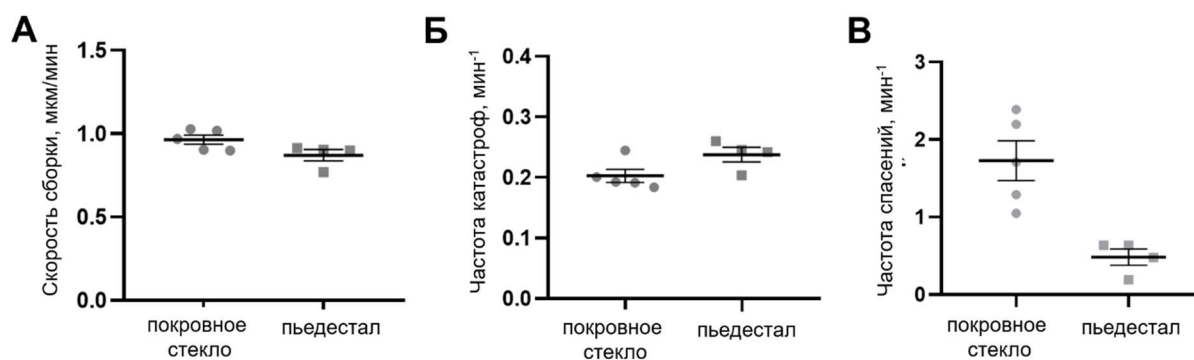


Рис. 10. Сравнение характеристик динамической нестабильности микротрубочек, полимеризующихся из затравок на покровном стекле и вдали от покровного стекла (нависающих с пьедесталов).

Наблюдение о существенно сниженной вероятности спасений на изолированных микротрубочках, во-первых, согласуется с предсказаниями Монте-Карло моделирования, а во-вторых свидетельствует о том, что именно неспецифические контакты микротрубочек со стеклом каким-то образом индуцируются переход от разборки к сборке.

В части 3.5. «Измерение сил, развиваемых микротрубочками при деполимеризации» описывается серия прямых измерений сил, развиваемых микротрубочкой при деполимеризации с участием кольцевого кинетохорного комплекса Dam1 в качестве сопрягающего устройства между микротрубочкой и микрогрузом. Эти эксперименты являются продолжением более ранних пионерских измерений, выполненных в

группах профессора Дж. Р. МакИнтоша и профессора Ф.И. Атауллаханова. В этих ранее опубликованных исследованиях измерялись силы, развиваемые предположительно одним или двумя протофиламентами разбирающейся микротрубочки при латеральном прикреплении микрогруза непосредственно к стенке микротрубочки [Grishchuk et al., 2005]. Несмотря на несомненную ценность данных экспериментов, стоит отметить, что полученные в них оценки сил были косвенными и требовали дополнительных предположений для расчета полной силы, генерируемой микротрубочкой. В частности, поскольку измерялся сигнал силы лишь малого числа протофиламентов, необходимым было предположение об их аддитивном вкладе в полную силу.

В рамках данного диссертационного исследования были проведены прямые измерения сил, развиваемых разбирающимися микротрубочками при участии всех протофиламентов при наличии кольцевого кинетохорного комплекса Dam1 в качестве сопрягающего устройства.

Для этого в первой серии экспериментов стеклянные микросферы диаметром 0.5-1 микрометров прикреплялись к микротрубочке через Dam1 комплекс, который формировал вокруг микротрубочки кольцо [Grishchuk et al., 2008]. Разборка микротрубочек индуцировалась путем контролируемого фоторазрушения специально созданного стабилизирующего слоя GMPCPP-тубулинов на конце микротрубочки. Измерения показали, что наличие Dam1 кольца увеличивает максимальный толчок, оказываемый на микросферу до 2.3 пН, что в 5.7 раз больше по сравнению с силой 0.45 пН, измеренной в пионерских исследованиях Грищук и соавторов без Dam1 кольца. Измеренный коэффициент увеличения амплитуды развиваемой силы близок к теоретически предсказанному коэффициенту 6.5, ожидаемому за счет увеличения количества вовлеченных в работу протофиламентов с двух до 13, подтверждая гипотезу об их аддитивном вкладе в суммарную силу.

Расчет полной силы, которую микротрубочка может развивать при деполимеризации, производился из условия баланса сил и вращательных моментов сил со стороны микротрубочки и лазерной ловушки (Рис. 11):

$$\begin{cases} F_{MT} = F_{опоры} + F_{оптич} \\ F_{оптич} (2R_{кольца} + R_{микросферы}) = R_{MT} r \end{cases}, \quad (11)$$

где F_{MT} - сила, генерируемая микротрубочкой, $F_{опоры}$ - сила сопротивления опоры, $F_{оптич}$ - сила, действующая на микросферу со стороны ловушки, $R_{кольца}$ - радиус Dam1 кольца, $R_{микросферы}$ - радиус микросферы, R_{MT} - радиус

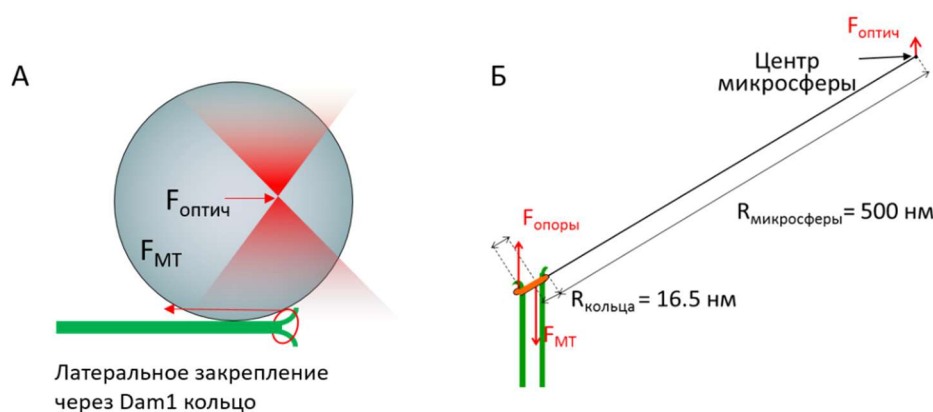


Рис. 11. Измерение силы, генерируемой разбирающейся микротрубочкой при участии кольцевого Dam1 комплекса в качестве сопрягающего устройства. А. Схема эксперимента. Б. Баланс сил и моментов сил, действующих в рассматриваемой системе. Рисунок из статьи [Grishchuk et al., 2008].

Во второй серии экспериментов, между Dam1 кольцами и микросферами были добавлены белковые линкеры длиной 100 нм [Volkov et al., 2013]. Благодаря наличию таких линкеров, в момент, когда разбирающийся конец микротрубочек достигал Dam1 кольца, под воздействием момента силы со стороны оптической ловушки микросфера вращалась и достигала торцевого закрепления за конец микротрубочки, то есть ее центр располагался на оси микротрубочки (Рис. 12). В этом случае, когда система достигала равновесия, вращающие моменты сил со стороны микротрубочки и со стороны ловушки становились равными нулю, а сами эти силы, согласно третьему закону Ньютона, были равны по амплитуде и противоположны по

направлению. Данная постановка эксперимента обеспечивает наиболее прямое измерение силы. Измеренная таким образом максимальная сила, развиваемая микротрубочкой при разборке, составила около 30 пН (Рис. 12).

Полученный результат согласуется с ранее опубликованными оценками силы микротрубочки, полученными на основе косвенных измерений.

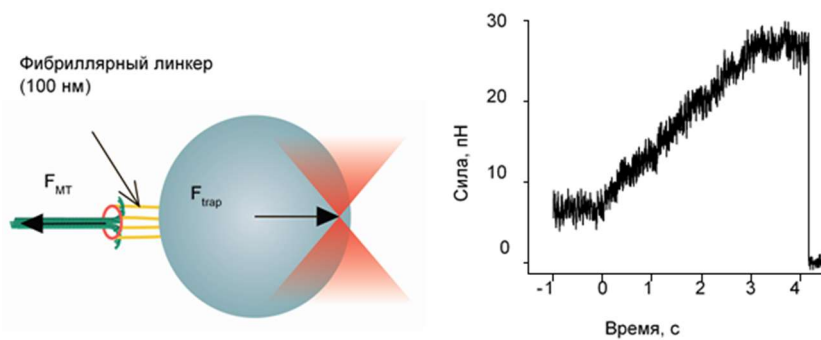


Рисунок 12. Прямые измерения для определения максимальной силы, развиваемой микротрубочкой при деполимеризации. Слева – схема эксперимента, справа – пример сигнала силы, развиваемой микротрубочкой.

График из статьи [Volkov et al., 2013]

В части **3.6. «Микротрубочки как молекулярные машины»** на основе теоретически вычисленных и экспериментально измеренных силовых характеристик и энергетических характеристик микротрубочек определяется КПД микротрубочек как молекулярных машин, способных генерировать полезную работу в цикле полимеризации-деполимеризации. По полученным в работе экспериментальным и теоретическим оценкам, при близкой к физиологической концентрации тубулина микротрубочка может развивать максимальную силу около 2.4 пН при сборке и максимальную силу около 30 пН при разборке, что позволяет оценить максимальный коэффициент полезного действия (КПД) микротрубочки как молекулярной машины: около 15% при сборке и около 37% при разборке в случае, если передача силы от протофиламентов к микрогрузу при разборке опосредована дрожжевым кинетохорным комплексом Dam1.

Глава 4. «Механизмы сопряжения микротрубочек и хромосом в клетках животных» описывает исследования молекулярных свойств одного из важнейших фибриллярных кинетохорных белков животных

организмов, кинезина CENP-E, и механизмов его взаимодействия с микротрубочками.

В части 4.1. «Кинетохорный кинезин CENP-E: моторные свойства, роль основных доменов» представлены результаты одномолекулярных исследований рекомбинантного кинезина CENP-E при его АТФ-зависимом движении вдоль решетки стабильных микротрубочек. Поведение индивидуальных димеров белка CENP-E на микротрубочках изучалось с помощью метода TIRF микроскопии и путем наблюдения движения микросфер, покрытых CENP-E. Исследовались четыре типа химерных белковых конструкций кинезина CENP-E, слитых с белком GFP на С-конце: (1) полноразмерный белок CENP-E («FL CENP-E», от англ. full length); (2) N-концевой фрагмент CENP-E, содержащий 473 аминокислотных остатка («TR CENP-E», от англ. truncated); (3) белок CENP-E с укороченным суперспиральным стеблем полной длиной 1727 аминокислотных остатков, («BS CENP-E», от англ. «bonsai»); (4) С-концевой неструктурированный фрагмент белка CENP-E, содержащий 199 аминокислотных остатков («хвост CENP-E»).

Движение отдельных димеров TR CENP-E по стабилизированным микротрубочкам было регулярным со средним пробегом 2.7 ± 0.2 мкм и скоростью 17.6 ± 0.7 мкм/мин [Gudimchuk et al., 2013]. Димеры FL CENP-E двигалась либо сходным образом со скоростью 23.6 ± 3.0 и длиной пробега 2.5 ± 0.2 , либо связывались с микротрубочками на короткое время (<1 с) и диффундировали вдоль их поверхности. Последний тип поведения был интерпретирован как результат автоингибирования CENP-E. Белок BS CENP-E был также автоингибирован, однако, мог быть активирован при связывании с микросферами через свой С-конец [Vitre et al., 2014]. В последнем случае, он двигался со сниженной скоростью, 5.9 ± 0.5 мкм/мин. Хвост CENP-E связывался с микротрубочками через ранее охарактеризованный в литературе дополнительный сайт связывания и

диффундировал вдоль их поверхности. Характерное время связывания хвоста CENP-E со стенкой микротрубочки составило 0.47 ± 0.03 с. При этом коэффициент диффузии вдоль микротрубочки был равен $1.6 \text{ мкм}^2/\text{с}$. Характеристики подвижности белков CENP-E, прикрепленных к стеклянным микросферам, были измерены в экспериментах с оптической ловушкой. Графики зависимостей скорости и длины пробега белков CENP-E от приложенной внешней силы представлены на рис. 13.

Белки FL и TR CENP-E продемонстрировали количественно схожие характеристики АТФ-зависимого перемещения вдоль стабильных микротрубочек. Сила необходимая для полной остановки белков TR и FL CENP-E составила около -6 пН. При этом вероятность открепления белков от микротрубочки увеличивалась в e раз при силах 2.0 ± 0.3 пН и 2.1 ± 0.5 пН для FL CENP-E и TR CENP-E, соответственно.

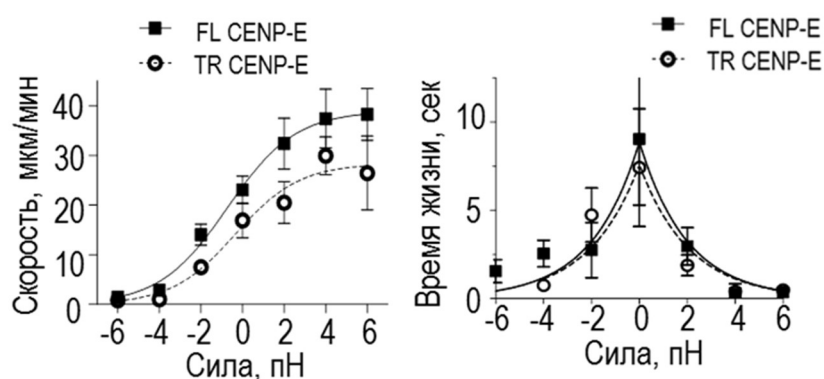


Рис. 13. Зависимости скорости и времени связывания белков CENP-E с микротрубочками от приложенной к этим белкам внешней силы. Графики из статьи [Gudimchuk et al., 2018].

В части 4.2.

«Обнаружение способности кинезина CENP-E следовать за концами микротрубочек и сопрягать с ними микрогрузы» описаны эксперименты, позволившие впервые продемонстрировать способность кинезина CENP-E выполнять роль сопрягающего белкового устройства для динамических концов микротрубочек в очищенной системе *in vitro*. Эксперименты проводились с использованием метода двухцветной TIRF микроскопии. Было показано, что отдельные димеры полноразмерного кинезина CENP-E, присоединившись к микротрубочке, могли достигать

динамических концов микротрубочек за счет АТФ-зависимого перемещения и следовать за собирающимися или разбирающимися концами микротрубочек в течение 17.9 ± 1.3 с и 11.6 ± 1.4 с, соответственно (Рис. 14). Крупные кластеры из множества димеров CENP-E могли следовать за концами микротрубочек в течение нескольких циклов сборки и разборки. При этом большие комплексы замедляли динамику микротрубочек, а отдельные димеры или небольшие их комплексы не оказывали влияния на параметры динамической нестабильности. Усеченный вариант белка не был способен следовать за динамическими концами микротрубочек.

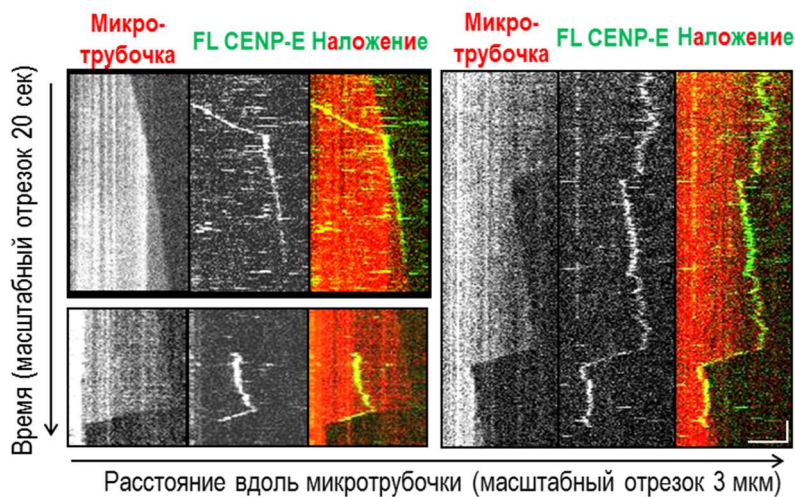


Рис. 14. Кимограммы, иллюстрирующие взаимодействия FL CENP-E с динамическими концами микротрубочек. Картинки из статьи [Gudimchuk et al., 2013].

Во второй серии экспериментов микросфера, покрытая белками CENP-E, приводилась в контакт с микротрубочкой с помощью лазерной ловушки. После этого вызывалась разборка микротрубочки путем разрушения специально сформированной на конце микротрубочки фоточувствительной стабилизирующей зоны (Рис. 15).

Наблюдения за взаимодействием микросфер с разбирающимися концами микротрубочек показали, что белок FL CENP-E, в отличие от TR CENP-E демонстрировал способность перемещать микросферы за разбирающимся концом микротрубочки. Обнаруженное свойство FL CENP-E указывает на его возможное прямое участие в сопряжении динамических концов микротрубочек с движением хромосом.

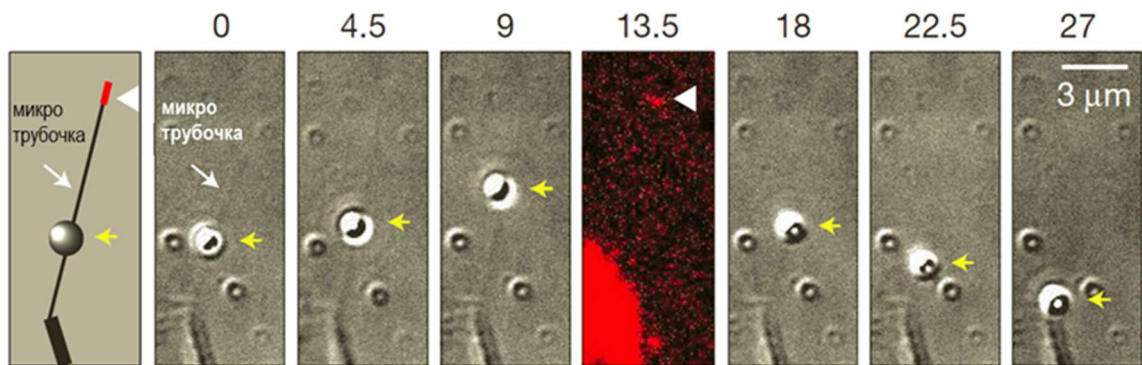


Рис. 15. Схема (слева) и кадры движения микросферы, покрытой FL CENP-E по сегментной микротрубочке (с интервалом 4.5 с.). Картинки из статьи [Gudimchuk et al., 2013].

Часть 4.3. «Теория сопряжения кинезина CENP-E с концами динамических микротрубочек» посвящена описанию модели взаимодействия кинезина CENP-E с концами собирающихся и разбирающихся микротрубочек и результатов ее экспериментальной проверки. Модель базируется на динамическом методе Монте-Карло, и описывает движение CENP-E в виде стохастических реакций и событий, изображенных на рис. 16 [Gudimchuk et al., 2013].

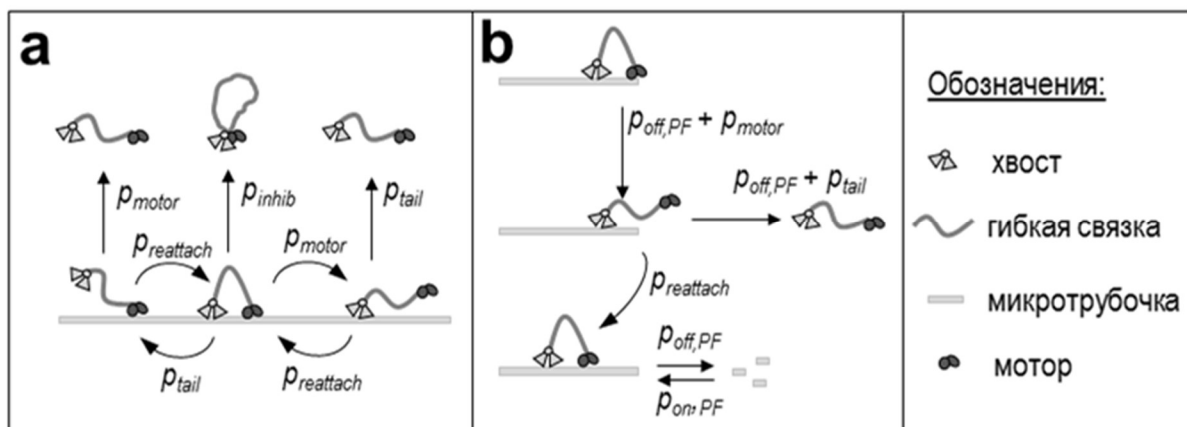


Рисунок 16. Кинетическая схема модели CENP-E на динамической микротрубочке: (а) на стенке (b) на конце. Схема из статьи [Gudimchuk et al., 2013].

В модели моторный домен кинезина CENP-E достигает конца микротрубочки и открепляется, но CENP-E остается связанным с микротрубочкой благодаря быстро диффундирующему хвосту CENP-E.

Продемонстрировано, что данная модель воспроизводит поведение CENP-E в эксперименте: молекула FL CENP-E в расчетах способна следовать как за укорачивающимися, так и за удлиняющимися концами микротрубочек, а TR CENP-E отсоединяется от микротрубочки практически немедленно после встречи с динамическим концом. Выводы данной модели были верифицированы рядом дополнительных экспериментов. В частности, показано, что в соответствии с предсказаниями моделирования, ингибирование моторной активности FL CENP-E приводит к его отсоединению от динамического конца микротрубочки. Объединение моторного и хвостового доменов CENP-E с помощью искусственного объекта, такого как квантовая точка, достаточно для воссоздания способности следовать динамическим концом микротрубочки. При этом отдельные домены белка CENP-E не имеют повышенной аффинности к определенному нуклеотидному состоянию тубулина или к искривленным протофиламентам, что также было показано экспериментально.

Таким образом, в работе впервые продемонстрирован механизм, позволяющий кинезину CENP-E, не способному предпочтительно связываться с концом микротрубочки, тем не менее эффективно удерживается в окрестности динамического конца микротрубочки за счет совместной активности своего хвостового и моторного доменов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе разработана многомасштабная модель динамики микротрубочек и их взаимодействия с кинетохорными белками CENP-E и Dam1. Проведены экспериментальные исследования, устанавливающие механизмы ряда важнейших аспектов этих процессов. Общая схема исследований показана на рисунке 17.

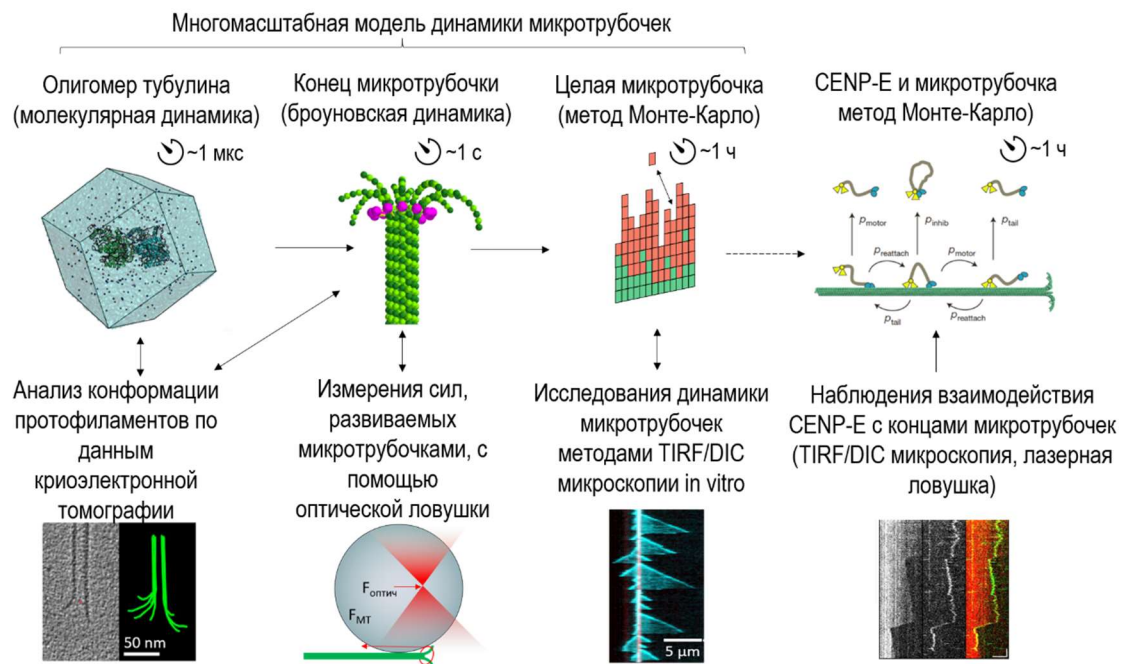


Рис. 17. Общая схема исследований в диссертационной работе. В верхней половине рисунка показаны уровни многомасштабной модели динамики микротрубочек, модели взаимодействия микротрубочек и кинетохорного белка CENP-E. Для каждого уровня модели указаны масштабы времени, на которых происходит описание моделируемых процессов. В нижней половине рисунка показаны ключевые эксперименты, позволившие установить новые механизмы динамики микротрубочек и их взаимодействия с кинетохорными белками. Взаимосвязи между уровнями иерархической модели, а также между моделями и экспериментами указаны стрелками.

Одним из наиболее важных результатов представляется открытие нового механизма сборки микротрубочек. Ранее считалось, что микротрубочки собираются из «прямых» димеров ГТФ-тубулина, которые образуют на растущем конце микротрубочке цилиндр или по структуре, напоминающую раскрытый лист. Эти данные опровергаются в настоящей работе анализом новых данных криоэлектронной томографии полимеризующихся микротрубочек в клетках и *in vitro*, включающих многочисленные контрольные эксперименты, которые показывают, что микротрубочки удлиняются, имея на концах отдельные радиально изогнутые протофиламенты [McIntosh et al., 2018], [Gudimchuk et al., 2020]. Показано, что морфология конца микротрубочки при сборке и разборке различается незначительно. Это согласуется с опубликованными данными кристаллографии, согласно которым свободные димеры тубулинов имеют

сходную изогнутую конформацию в комплексе с ГДФ и ГТФ. Многомасштабное моделирование устанавливает, тем не менее, ряд важных различий между ГТФ и ГДФ тубулинами.

В работе построена теория, объясняющая почему и как микротрубочки полимеризуются, деполимеризуются и переключаются между данными динамическими состояниями. В отличие от классических представлений, многомасштабная модель, разработанная в данной диссертации, объясняет многостадийную природу катастрофы микротрубочки – резкого переключения от сборки к разборке. Согласно полученным результатам, в этом процессе играет важную роль не только гидролиз ГТФ, но и постепенное изменение конфигурации конца микротрубочки при ее сборке. Обратный процесс – спасение – не является простой инверсией событий, происходящих при катастрофе. Модель предсказывает, а эксперименты подтверждают, что спасения происходят на участках микротрубочки, которые обогащены ГТФ-тубулинами.

Неожиданным новым результатом является предсказание молекулярно-динамических расчетов, что гибкие С-концы микротрубочек могут напрямую модулировать кинетику сборки микротрубочек, связываясь с положительно заряженными аминокислотными остатками на полимеризационных интерфейсах α -тубулинов и стерически препятствуя их присоединению к изогнутым протофиламентам на концах микротрубочек [Chen et al., 2021]. Поскольку неструктурированные С-концы тубулинов являются мишенями многочисленных пост-трансляционных модификаций и могут взаимодействовать с различными белками - партнерами микротрубочек, это открытие добавляет новую модальность для регуляции полимеризации микротрубочек в клетках.

Одно из центральных мест в работе занимает исследование свойств микротрубочек как молекулярных машин [Zakharov et al., 2015], [Gudimchuk et al., 2020]. Микротрубочка динамически нестабильна и проходит циклы полимеризации и деполимеризации, сменяющие друг друга [Захаров и др., 2016]. В ходе одного цикла полимеризации и деполимеризации

микротрубочки, происходит гидролиз 13 молекул ГТФ на каждый полный виток тубулиновой спирали в решетке микротрубочки. Сборка микротрубочек не требует гидролиза ГТФ, а происходит благодаря наличию избыточной свободной энергии раствора тубулина и ГТФ (при концентрации ГТФ-тубулинов выше равновесной). Гидролиз ГТФ необходим для дестабилизации микротрубочек и их перехода к разборке. В цикле полимеризации и последующей деполимеризации микротрубочка может преобразовывать химическую энергию в механическую, развивая силу двумя способами: толкая объекты при сборке, и увлекая объекты за разбирающимся концом во время деполимеризации. По полученным в работе экспериментальным и теоретическим оценкам, при близкой к физиологической концентрации тубулина микротрубочка может развивать максимальную силу около 2.4 пН при сборке и максимальную силу около 30 пН при разборке [Grishchuk et al., 2008], [Volkov et al., 2013], [Gudimchuk et al., 2020].

Совокупно, полученные в работе данные непротиворечиво объединяются в концепцию одной многомасштабной модели динамической микротрубочки. Кроме устранения ранее существующих нестыковок и пробелов в понимании ряда аспектов работы микротрубочек, модель имеет предсказательную ценность и позволяет выдвинуть гипотезы о механизмах управления свойствами микротрубочек в различных внутриклеточных процессах. Так, на основе модели предложено объяснение вероятного механизма действия на микротрубочку ряда белков-регуляторов, предпочитающих связываться с тубулинами в изогнутой конформации, таких как белок статмин, кинезин МСАК. Дано объяснение ~20-кратного синергетического увеличения скорости сборки микротрубочек в присутствии двух различных белков-регуляторов *in vitro*: ТОГ-полимеразы ХМАР215, которая по отдельности ускоряет сборку до 5 раз, и плюс-концевого белка EB1, который автономно ускоряет сборку микротрубочек около в 1.5-2 раза. Аналогично, на основе модели были выдвинуты гипотезы о вероятных механизмах работы многих известных низкомолекулярных

препаратов химиотерапии рака, включая колхицин-подобные препараты и алкалоиды барвинка. Модель указывает на то, что помимо роли в регуляции динамики микротрубочек, структура концов собирающихся микротрубочек может быть важна и для закрепления за них кинетохорных белков и для управления динамикой микротрубочек с помощью приложенной механической силы со стороны веретена деления.

Несмотря на успешное воспроизведение и объяснение в рамках представленной в диссертации работе многомасштабной модели микротрубочки целого ряда экспериментальных данных, важно отметить, ограничения применимости модели. С целью упрощения расчетов и снижения количества свободных параметров, модель броуновской динамики не рассматривала все степени свободы протофиламентов тубулина, ограничиваясь описанием их движений только в радиальных плоскостях. Эти допущения, обоснованные в главе 2.4, могут быть препятствием для корректного описания работы некоторых белковых и низкомолекулярных модуляторов микротрубочек, а также не позволяют описывать эффекты крутильных и изгибных деформаций микротрубочек на их динамическое поведение. Кроме того, модель в явном виде не учитывает движения свободных тубулиновых димеров и олигомеров в растворе, что не позволяет рассматривать процесс нуклеации микротрубочек и ограничивает возможности описания работы белков, катализирующих ускоренное присоединение тубулинов к концам микротрубочек из раствора. Создание и анализ более сложной модели, включающей пока не учтенные степени свободы, представляется автору диссертации важным этапом развития работы в будущих исследованиях.

По-прежнему остаются не ясны принципы сопряжения концов микротрубочек и хромосом в клетках более сложных, чем дрожжи, организмов, например, в клетках животных. В литературе есть указания на то, что у животных ключевые белки, осуществляющие прикрепление хромосом к микротрубочкам, имеют не кольцевую, а фибриллярную структуру [Ustinov et al., 2020]. В рамках данной работы был детально

исследован один из жизненно важных фибриллярных компонентов кинетохора, кинезин CENP-E [Gudimchuk et al., 2013], [Vitre et al., 2014], [Gudimchuk et al., 2018]. Впервые обнаружена его способность напрямую опосредовать закрепление к концам полимеризующихся и деполимеризующихся микротрубочек. Установлены молекулярные характеристики взаимодействия кинезина CENP-E с микротрубочками. Построена и экспериментально подтверждена физическая модель его закрепления за динамические концы микротрубочек. Эти результаты вносят вклад в понимание фундаментальных механизмов взаимодействия хромосом и микротрубочек во время митотического деления клеток высших эукариот.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1) С помощью метода броуновской динамики и динамического метода Монте-Карло разработана модель конца микротрубочек, на основе которой предложен механизм их сборки и переключения между фазами сборки и разборки.

2) Изогнутые протофиламенты являются общей структурной особенностью микротрубочек при как при их разборке, так и при сборке в различных организмах от дрожжей до животных, а также в широком диапазоне экспериментальных условий в очищенных системах *in vitro*.

3) Димеры и продольно связанные олигомеры тубулина имеют изогнутую конформацию независимо от связанного с ними нуклеотида. Гидролиз ГТФ повышает изгибную жесткость интерфейса между димерами тубулина.

4) Гибкие неструктурированные С-концевые цепочки α -тубулинов взаимодействуют с продольными полимеризационными интерфейсами димеров тубулина и могут модулировать динамику сборки микротрубочки

5) Микротрубочки, работая как молекулярные машины с КПД около 37% при разборке и около 15% при сборке, способны в процессе деполимеризации развивать силы порядка 30 пН в присутствии кольцевого сопрягающего устройства. Необходимым условием для эффективного

развития силы при деполимеризации микротрубочек является наличие существенного активационного барьера латеральных связей между тубулиновыми протофиламентами.

6) Кинетохорный кинезин CENP-E способствуют закреплению хромосом и других микрогрузов за концы полимеризующихся и деполимеризующихся микротрубочек благодаря совместной работе его моторного и хвостового доменов.

7) Полученные данные обобщены в виде многомасштабной функциональной модели, на основе которой сформулированы новые гипотезы о механизмах регуляции работы микротрубочек белками семейства EB, TOG-полимеразой XMAP215, кинезином MCAK и статмином и о механизмах воздействия на динамику микротрубочек ряда низкомолекулярных ингибиторов, включая таксол, винбластин, колхицин, а также выдвинуты предположения о возможных механизмах динамического закрепления хромосом за концы микротрубочек во время митоза.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Brouhard, G.J., Stear, J.H., Noetzel, T.L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S.C., Howard, J., and Hyman, A.A. (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* 132, 79–88.

Mitchison, T., & Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991), 237-242.

Chrétien, D., Fuller, S.D., and Karsenti, E. (1995). Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J. Cell Biol.* 129, 1311–1328.

Grishchuk, E.L., Molodtsov, M.I., Ataulakhanov, F.I., and McIntosh, J.R. (2005). Force production by disassembling microtubules. *Nature* 438, 384–388.

Janson, M.E., and Dogterom, M. (2004). Scaling of microtubule force-velocity curves obtained at different tubulin concentrations. *Phys. Rev. Lett.* 92, 248101.

Strothman, C., Farmer, V., Arpağ, G., Rodgers, N., Podolski, M., Norris, S., Ohi, R., and Zanic, M. (2019). Microtubule minus-end stability is dictated by the tubulin off-rate. *J. Cell Biol.* 218, 2841–2853.

Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., and Salmon, E.D. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* 107, 1437–1448.

**ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В
РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ, ИНДЕКСИРУЕМЫХ В
БАЗАХ ДАННЫХ WEB OF SCIENCE (WOS), SCOPUS, RSCI**

1. **Gudimchuk, N. B.**, and J. R. McIntosh. Regulation of Microtubule Dynamics, Mechanics and Function through the Growing Tip. // Nature Reviews Molecular Cell Biology, -2021. –V. 22. -Issue. 12, -P. 777–795. DOI: 10.1038/s41580-021-00399-x. Импакт-фактор 94.444 (JCR).
2. Vartanova, A.E., Plodukhin, A.Yu., Ratmanova, N.K., Andreev, I.A., Anisimov, M.N., **Gudimchuk, N.B.**, Rybakov, V.B., Levina, I.I., Ivanova, O.A., Trushkov, I.V., Alabugin I. V. Expanding Stereoelectronic Limits of Endo-Tet Cyclizations: Synthesis of Benz[b]Azepines from Donor–Acceptor Cyclopropanes. //Journal of the American Chemical Society. -2021. –V. 143. -Issue. 34, -P. 13952–13961. DOI: 10.1021/jacs.1c07088. Импакт-фактор 15.419 (JCR).
3. Chen, J., Kholina, E., Szyk, A., Fedorov, V. A., Kovalenko, I., **Gudimchuk, N.**, & Roll-Mecak, A. α -tubulin tail modifications regulate microtubule stability through selective effector recruitment, not changes in intrinsic polymer dynamics. // Developmental Cell. -2021. –V. 56, -Issue 14. –P. 2016–2028. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.05.005. Импакт-фактор 12.270 (JCR).
4. Ulyanov, E. V., Vinogradov, D. S., McIntosh, J. R., **Gudimchuk, N. B.** Brownian dynamics simulation of protofilament relaxation during rapid freezing. // Plos one. -2021. –V. 16. –Issue 2. –Article # e0247022. DOI: 10.1371/journal.pone.0247022. Импакт-фактор 3.240 (JCR).
5. **Gudimchuk, N.B.**, Ulyanov, E.V., O’Toole, E., Page, C.L., Vinogradov, D.S., Morgan, G., Li, G., Moore, J.K., Szczesna, E., Roll-Mecak, A., Ataulakhanov, F.I., Richard McIntosh, J. Mechanisms of microtubule dynamics and force generation examined with computational modeling and electron cryotomography. // Nature Communications. -2020. -Issue 11. –Article # 3765. DOI: 10.1038/s41467-020-17553-2. Импакт-фактор 14.919 (JCR).
6. Ustinov N. B., Korshunova A. V., and **Gudimchuk N.B.** Protein Complex NDC80: Properties, Functions, and Possible Role in Pathophysiology of Cell Division // Biochemistry (Moscow), -2020. –V. 85. -Issue 4, -P. 448–462. DOI: 10.1134/S0006297920040057. Импакт-фактор 2.487 (JCR).
7. Fedorov V.A., Orekhov P.S., Kholina E.G., Zhmurov A.A., Ataulakhanov F.I., Kovalenko I.B., and **Gudimchuk N.B.** Mechanical properties of tubulin intra- and inter-dimer interfaces and their implications for microtubule dynamic instability. // PLoS Comput. Biol., -2019, -V.15. –Issue 8. –Article # e1007327. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007327. Импакт-фактор 4.475 (JCR).
8. Mustyatsa V.V., Kostarev A.V., Tvorogova A.V., Ataulakhanov F.I., **Gudimchuk N.B.**, Vorobjev I.A. Fine structure and dynamics of EB3 binding zones on microtubules in fibroblast cells. // Mol. Biol. Cell. -2019. -V. 30. -Issue 17, -P. 2105–2114. DOI: 10.1091/mbc.E18-11-0723. Импакт-фактор 4.138 (JCR).

9. **Gudimchuk N.**, Roll-Mecak A. Watching microtubules grow one tubulin at a time // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. -2019. -V. 116. -Issue 15, -P. 7163-7165. DOI: 10.1073/pnas.1902991116. Импакт-фактор 11.205 (JCR).
10. McIntosh, J.R., O'Toole, E., Morgan, G., Austin, J., Ulyanov, E., Ataulakhanov, F., **Gudimchuk, N.** Microtubules grow by the addition of bent guanosine triphosphate tubulin to the tips of curved protofilaments. // J. Cell. Biol. -2018, -V. 217. -Issue 8 –P. 2691-2708. DOI: 10.1083/jcb.201802138. Импакт-фактор 10.539 (JCR).
11. **Gudimchuk, N.**, Tarasovets, E.V., Mustyatsa, V., Drobyshev, A.L., Vitre, B., Cleveland, D.W., Ataulakhanov, F.I., Grishchuk, E.L., // Probing Mitotic CENP-E Kinesin with the Tethered Cargo Motion Assay and Laser Tweezers. Biophys. J., -2018. -V. 114. -Issue 11. –P. 2640–2652. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.04.017. Импакт-фактор 4.033 (JCR).
12. Mustyatsa V.V., Boyakhchyan A.V., Ataulakhanov F.I., **Gudimchuk N.B.** EB-family proteins: Functions and microtubule interaction mechanisms // Biochemistry (Moscow), -2017. –V. 82. Issue 7. –P. 791-802. DOI: 10.1134/S0006297917070045. Импакт-фактор 2.487 (JCR).
13. П.Н. Захаров, В. К. Аржаник, Е. В. Ульянов, **Н. Б. Гудимчук**, Ф. И. Атауллаханов, Микротрубочка — динамически нестабильный биополимер со спонтанными переключениями между фазовыми состояниями // Успехи Физических Наук -2016 –Т. 186. № 8. Стр. 853–868. DOI: 10.3367/UFNr.2016.04.037779. Импакт-фактор 3.361 (JCR).
14. Zakharov, P.; **Gudimchuk, N.**; Voevodin, V.; Tikhonravov; A., Ataulakhanov, F. I.; Grishchuk E. L. Molecular and Mechanical Causes of Microtubule Catastrophe and Aging // Biophys. J., -2015. -V. 109. -Issue 12. -P. 2574–2591. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.10.048. Импакт-фактор 4.033 (JCR).
15. Vitre, B.; **Gudimchuk, N.**; Borda, R; Kim, Y.; Heuser, J. E.; Cleveland, D. W.; and Grishchuk, E. L Kinetochore–microtubule attachment throughout mitosis potentiated by the elongated stalk of the kinetochore kinesin CENP-E // Mol. Biol. Cell -2014 -V. 25, -Issue 15. -P 2272–2281. DOI: 10.1091/mbc.e14-01-0698. Импакт-фактор 4.138 (JCR).
16. **Gudimchuk, N**; Vitre, B; Kim, Y; Kiyatkin, A; Cleveland, DW; Ataulakhanov, FI; Grishchuk, EL. Kinetochore kinesin CENP-E is a processive bi-directional tracker of dynamic microtubule tips // Nature Cell Biology. -2013. –V. 15. -Issue 9. –P. 1079–1088. DOI: 10.1038/ncb2831. Импакт-фактор 28.824 (JCR).
17. Volkov, VA; Zaytsev, AV; **Gudimchuk, N**; Grissom, PM; Gintsburg, AL; Ataulakhanov, FI; McIntosh, JR; Grishchuk, EL. Long tethers provide high-force coupling of the Dam1 ring to shortening microtubules // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. -2013. –V. 110. -Issue 19. –P. 7708–7713. DOI: 10.1073/pnas.1305821110. Импакт-фактор 11.205 (JCR).
18. Grishchuk, E.L.; Efremov, A.K.; Volkov, V.A.; Spiridonov, I.S.; **Gudimchuk, N.**; Westermann, S.; Drubin, D.; Barnes, G., McIntosh, J.R.; and Ataulakhanov, F.I. The Dam1 ring binds microtubules strongly enough to be a processive as well as energy-efficient coupler for chromosome motion // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. -2008. –V.

105. -Issue 40. -P. 15423–15428. DOI: 10.1073/pnas.0807859105. Импакт-фактор 11.205 (JCR).

**ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В
РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ, ИНДЕКСИРУЕМЫХ
В БАЗЕ ДАННЫХ РИНЦ**

19. Fedorov, V. A., Kholina, E. G., Kovalenko, I. B., **Gudimchuk, N. B.**, Orekhov, P. S., Zhmurov, A. A. Update on Performance Analysis of Different Computational Architectures: Molecular Dynamics in Application to Protein-Protein Interactions. // Supercomputing Frontiers and Innovations, -2021. -V. 7. -Issue 4. -P. 62-67. DOI: 10.14529/jsfi200405. Импакт-фактор 1.722 (РИНЦ).

20. И. Б. Коваленко, В. Д. Древаль, В. А. Федоров, Е. Г. Холина, **Н. Б. Гудимчук**. Описание изгибов протофиламентов микротрубочек // Компьютерные исследования и моделирование, -2020. –Т. 12, № 2, с. 435-443. DOI: 10.20537/2076-7633-2020-12-2-435-443. Импакт-фактор 1.480 (РИНЦ).

21. Коршунова А.В., Лопанская Ю.Н., **Гудимчук Н.Б.** - Современные подходы к анализу взаимодействия белков и лигандов (обзор) // Биофизика -2019, -Т.64, №4, Стр. 629–645. DOI: 10.1134/S0006350919040079. Импакт-фактор 1.255 (РИНЦ).

22. Orekhov P.S., Kirillov I.V., Fedorov V.A., Kovalenko I.B., **Gudimchuk N.B.**, Zhmurov A.A. Parametrization of the elastic network model using high-throughput parallel molecular dynamics simulations // Supercomput Front Innov -2019. -V. 6, - Issue 1. –P. 19-22. DOI: 10.14529/jsfi190104. Импакт-фактор 1.722 (РИНЦ).

23. Fedorov, V.A., Kholina E.G., Kovalenko I.B., **Gudimchuk, N.B.** Performance analysis of different computational architectures: molecular dynamics in application to protein assemblies, illustrated by microtubule and electron transfer proteins. // Supercomput Front Innov, -2018, -V. 5, -Issue 4, -P. 111-114. DOI: 10.14529/jsfi180414. Импакт-фактор 1.722 (РИНЦ).

24. Ю.А. Румянцев, П.Н. Захаров, Н.А. Абрашитова, А.В. Шматок, В.О. Рыжих, **Н.Б. Гудимчук**, Ф.И. Атауллаханов. Применение ПЛИС для расчета деполимеризации микротрубочки методом броуновской динамики // Труды Института системного программирования РАН. -2016. –Т. 28. №3. Стр. 241-266. DOI: 10.15514/ISPRAS-2016-28(3)-15. Импакт-фактор 0.484 (РИНЦ).