

УДК 577.3, 576.3

БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС NDC80: СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ПАТОФИЗИОЛОГИИ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ

Обзор

© 2020 Н.Б. Устинов¹, А.В. Коршунова^{1,2}, Н.Б. Гудимчук^{1,2*}

¹ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: gudimchuk@phys.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
физический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.01.2020

После доработки 02.03.2020

Принята к публикации 02.03.2020

Митотическое деление поддерживает генетическую идентичность любого многоклеточного организма начиная с дробления зиготы и на протяжении всей жизни. Равномерное распределение хромосомного материала между дочерними клетками всякий раз обеспечивает веретено деления, которое формируется во время митоза из микротрубочек – динамических полимеров белка тубулина. Микротрубочки закрепляются своими концами за специализированный суперкомплекс белков на хромосомах, называемый кинетохором. Настоящий обзор посвящен одному из наиболее важных элементов кинетохора, 4-субъединичному комплексу NDC80, который играет главную роль в прикреплении собирающихся и разбирающихся концов микротрубочек к хромосомам. Систематизированы литературные данные о структуре, свойствах и известных механизмах регуляции работы комплекса NDC80 в живых клетках; также обсуждаются работы, рассматривающие изменения нормальной экспрессии генов комплекса NDC80 в контексте нарушений клеточного деления и онкогенеза. Обращается внимание на диагностический и терапевтический потенциал этого белкового комплекса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митоз, веретено деления, микротрубочки, кинетохор, фосфорегуляция, ингибирование митоза, NDC80, антимиототики.

DOI: 10.31857/S0320972520040053

Митотическое деление – решающее событие в жизненном цикле любой эукариотической клетки. От того, насколько успешно оно завершится, зависит не только судьба ее прямых потомков, но и, в конечном счете, генетическая идентичность всего многоклеточного организма. Хромосомы равномерно распределяются между дочерними клетками в результате точной работы митотического аппарата клетки, в основе которого лежит так называемое веретено деления [1]. Оно формируется в прометафазе митоза из микротрубочек – протяженных полимеров белков α - и β -тубулина [2, 3] (рис. 1). Эти динамические структуры присоединяются своими растущими (+)-концами к центромерным участкам реплицированных хромосом [4] и обеспечивают при своей дальнейшей разборке правильное расхождение сестринских хроматид в анафазе митоза

[5]. Площадками для прикрепления микротрубочек к хроматидам служат кинетохорные комплексы [6], включающие 50–60 различных белков у почкующихся дрожжей [7, 8] и >100 у высших эукариот, включая человека [9, 10].

Среди кинетохорных белков, отвечающих за прикрепление к микротрубочкам, центральную роль играет комплекс NDC80. Будучи компонентом т.н. KMN-сети (KNL1/MIND(Mis12)/NDC80) [11], он участвует в сборке митотического веретена и прохождении соответствующей контрольной точки [12].

Комплекс NDC80 обнаружен в кинетохорах большинства эукариот, включая царства грибов, растений и животных. У дрожжей кинетохоры устроены проще и более приспособлены к взаимодействию с малым количеством микротрубочек. По имеющимся оценкам, каждый дрожжевой кинетохор имеет в своем составе 5–10 копий комплексов NDC80 [13, 14]. Кинетохоры животных организованы сложнее: они оптимизированы для транспорта хромосом на большие

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотные остатки.

* Адресат для корреспонденции.

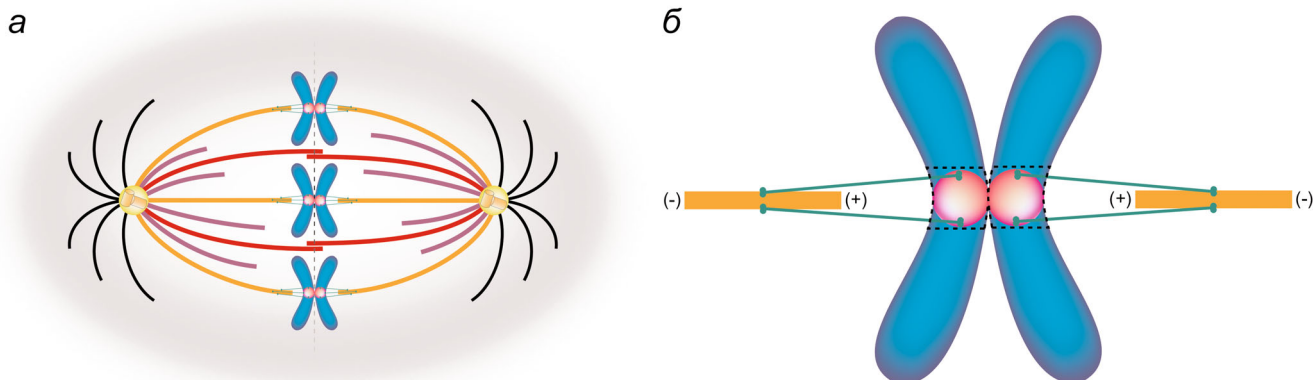


Рис. 1. Комплекс NDC80 опосредует взаимодействие микротрубочек с хромосомами во время митоза: *a* – схема веретена деления; *б* – биориентированное закрепление хромосомы за микротрубочки. Показаны микротрубочки, хромосомы и кинетохоры (в виде кружков на хромосомах). Для пары кинетохорных микротрубочек, прикрепленных к сестринским хроматидам, отмечены (–) и (+)-концы. Штриховая линия обозначает плоскость метафазной пластинки, а замкнутые штриховые контуры очерчивают центромерные участки хромосом, куда прикрепляются кинетохоры. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

расстояния, и, как правило, связываются со множеством микротрубочек одновременно. На каждом кинетохоре человека в норме находится ~ 240 копий комплексов NDC80 [15], что соответствует ~ от 14 до 20 молекул этого комплекса на каждую связанную с кинетохором микротрубочку [15, 16]. Увеличение числа молекул NDC80 коррелирует с неправильным распределением сестринских хроматид в ходе митоза и образованием анеуплоидных клеток со склонностью к злокачественной пролиферации [17].

Центральная роль NDC80 в клеточном делении и многочисленные указания на корреляцию нарушений экспрессии его генов [18–22] с развитием опухолей делают этот комплекс потенциальной мишенью для разработки антимитотических противораковых лекарств нового поколения. Несмотря на ряд попыток, к нему до сих пор не подобрано ни одного лиганда с приемлемым сродством и очевидным терапевтическим потенциалом. Возможно, что детальный анализ структуры, партнеров по связыванию и функционального состояния NDC80, которому посвящен наш обзор, поможет уточнить тактику и стратегию дальнейшего поиска подобных препаратов.

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА NDC80

Субъединичная и доменная архитектура. Комплекс NDC80 представляет собой гетеротетрамер, состоящий из четырех субъединиц – Hec1 (Ndc80 у дрожжей), Nuf2, Spc24 и Spc25 [23] (рис. 2). Интерфейс его взаимодействия с

микротрубочкой представлен доменами Hec1 и Nuf2 [24–27]; за прикрепление NDC80 к белкам внутреннего кинетохора отвечают Spc24 и Spc25 [24, 28, 29]. Hec1 и Nuf2 соединяются в гетеродимер за счет суперспирализации С-концевых [23, 26], а Spc24 и Spc25 – N-концевых фрагментов [23, 26, 30]. При этом С-конец Hec1 (Ndc80) выдается на ~ 80 а.о. относительно С-конца Nuf2, а N-конец Spc24 – на ~ 20 а.о. по сравнению с N-концом Spc25 [23], что позволяет субкомплексам Hec1(Ndc80)/Nuf2 и Spc24/Spc25 соединиться и образовать полнофункциональный комплекс NDC80 [23, 31]. В результате сборки образуется суперспираль длиной ~ 515 Å с участком 4-х α-спиралей протяженностью 20 а.о. (~ 3 гептадных повторов) на стыке субкомплексов Hec1(Ndc80)/Nuf2 и Spc24/Spc25 [23, 31]. Глобулярные головки, на долю которых приходится 10% общей длины комплекса, окаймляют этот фибриллярный стержень с обоих концов.

С-концевые домены Spc24 и Spc25 формируют со стороны кинетохора структуру с псевдосимметрией 2-го порядка [30]. С противоположного конца суперспирали располагается Hec1(Ndc80)/Nuf2-модуль, образованный N-концевыми кальпонин-гомологичными доменами обеих субъединиц. Структурно каждый такой домен представлен шестью α-спиралями (α1–α6) [30]. Кальпонин-гомологичный домен в составе Hec1(Ndc80)-субъединицы отделен от фибриллярного продолжения шпилькой α-спиралей [31]. Похожие домены также присутствуют в белках семейства EB, связывающихся с растущими концами [32].

Конформационная подвижность и ее предпосылки. В структуре Spc24/Spc25 суперспирализованные фрагменты соединены с С-концевыми доменами слабо структурированными перемичками. У Spc24 такая перемичка образована а.о. со 126-го по 157-й, а у Spc25 – со 117-го по 133-й [30]. Поскольку участки полипептидных цепей богаты пролинами и глицинами, предполагается, что они образуют относительно гибкий «шарнир» между глобулярным Spc24/Spc25-модулем и фибриллярным стержнем комплекса NDC80. Аналогично «головка» Hec1(Ndc80)/Nuf2-гетеродимера может отклоняться на 30° от оси суперспирали [31].

Помимо всего прочего, глобулярные участки Hec1(Ndc80)/Nuf2- и Spc24/Spc25-гетеродимеров способны менять взаимную ориентацию за счет гибкости самого фибриллярного стержня, которую придает ему выпетливание в С-концевом фрагменте Hec1 между связывающим микротрубочки Hec1(Ndc80)/Nuf2-модулем и местом стыка двойных суперспиралей от разных субкомплексов (рис. 2). Петля включает 50–100 а.о., не вовлеченных в суперспирализацию, 10 из которых, предположительно, образуют β-тяж [26, 33]. По данным электронной микроскопии с негативным контрастированием об-

разцов, в точке излома фибриллярный стержень может сгибаться на угол от 0 до 120° и скручиваться вдоль своей оси на 90° в обе стороны [33].

Гибкая петля NDC80 образует дополнительный интерфейс для связывания других белков и их комплексов (Ska1-3, Cdt1 и т. д.) [34–37]. Так, например, у почкующихся дрожжей она участвует в правильном позиционировании комплекса NDC80 не на латеральной поверхности микротрубочки, а на ее (+)-конце за счет взаимодействия петли и DASH-комплекса [38]. Кроме того, наличие петли придает жесткому фибриллярному стержню способность изгибаться, что может быть важно в работе кинетохора. Так, у почкующихся дрожжей расстояние между N-концом Ndc80 и С-концом Spc24 меняется в разные фазы митоза [39]. В метафазе оно составляет 55 нм, что примерно соответствует полной длине комплекса. Впрочем, 15 из этих 55 нм приходится на неструктурированный N-концевой «хвост» Ndc80 (113 а.о.), после удаления (Δ 113-Ndc80) которого проекция того же расстояния на ось взаимодействия между кинетохором и микротрубочкой составляет уже 40 нм [14]. В поздней анафазе (при расхождении полюсов) расстояние между субъединицами Ndc80 и Spc24 сокращается до 35 нм, учитывая нест-

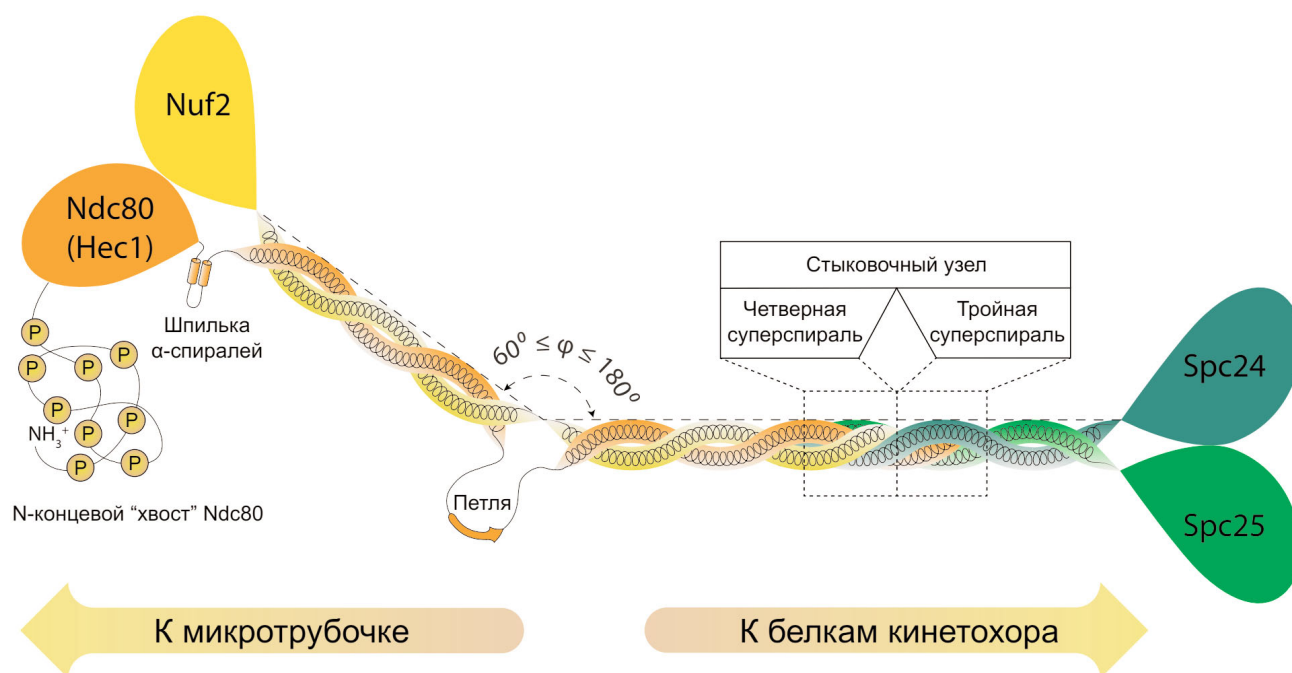


Рис. 2. Субъединичная/доменная архитектура и конформационная подвижность комплекса NDC80. Ключевые структурные элементы NDC80 подписаны непосредственно на рисунке. Сайты фосфорилирования в N-концевом «хвосте» Ndc80-субъединицы показаны кружками. Диапазон значений угла φ демонстрирует, в каких пределах фибриллярный стержень NDC80 способен изгибаться в плоскости рисунка.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

руктурированный хвост, что косвенно свидетельствует о переходе NDC80 из выпрямленной в изогнутую конформацию. Все это указывает на то, что комплекс выпрямляется под действием сил натяжения, которые возникают в метафазе [39]. Эксперименты по фёрстеровскому резонансному переносу энергии *in vitro* обнаружили еще одну, экстремально изогнутую конформацию NDC80 [40]. Предполагается, что конформация и степень изогнутости NDC80 влияют на доступность сайтов фосфорилирования комплекса для киназы Aurora B, что позволяет проводить проверку правильности сборки веретена деления [41].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА NDC80 С МИКРОТРУБОЧКОЙ

Роль глобулярных доменов Hec1(Ndc80) и Nuf2. Как уже было отмечено, ключевую роль в связывании комплекса NDC80 с (+)-концами микротрубочек играет глобулярный Hec1(Ndc80)/Nuf2-модуль. Комплекс NDC80 сохраняет способность к взаимодействию с микротрубочками вне зависимости от наличия Spc24/Spc25-«головки» и длины суперспирального фрагмента. Так, рекомбинантному белковому комплексу NDC80^{bonsai}, в котором первые 286 а.о. Ndc80 слиты с последними 107 а.о. Spc25, а первые 169 а.о. Nuf2 – с последними 76 а.о. Spc24, укороченный в 7 раз фибриллярный стержень насколько не мешает связываться с микротрубочками *in vitro* [26]. То же касается изолированного гетеродимера Ndc80/Nuf2 – как полноразмерного [25], так и с частично обрезанными C-концевыми суперспирализованными участками (Ndc80-Δ135/Nuf2-Δ112 или «Broccoli») [40].

Аминокислотные остатки, формирующие интерфейс взаимодействия комплекса NDC80 с микротрубочкой, кластеризуются в двух положительно заряженных островках на поверхности глобулярного Hec1(Ndc80)/Nuf2-модуля (рис. 3). Эксперименты *in vitro* с человеческим NDC80^{bonsai} показали, что наибольший вклад в связывание вносят 3 остатка лизина – K89 и K166 в Ndc80-субъединице, а также K115 в Nuf2-субъединице [26]. При замене любого из них остатками глутаминовой кислоты или аланина константа диссоциации увеличивается в 30–50 или ~ 6 раз соответственно. Таким образом, инверсия заряда сильнее, чем его обнуление, влияет на присоединение комплекса к микротрубочке, что указывает на существенный вклад электростатических взаимодействий в связывание. Интерфейс взаимодействия Hec1(Ndc80)/Nuf2-модуля с микротрубочкой не

ограничивается тремя упомянутыми остатками лизина. Так, мутации K146E и K156E в Ndc80, а также K33E и K41E в Nuf2 умеренно (в 6–12 раз) ухудшают связывание человеческого NDC80^{bonsai} с микротрубочками *in vitro*. Наконец, чуть слабее влияют на связывание с микротрубочкой замены K123A, H176A в Ndc80 и K29A, N39A в Nuf2 [26].

Ключевая роль остатков лизина, существенно влияющих на константу диссоциации комплекса NDC80 от микротрубочки *in vitro*, отчасти подтверждается и наблюдениями *in vivo*. В живых клетках аналогичные вышеперечисленным мутации в белке Hec1 действительно приводят к существенным нарушениям в протекании митоза. В частности, мутация Hec1^{K166D} ведет к уменьшению вероятности формирования метафазной пластинки в 15 раз [27]. О количестве контактов между микротрубочкой и кинетохором можно также судить по числу стабилизированных данными контактами микротрубочек, которые не деполимеризуются при холодной обработке. Таких микротрубочек, а значит, и контактов между ними и кинетохорами становится меньше, если в белке Ndc80 присутствуют мутации [27].

Что касается глобулярного домена белка Nuf2, то точечная инверсия заряда в нем в положениях K33, K41 и даже K115 (в отличие от экспериментов *in vitro*), практически не препятствует выравниванию метафазных хромосом в экспериментах *in vivo*. Для единичных замен (мутанты Nuf2^{K33D}, Nuf2^{K41D} и Nuf2^{K115D}) наблюдается лишь задержка клетки в метафазе на 47, 21 и 42% дольше нормы, соответственно. При введении двойных и тройных мутаций (Nuf2^{K33D/K41D} и Nuf2^{K33D/K41D/K115D}) доля клеток со сформированной метафазной пластинкой падает с 56 до 25% [27]. Приведенные данные о роли мутаций в Nuf2 *in vivo* могут быть интерпретированы как указание на ограниченный вклад Nuf2-субъединицы в связывание с микротрубочками в клетках или же могут объясняться наличием механизмов компенсации эффектов точечных мутаций Nuf2 *in vivo*. Тем не менее, вырезание целого кальпонин-гомологичного домена белка Nuf2 (Δ142–Nuf2) полностью блокирует клетки в прометафазе [27]. Впрочем, неизвестно, влияет ли столь обширная делеция только на взаимодействие Nuf2 с микротрубочкой или еще и на конформацию соседней Ndc80-субъединицы – в частности, на ориентацию ее N-концевого «хвоста».

Роль N-концевого «хвоста» Hec1(Ndc80) в регуляции аффинности взаимодействия с микротрубочками. N-концевой «хвост» белка Hec1(Ndc80), аналог которого отсутствует в структуре белка

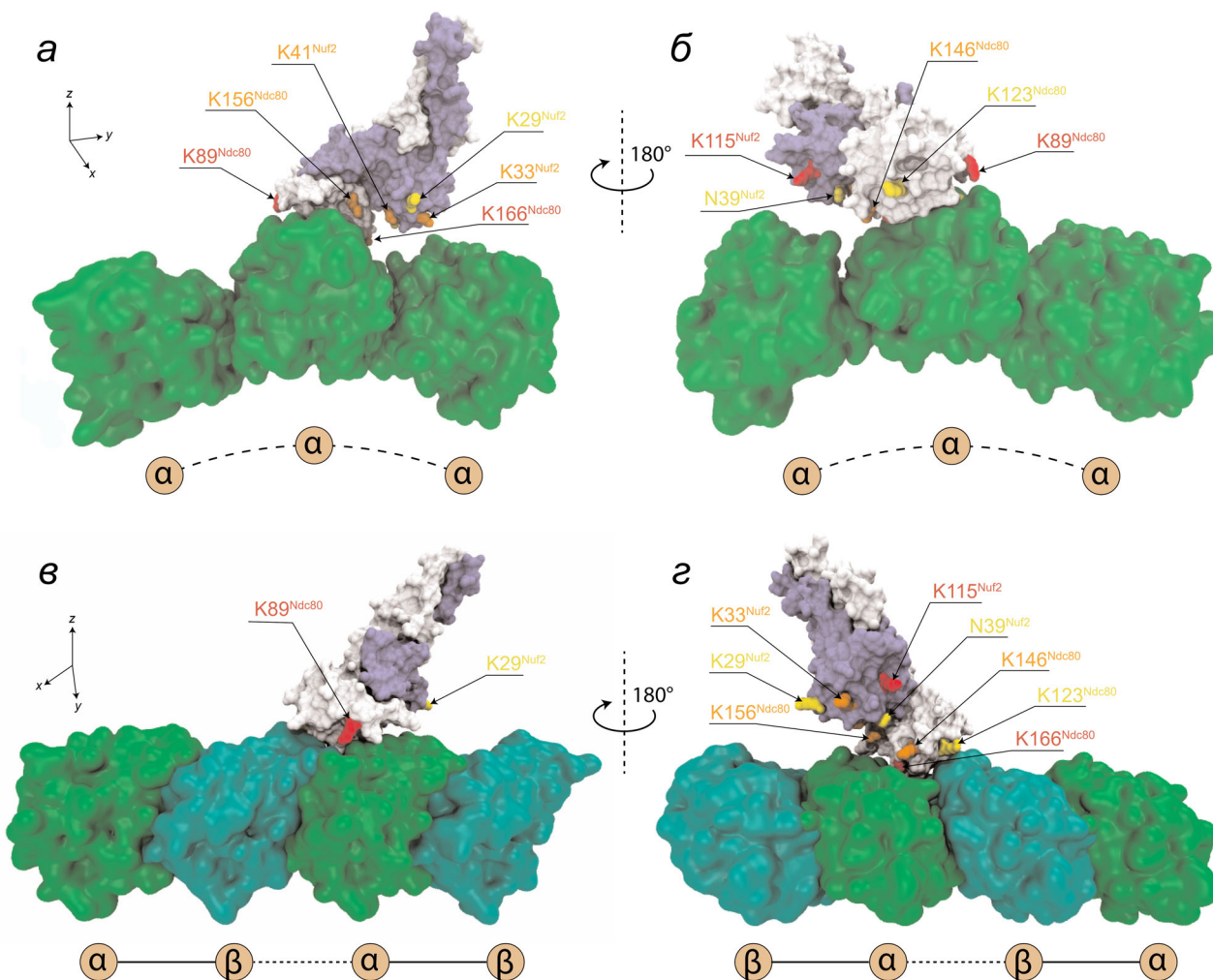


Рис. 3. Связывание глобулярного Hec1/Nuf2-модуля NDC80 с поверхностью микротрубочки: *a* – вид перпендикулярно оси микротрубочки; *b* – то же, с разворотом на 180° вокруг оси *z*; *v* – вид вдоль отдельного протофиламента; *z* – то же, с разворотом на 180° вокруг оси *z*. Результирующие структуры получены наложением pdb-структур 3IZ0 и 6JCS в программе молекулярной визуализации VMD (Иллинойский университет в Урбэне-Шампейне, США). Поперечный срез микротрубочки (*a* и *b*) ограничен тремя мономерами α -тубулина из смежных протофиламентов, а отдельный протофиламент (*v* и *z*) – двумя тубулиновыми α/β -димерами. Латеральные контакты между тубулиновыми мономерами обозначены штриховыми, а интра- и интердимерные продольные контакты – сплошными и пунктирными линиями, соответственно. Для наглядности показано связывание Hec1/Nuf2-головки: *a* и *b* – только с одним мономером α -тубулина; *v* и *z* – только на стыке между тубулиновыми α/β -димерами. Выделены отдельные а.о. Hec1 и Nuf2, сильно, умеренно и слабо вовлеченные во взаимодействие с тубулином.

С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Nuf2, дополнительно стабилизирует взаимодействие комплекса NDC80 с поверхностью микротрубочки [24–27, 42, 43]. Этот богатый лизинами фрагмент длиной 80 а.о. не имеет четкой структуры, что затрудняет исследование его трехмерной укладки при взаимодействии NDC80 комплекса с тубулинами в микротрубочке экспериментальным путем. Для остальной части белкового комплекса NDC80^{bonsai} удалось получить информацию о молекулярном строении с относительно неплохим разрешени-

ем [26]. Не исключено, что *N*-концевой хвост субъединицы Hec1 узнает такой же слабоструктурированный *C*-концевой фрагмент α - или β -тубулина [26, 43]. При повышении ионной силы раствора *N*-концевой «хвост» Hec1 отсоединяется от *C*-конца тубулина, несущего избыточный отрицательный заряд из-за множества остатков глутамата и аспартата, что иллюстрирует ключевую роль электростатических взаимодействий в таком узнавании [43]. Человеческие и дрожжевые мутанты, лишенные *N*-конце-

вого «хвоста» ($\Delta 80\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$ и $\Delta 80\text{-Ndc80/Nuf2}$, соответственно) *in vitro* связываются с микротрубочками на 1–2 порядка хуже, чем их полноразмерные прототипы [25, 26]. Эксперименты *in vivo* дают сходную картину: в клеточных линиях, продуцирующих укороченный вариант человеческого Hec1 ($\Delta 80\text{-Hec1}$), среднее количество микротрубочек, связанных с одним кинетохором, уменьшается с ожидаемых 19,5 до 2,8 [42]. Изолированный «хвост» человеческого Hec1 (Hec1(1–80)) и сам присоединяется к микротрубочке с $K_d \sim 0,64$ мкМ. Более длинный фрагмент Hec1, содержащий еще и кальпонин-гомологичный домен (Hec1(1–230)), связывается с ними чуть хуже ($K_d \sim 1,0$ мкМ), а кальпонин-гомологичный домен сам по себе (Hec1(81–230)) – крайне слабо [43].

N-концевой «хвост» человеческого Ndc80(Hec1) содержит 9 остатков серина/треонина (S4, S5, S8, S15, S44, T49, S55, S62 и S69), как минимум 7 из которых являются мишенями внутриклеточных Аугога-киназ A и B [24, 26, 44, 45]. Фосфорилирование этих а.о., которое нейтрализует положительный заряд «хвоста», сопряжено с отсоединением комплексов NDC80 от микротрубочки *in vitro* [11, 26] и с ослаблением контактов между микротрубочкой и кинетохором *in vivo* [46]. Аугога-киназа B, как и ее дрожжевой гомолог Ipl1 [47], динамически регулирует прочность этих контактов при переходе из одной фазы митоза в другую, редактируя профиль фосфорилирования NDC80 в тандеме с фосфатазой PP1 [48].

По имеющимся данным, пока веретено деления не сформировано, Hec1-«хвост» несет больше всего фосфатных групп (до 4-х в профазае и до 2-х в прометафазае) [46, 49, 50], из которых в метафазае остается максимум одна (S69-P), изначально вносимая Аугога-киназой A [45, 49]. Параллельно доля ассоциированного с микротрубочками комплекса NDC80 возрастает с 17% в прометафазае до 33% в метафазае [50]. Сами же микротрубочки с каждой следующей фазой деления всё менее активно перераспределяются между разными кинетохорами [24, 49], что также свидетельствует о большем сродстве дефосфорилированного NDC80 к полимеризованному тубулину.

Эксперименты с фосфомиметическими мутантами NDC80 подтверждают регуляторную роль Аугога-киназ в клетке и значимость модификаций, вносимых этими ферментами [24, 27, 42, 45, 49–54]. Одновременная замена всех 9 остатков серина и треонина на остатки аспарагиновой кислоты в человеческом Hec1 (9D-Hec1) в 10 раз ухудшает сродство NDC80 к микротрубочкам *in vitro* [54] и приводит к разбалансиров-

ке веретена деления *in vivo* [27, 42, 50]. Так, в клетках, продуцирующих 9D-Hec1, с (+)-концами микротрубочек ассоциировано всего 20% кинетохоров – примерно столько же, что и в случае «бесхвостого» мутанта $\Delta 80\text{-Hec1}$. В норме же к началу метафазы к 80% всех кинетохоров прикрепляется хотя бы одна микротрубочка [42]. Примечательно, что нефосфорилируемый мутант с беззарядными остатками аланина в тех же положениях (9A-Hec1) не снижает плотность контактов между микротрубочками и кинетохорами, хотя и не позволяет хромосомам выровняться по экватору делящейся клетки [42, 45]. Это согласуется с избыточной прочностью таких контактов в 9A-Hec1-продуцирующих клетках, где с микротрубочками ассоциировано в 1,7 раза больше комплексов, чем в случае Hec1 дикого типа [50].

In vitro белковые комплексы NDC80 с фосфомиметическими заменами только в 7 подтвержденных из 9 известных сайтов фосфорилирования ($7D\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$) в 3–5 раз хуже связываются с микротрубочками по сравнению с нативным комплексом [52, 53]. Так, в экспериментах с лазерной ловушкой кинетохорные частицы, содержащие фосфомиметический мутант $7D\text{-NDC80}$, могут удерживаться на концах микротрубочек под силой до 5,7 пН (при норме в 9,1 пН) [53]. В клетках, продуцирующих $7D\text{-NDC80}$, вероятность формирования метафазной пластинки падает в 5,8 раз [52]. Замена семи аминокислот в сайтах фосфорилирования на аланины ($7A\text{-NDC80}$) почти не влияет ни на сродство комплекса к микротрубочке, ни на устойчивость контактов между микротрубочками и кинетохорами к растяжению [53].

В опытах *in vitro* фосфомиметические мутации [51, 52], как и удаление 80 а.о. с *N*-конца Ndc80 (Hec1) [26], не только нарушают взаимодействие NDC80 с полимеризованным тубулином, но и дезорганизуют кластеризацию комплекса на поверхности микротрубочки, что было интерпретировано как указание на возможный кооперативный вклад Ndc80(Hec1)-«хвоста» в связывание. Согласно данным электронной микроскопии [52], при большой концентрации $\text{NDC80}^{\text{bonsai}}$ образует кластеры на микротрубочках. Если типичный $\text{NDC80}^{\text{bonsai}}$ -кластер содержит 3–6 молекул комплекса, то $3D\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$ и $4D\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$ образуют скопления по 2–3 молекулы [51], а $7D\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$ и $\Delta 80\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$ – не более 2 молекул [52]. Отсечение половины Hec1-«хвоста», на которую приходятся остатки S5, S8 и S15, а также S4 ($\Delta 40\text{-NDC80}^{\text{bonsai}}$), очень слабо влияет на средний размер кластера [52]. Благодаря этим наблюдениям (вместе со структурными реконструкциями)

возникла гипотеза о том, что две зоны в пределах «хвоста», разделенные богатым пролином линкером, по-разному регулируют посадку NDC80 на микротрубочку. Alushin et al. предложили зональную гипотезу, согласно которой участок, где сосредоточены а.о. S44, S55, и S69, а также T49 и S62 (зона 1, а.о. 44–69), в дефосфорилированном виде взаимодействует с подвижным отрицательно заряженным C-концом тубулина, а N-концевой фрагмент NDC80 слабо контактирует со смежной молекулой комплекса в кластере. Согласно их экспериментальным данным, фосфорилирование а.о. S5, S8, S15 и, возможно, S4 в зоне 2 (а.о. 4–15) дестабилизирует взаимодействия комплексов NDC80 друг с другом и сводит на нет кооперативность связывания этих комплексов с микротрубочкой [52]. В согласии с этой гипотезой, а.о. S8 и S15, в отличие от S44 и S55, действительно защищены от спонтанного рефосфорилирования по ходу митоза, что указывает на недоступность зоны 1 для Аутог-киназа после оформления контактов между микротрубочкой и кинетохором. Зона 2 в метафазе остается, напротив, открыта для многократного ре- и дефосфорилирования, что, предположительно, порождает хромосомные осцилляции *in vivo* [46].

В противоречии с зональной моделью Алушина находятся данные Zaytsev et al. [49, 54]. В этих работах последовательное введение всё большего числа фосфомиметических замен (от 1D-NDC80^{bonsai} (S8D) до 9D-NDC80^{bonsai}) *in vitro* постепенно ослабляло взаимодействие комплекса с микротрубочкой, но почти не влияло на прочность смежных NDC80-NDC80 контактов. Кооперативность связывания во всех случаях была настолько мала, что кластеризовалось лишь ~ 10% молекул комплекса, причем 8% связывались с микротрубочками в виде димеров. Поскольку в клетке на одну кинетохорную микротрубочку приходится не более 20 молекул NDC80 [15, 16], исследователи пришли к выводу, что кооперативные эффекты почти не вносят вклада в формирование контактов между микротрубочками и кинетохорами *in vivo*, а числом фосфатных групп в Ndc80(Hec1)-«хвосте» экспериментально регулируется только прочность этих отдельно взятых контактов [54].

Роль глобулярного Spc24/Spc25-модуля комплекса NDC80. Эффект автоингибирования. NDC80 может частично подавлять свое присоединение к микротрубочкам [11, 40]. Феномен автоингибирования связан с тем, что комплекс способен переходить в экстремально изогнутое состояние [40]. В такой конформации глобулярный Spc24/Spc25-модуль настолько сближается с Nuf2/Hec1-«головкой», что частично загора-

живает интерфейс ее контакта с поверхностью микротрубочки и ослабляет связывание. Так, дрожжевой белковый комплекс NDC80-«Broccoli» без Spc24/Spc25-модуля и части фибриллярного стержня (Ndc80-Δ135/Nuf2-Δ112) в 1,9 раза дольше остается связан с поверхностью микротрубочки, чем полноразмерный NDC80. Эксперименты с флуоресцентными метками на концах комплекса показали, что автоингибирование происходит за счет изгибания NDC80, а исчезновение сигнала Ферстеровского резонансного переноса энергии при делеции 30 а.о. (Δ490-510) в Ndc80-субъединице подтвердило участие шарнирной петли в таком изгибании [40].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА NDC80 С ДРУГИМИ КИНЕТОХОРНЫМИ БЕЛКАМИ

Кинетохорные рецепторы NDC80. Основную роль в присоединении комплекса NDC80 к кинетохору играет комплекс Mis12, гомолог которого у дрожжей носит название MIND (рис. 4, а, б). Комплекс MIND (Mis12) состоит из четырех субъединиц: Mtw1/Nnf1/Nsl1/Dsn1 [11, 29, 55]. Комплекс NDC80 присоединяется к нему за счет взаимодействия глобулярных доменов Spc24/Spc25 с субъединицами Nsl1/Dsn1 Mis12(MIND)-комплекса [28, 56]. У NDC80 интерфейс взаимодействия с MIND(Mis12)-комплексом формируют а.о. 136–213 и 116–221 в C-концевых доменах Spc24 и Spc25. Комплекс MIND (Mis12) соединяет NDC80 с белком KNL1 и с белком CENP-C у человека (Mif2 у дрожжей) [57, 58]. Последний непосредственно взаимодействуют с центромеро-специфическим гистоном CENP-A (Cse4 у дрожжей), определяющим локализацию всего кинетохора на хромосоме (рис. 4, а, б). На ключевую роль Mis12 в локализации комплекса NDC80 на кинетохорной пластинке указывают эксперименты с мутантами. Так, у дрожжей удаление Dsn1-субъединицы MIND-комплекса (Δdsn) является летальным [59]. Кроме того, нежизнеспособные мутанты возникают при изменении интерфейса взаимодействия путем внесения аминокислотных замен: Spc24^{L160D}, Spc25^{V159D} или Dsn1^{L562D/L563D}, Dsn1^{-Δ29} [29].

Интересно, что мутации, вносимые в Mis12, в клеточных линиях человека не всегда летальны, как в случае дрожжей. Нокаут человеческого Mis12, в отличие от дрожжевого MIND-комплекса, не фатален, хотя и чреват хромосомными дефектами и задержкой митоза из-за вчетверо меньшего количества NDC80 на кинетохоре [60]. Это свидетельствует о существовании

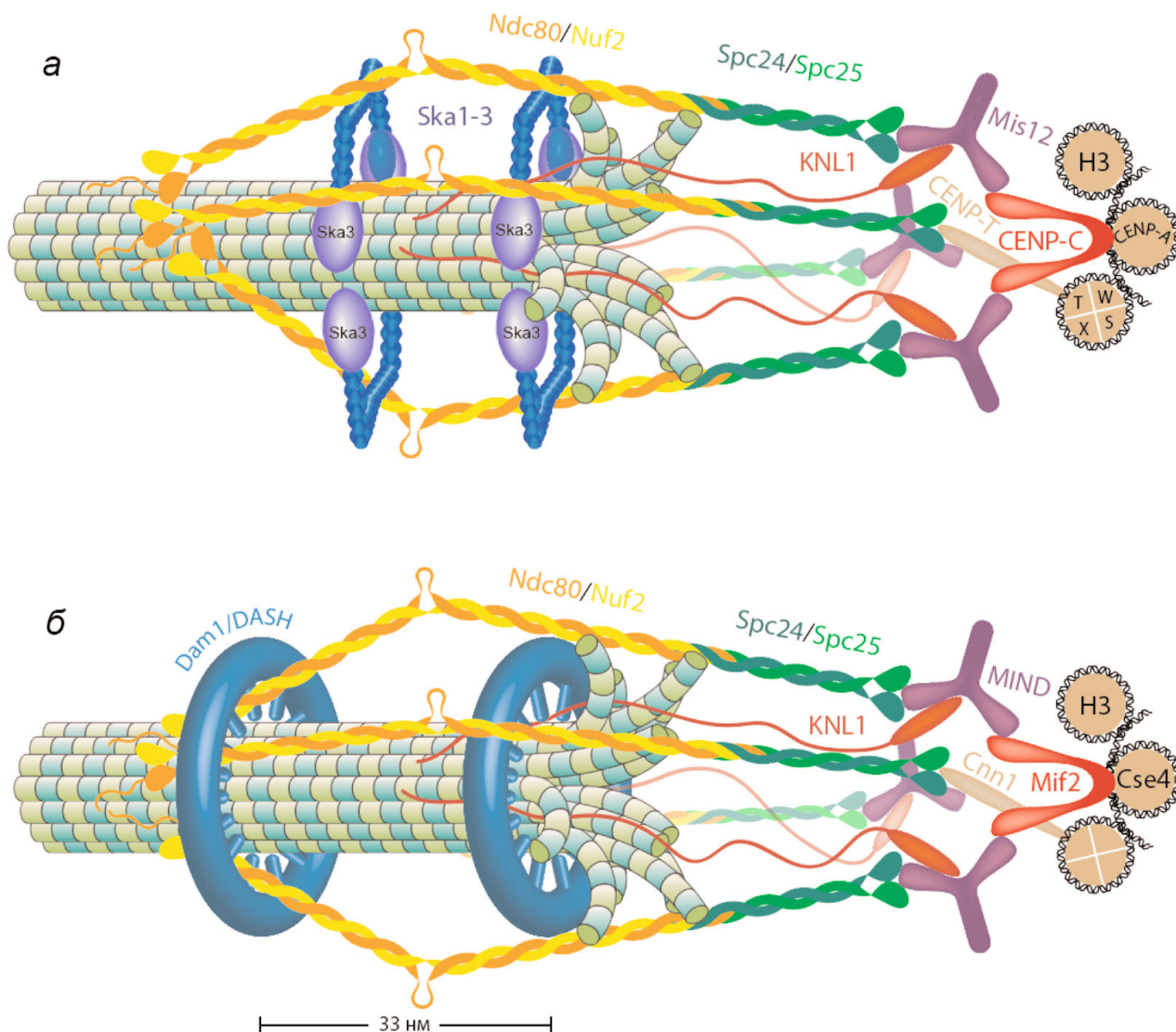


Рис. 4. Взаимодействие комплекса NDC80 с микротрубочками и белками кинетохора (схема): *a* – у высших эукариот; *б* – в почкующихся дрожжах (*S. cerevisiae*). Названия белков кинетохора подписаны на иллюстрации. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

компенсирующих или дополнительных механизмах связывания NDC80 с кинетохором. И действительно, у эукариот присутствует второй кинетохорный рецептор NDC80, который у человека называется CENP-T, а у дрожжей – Cnn1 [29, 61, 62] (рис. 4, *a*, *б*). Известно, что белок Cnn1 (CENP-T) связывается с NDC80 в таком же сайте, что и Dsn1-субъединица MIND-комплекса [29].

Распределение NDC80 между двумя кинетохорными рецепторами в клеточном цикле регулируется циклин-зависимыми (CDK), Aurora- и некоторыми другими киназами [29, 58]. Так, у *S. cerevisiae* замена в Cnn1 всех 16 известных сайтов фосфорилирования на остатки аланина (16A-Cnn1) резко увеличивает сродство этого

белка к NDC80 [29]. В результате мутантный белок 16A-Cnn1, в отличие от своего прототипа, начинает конкурировать с MIND-комплексом еще до сборки метафазной пластинки, когда связыванию нативного Cnn1 с NDC80 препятствует высокая активность митотических киназ Cdk1 и Mps1 [29, 63]. Из-за такого фальстарта NDC80/MIND-комплексы не успевают образоваться в нужном количестве к моменту сборки митотического веретена, что порождает хромосомные дефекты в 16A-Cnn1-продуцирующих дрожжевых клетках – в частности, неравномерное расхождение сестринских хроматид [29]. В отсутствие Cnn1 ($\Delta cnn1$) схожие дефекты проявляются ощутимо слабее [61, 62]. Поначалу считалось, что весь NDC80, который дополнитель-

но садится на кинетохор в анафазе ($\geq 50\%$ от уже связавшегося ранее) [64], присоединяется именно к Cnn1 [61, 62]. Однако ни делеция, ни дерегуляция (16A-Cnn1) этого белка, как выяснилось впоследствии, никак не влияют на постметафазную локализацию NDC80 [64], что ставит под вопрос значимость Cnn1 для сборки полнофункционального кинетохора в анафазе.

Впрочем, при дерегуляции основного рецептора MIND у *S. cerevisiae* Cnn1-зависимый путь посадки может стать решающим [65]. Так, тройная аланиновая замена в сайтах фосфорилирования Dsn1 субъединицы комплекса MIND киназами Ipl1- и Cdk1 сама по себе не снижает количество ассоциированных с кинетохором комплексов NDC80 [66], однако в сочетании с делецией $\Delta cnn1$ приводит к гибели дрожжевых клеток [65].

В человеческих клетках фосфорилирование CENP-T не препятствует, как у *S. cerevisiae*, а, напротив, способствует ранней посадке NDC80 на этот кинетохорный рецептор. Связывание происходит еще в G2-фазе клеточного цикла и длится до полного расхождения сестринских хроматид, несмотря на инактивацию CDK в анафазе, что указывает на возможный вклад дополнительных факторов в стабилизацию CENP-T/NDC80-комплексов после дефосфорилирования CENP-T [58]. Таким образом, у человека, в отличие от почкующихся дрожжей, контактов с CENP-C(Mif2)/Mis12(MIND) не хватает для первичной локализации NDC80 на кинетохоре. Это дополнительно подтверждается тем, что количество кинетохор-ассоциированного NDC80 снижается при нокауте CENP-T ~ в 3 раза [15]. Более того, на эктопических кинетохорах, которые собираются на нецентромерных последовательностях без участия CENP-A (варианта гистона H3), в отсутствие CENP-T локализуется ~10% NDC80 от нормы [58].

Сборка внешнего кинетохора характеризуется устойчивой стехиометрией. Показано, что *in vitro* CENP-C, Mis12 и NDC80 связываются в соотношении 1 : 1 : 1, зато на каждую молекулу фосфорилированного CENP-T садится три молекулы NDC80 — две в свободном виде и еще одна при участии всё того же Mis12. Фосфорилирование Cdk1-киназой остатков T11 и T85 в CENP-T отвечает за непосредственное, а остатка S201 — за Mis12-зависимое связывание NDC80 [67]. Подсчитано, что в HeLa-клетках на каждую молекулу CENP-C и CENP-T в среднем приходится ~ 0,4 и 2,0–2,2 ассоциированных молекул NDC80 соответственно [15]. Значимые отклонения от целочисленных стехиометрических соотношений, по всей вероятности, связаны с различиями в профилях фосфорилирова-

ния *in vitro* и *in vivo* и/или с частичным вытеснением NDC80 другими белками — в частности, HP1- α [55], — из комплекса с Mis12.

Медиаторы взаимодействия NDC80 с микротрубочками. NDC80 при взаимодействии с микротрубочками не обходится без партнеров, посредников и модуляторов из числа других кинетохорных белков. Некоторые из них и сами обладают способностью связываться с микротрубочками. К таким белкам, в частности, долгое время относили KNL1 (Spc105 у *S. cerevisiae*) — третий компонент KMN-сети наряду с NDC80 и MIND (Mis12) [11, 68, 69] (рис. 4, а, б). Как и NDC80-комплекс, KNL1 присоединяется к (+)-концам микротрубочек — во всяком случае, *in vitro* [11, 70]. KNL1 (Spc105) отчасти дублирует и смежные функции NDC80, упорядочивая белок-белковые взаимодействия внутри кинетохора [68, 69] и участвуя в успешном прохождении контрольной точки сборки веретена деления [70, 71].

Убедительных свидетельств тому, что NDC80 напрямую связывается с KNL1 после своей посадки на кинетохор, не найдено ни у дрожжей [56, 72], ни у человека [55], ни у нематод [11]. KNL1 и NDC80, вероятно, взаимодействуют через посредника, который узнает гибкую петлю NDC80, на что указывает 30–40%-ное снижение количества белков KNL1 на кинетохоре при нокауте NDC80 или частичном удалении этой петли (Ndc80^{A427-452}) [36]. У человека и других высших эукариот таким посредником, видимо, служит гетеротримерный (Ska1, Ska2, Ska3 (RAMA1)) Ska-комплекс [73], взаимодействующий как с NDC80, так и с KNL1 (рис. 4, а). В самом деле, он почти не локализуется на кинетохоре ни в отсутствие NDC80, ни в NDC80^{A427-452}-продуцирующих клетках [36]. Ранее предполагалось, что C-концевой неструктурированный фрагмент Ska3(RAMA1)-субъединицы (а.о. 102–412) узнает гибкую петлю NDC80, хотя, согласно современным представлениям, более вероятный вклад в связывание вносят жесткие участки фибриллярного стержня [74, 75]. Подобно самому NDC80, Ska-комплекс присоединяется к микротрубочкам *in vitro* [73, 76, 77] и *in vivo* [76, 77], а также следует за их деполимеризующимися (+)-концами [76], причем за непосредственное узнавание концов микротрубочки, вероятно, отвечает C-концевой домен Ska1-субъединицы [77], а за кооперативность связывания — Ska3(RAMA1)-субъединица [76]. При этом Ska-комплекс, в отличие от NDC80 [51], связывается не только с прямыми, но и с изогнутыми протофиламентами на (+)-концах микротрубочки [76, 77]. NDC80- и Ska-комплексы не связываются друг с другом в растворе, однако проявля-

ют синергию при взаимодействии с микротрубочками *in vitro* [74, 76]. Так, человеческий комплекс NDC80-«Broscoli», лишенный C-концевых доменов, повышает сродство Ska к микротрубочке до 5 раз, а полноразмерный NDC80 из *C. elegans* – вдвое. В отсутствие Ska связывание NDC80 с микротрубочками ухудшается почти в 40 раз [76]. Примечательно, что Ska-комплекс частично компенсирует удаление (Δ 80-NDC80) или дерегуляцию (9D-NDC80) N-концевого «хвоста» Hec1 [74,75]. Так, при внесении 9D-замены в аминокислотную последовательность N-конца белка Ndc80, сила отрыва комплекса NDC80 от микротрубочки уменьшается примерно на порядок, но добавление Ska вновь повышает ее в 5–6 раз [74]. Результирующий эффект такой замены *in vivo* должен состоять в двукратном ослаблении контактов между микротрубочкой и кинетохором, что интуитивно согласуется с уменьшением доли кинетохоров, прикрепленных хотя бы к одной микротрубочке, с 80% до 20% [42].

У дрожжей и других грибов ортологов Ska-комплекса не найдено; вместо него схожие функции выполняет Dam1/DASH-комплекс, включающий у *S. cerevisiae* 10 различных белков (Duo1, Dam1, Ask1, Spc19, Spc34, Hsk3 и Dad1-4) [78]. За присоединение этого комплекса к микротрубочке в основном отвечает Dam1-субъединица, о чем можно судить по сопоставимым значениям K_d для нее и цельного гетеродекамера [79]. В присутствии полимеризованного тубулина Dam1/DASH-комплекс олигомеризуется, по разным данным, с образованием 16-, 17- или, что менее вероятно, 25-членных замкнутых колец (реже – спаренных спиралей) вокруг микротрубочки [79–81] (рис. 4, б). При разборке микротрубочек Dam1/DASH-кольца следуют за их деполимеризующимися (+)-концами [82–84]. Аналогичное поведение демонстрируют и некольцевые структуры [83, 85], которыми Dam1/DASH-комплекс представлен у *S. cerevisiae* более чем наполовину [81]. Dam1/DASH-комплекс умеренно взаимодействует с NDC80 в экспериментах *in vitro* уже в растворе, где присутствует в основном в виде димеров [86]. Посадку NDC80 на микротрубочку улучшают и эти димеры, и незамкнутые олигомеры большей массы, и тем более кольцевые структуры [86,87], которые образуются при концентрациях ≥ 1 нМ в пересчете на мономерные единицы [86]. Уже при 500 пМ Dam1/DASH-комплекса диффузия NDC80 по поверхности микротрубочки замедляется как минимум в 5 раз, а скорость его диссоциации обратно в раствор – вдвое [86]. Dam1/DASH-кольца позволяют NDC80 не только в большем количестве присоединяться к

стенкам микротрубочек [87], но и процессивно следовать за их (+)-концами [84, 86], к чему NDC80 не способен без искусственной олигомеризации [88]. Поливалентные NDC80-клас-теры в присутствии Dam1/DASH-комплекса более эффективно преобразуют энергию деполимеризации микротрубочки в движение хромосом *in vitro* и грузов *in vivo* [86, 89]. Так, микросферы, покрытые NDC80, при добавлении Dam1/DASH следуют за (+)-концами микротрубочек в 3 раза дольше, а соответствующая скорость отрыва уменьшается в 5 раз [86]. Dam1/DASH-комплексы, искусственно лишенные способности к олигомеризации, также усиливают взаимодействие NDC80 с микротрубочками, но не настолько, чтобы обеспечить контактам микротрубочек и кинетохоров прочность, необходимую для расхождения сестринских хроматид [89]. Таким образом, Dam1/DASH-кольца служат для NDC80 таким же фактором процессивности, как, например, белки скользящего зажима для репликативных ДНК-полимераз [90], а динактин – для моторного белка динеина [91]. Со стороны Dam1/DASH-комплекса в связывании с NDC80 участвуют C-концевые домены субъединиц Dam1, Ask1 и Spc34, каждому из которых соответствует своя область на поверхности NDC80 [87, 92, 93]. Dam1 узнает шпильку α -спиралей между кальпонин-гомологичным доменом Ndc80-субъединицы и фибриллярным стержнем [87, 93], а Ask1 и Spc34 – участки стержня по разные стороны от гибкой петли [93]. Сама эта петля не участвует в связывании с Dam1/DASH, хотя ее частичные делеции нарушают взаимодействие комплексов *in vivo* и друг с другом, и с (+)-концами микротрубочек [38]. Предположительно, дефектные молекулы NDC80, лишенные гибкой петли, не могут должным образом изогнуться, чтобы образовать контакты с Dam1- и Ask1-субъединицами одного и Spc34-субъединицей другого Dam1/DASH-кольца. Интересно наблюдение *in vitro*, что такие кольца часто формируются на микротрубочках парами, причем не только при насыщающих [80], но и при физиологических концентрациях Dam1/DASH-комплекса [93]. Без добавления NDC80-комплекса расстояние между Dam1/DASH-кольцами в таких дублетах, как правило, составляет ~ 13 нм, а в присутствии NDC80 оно возрастает до ≈ 33 нм. При искусственном удлинении стержня NDC80-комплекса на 10 гептадных повторов (NDC80^{10hep}) это расстояние увеличивается еще на 9 нм, что позволяет предположить. Это NDC80 образует критически важные мостиковые контакты между соседними Dam1/DASH-кольцами. В согласии с этим мутации во всех трех NDC80-связываю-

ших участках Dam1/ DASH-комплекса приводят к серьезным дефектам во взаимодействии микротрубочек и хромосом в митозе [93]. Интересно, однако, что (по данным криотомографии) такие мостики, если и образуются, то довольно редко и в основном при участии незамкнутых Dam1/DASH-колец [81].

Аналогично Ska-комплексу у высших эукариот взаимодействие NDC80 с дрожжевым Dam1/DASH-комплексом, как и с (+)-концами микротрубочек, регулируется Ipl1-киназой по 6 сайтам фосфорилирования, 4 из которых сосредоточены в Dam1-субъединице [84–86, 92, 93]. Фосфатные группы либо фосфомиметические замены в большинстве из этих позиций ослабляют взаимодействие Dam1/DASH с (+)-концами микротрубочек [84, 86] и с NDC80 [92] *in vitro*, а также дестабилизируют контакты микротрубочек и кинетохоров *in vivo* [53, 92]. Беззарядные замены в тех же положениях, напротив, укрепляют эти взаимодействия, однако препятствуют исправлению aberrантных прикреплений микротрубочек к кинетохорам с помощью киназы Ipl1 (дрожжевого варианта киназы Aurora B) [92]. Все эти эффекты усиливаются, если какому-то из описанных типов мутаций в Dam1/DASH-комплексе сопутствуют аналогичные мутации в N-концевом «хвосте» NDC80. (См. раздел «Роль N-концевого «хвоста» Hec1(Ndc80) в регуляции аффинности взаимодействия с микротрубочками».)

В почкующихся дрожжах одного Dam1/DASH-комплекса, по-видимому, достаточно, чтобы придать необходимую прочность контактам NDC80 с микротрубочками. Однако у некоторых других эукариот прикрепление микротрубочек к кинетохорам дополнительно стабилизируются за счет белков, напрямую узнающих гибкую петлю NDC80 [34, 35, 37]. Среди них известны белок Dis1 и белковый комплекс Alp7/Alp14 у *S. pombe* [34, 37], а также фактор ДНК-репликации Cdt1 у человека [35]. Предполагается, что Dis1, соединяющий петлю NDC80 с (+)-концом микротрубочки, возмещает дефицит Dam1/DASH-комплекса, которого у делящихся дрожжей не хватает для сборки полностью замкнутых колец [34]. В самом деле, нокаут Dis1 ($\Delta dis1$), удаление гибкой петли в NDC80 ($Ndc80^{\Delta 400-476}$) либо мутация L405P внутри нее приводит к коллапсу веретена и остановке митоза [34]. Alp7/Alp14-комплекс присоединяется к NDC80 независимо от Dis1. Мутация F420S в гибкой петле NDC80 препятствует локализации Alp7/Alp14 на NDC80, однако, в отличие от Dis1, почти не нарушает морфологию веретена, хотя и дезорганизует расхождение хромосом из-за предполагаемого ослабления кон-

цевых контактов микротрубочек и кинетохоров [37]. Этот же комплекс служит платформой для прикрепления регуляторных и моторных белков – в частности, фосфатазы PP1 и кинезина-8 (Klp5-Klp6 у *S. pombe*), которые участвуют в прохождении контрольной точки сборки веретена деления и ускоряют деполимеризацию микротрубочек в анафазе, соответственно [94]. Достоверно не ясно, узнают ли человеческие гомологи Dis1(Alp14) и Alp7 – ch-TOG и TACC соответственно – именно гибкую петлю NDC80. Как бы то ни было, ch-TOG связывает NDC80 *in vitro*, а также упрочняет контакты микротрубочек и кинетохоров и пролонгирует время жизни этих контактов *in vivo* [95]. В то же время белок Cdt1, ранее известный как лицензирующий фактор ДНК-репликации, связывается у *H. sapiens* как раз с петлей NDC80. Действительно, после ее удаления ($Ndc80^{\Delta 420-460}$) Cdt1 уже не локализуется на кинетохоре [35]. Обладая значительным сродством еще и к микротрубочке, Cdt1 кооперирует с NDC80 подобно Ska-комплексу, причем вклад данного белка в прочность контактов между кинетохорами и микротрубочками негативно регулируется Aurora B-киназой по 10 предполагаемым сайтам фосфорилирования [96].

ВОЗМОЖНАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КОМПЛЕКСА NDC80 С ОНКОГЕНЕЗОМ

Известно, что гиперэкспрессия генов всего комплекса NDC80 или его отдельных субъединиц наблюдается при злокачественных опухолях различной локализации [18–22], зачастую сопутствуя неблагоприятному прогнозу [20, 22]. Индуцированная гиперактивация гена *Hec1* также провоцирует [97], а нокаун, напротив, подавляет рост раковых клеток в мышинной модели [98]. Относительно недавно была высказана пока не доказанная гипотеза, согласно которой NDC80 может служить триггером онкогенеза за счет своей гибкой петли [99]. А именно, в соответствии с этим дискуссионным предположением, избыточные или «лишние» молекулы комплекса NDC80 не локализуются на кинетохоре, а оказываются в цитоплазме, где связывают (секвестрируют) подтвержденные (Cdt1) и предполагаемые (ch-TOG, TACC, Ska) лиганды петли вместе с партнерами по связыванию (кинезином-8 и т. д.), препятствуя участию тех и других в регуляции контактов микротрубочек и кинетохоров и провоцируя хромосомные дефекты в дочерних клетках. Следом дерегулируется экспрессия генов секвестрирован-

ных белков, что только подстегивает дальнейшее размножение анеуплоидных клеток, некоторые из которых рано или поздно перерождаются в раковые.

Действительно, в опухолях, где высока экспрессия генов NDC80, зачастую повышается и уровень вышеупомянутых белков, ассоциированных с микротрубочками [100–102]. То же касается некоторых других белков, которые связываются не с петлей NDC80, а с другими структурными элементами комплекса [97, 103]. В частности, компоненты (Mad1, Mad2) и регуляторы (Mps1, Nek2) контрольной точки сборки веретена деления, которые обеспечивают своевременный переход клетки из метафазы в анафазу, также вырабатываются в опухолевых тканях в повышенном количестве. Так, гиперэкспрессируются ген Mps1-киназы, которая узнает свободные кальпонин-гомологичные домены Ndc80-субъединиц и активирует контрольную точку сборки веретена деления, как и гены самого комплекса NDC80 [22] при колоректальном раке [103]. Задержка анафазы, связанная с гиперэкспрессией гена киназы Mps1 и сопутствующей гиперактивацией контрольной точки, столь же чревата онкогенными хромосомными дефектами, что и мислокализация белков, ассоциированных с микротрубочками [97, 104]. Известно, что NDC80, будучи в избытке, связывает больше Mad1 и Mad2, чем требуется для корректного прохождения контрольной точки [97]. Что же касается Mps1- и Nek2-киназ, то пока неизвестно, гиперэкспрессируются ли их гены сами по себе или уже вслед за повышением экспрессии генов NDC80.

Таким образом, вопрос о том, повышается ли уровень экспрессии генов комплекса NDC80 в клинических случаях возникновения злокачественных новообразований еще до того, как они становятся анеуплоидными, или уже в ответ на хромосомные нарушения, возникновение которых не связано с NDC80, остается открытым. Вполне возможно, что оба этих сценария на практике почти никогда не реализуются и гиперэкспрессия генов NDC80 служит не первопричиной и не следствием рака, а скорее промежуточным триггером при переходе опухоли из умеренного в агрессивный режим роста.

Митотическое деление венчает собой жизненный цикл любой эукариотической клетки вне зависимости от того, является ли она частью многоклеточного организма или самодостаточным целым. В митозе участвуют десятки белковых комплексов, одни из которых напрямую

осуществляют контакты между кинетохором и микротрубочкой, другие регулируют прочность этих контактов, а третьи – синхронизируют сборку и разборку микротрубочек со своевременным переключением между фазами деления. Комплекс NDC80 вносит вклад во все эти процессы, играя роль своеобразного регуляторного хаба. В связи с этим, не удивительно, что деление клеток оказывается чувствительным не только к мутациям в NDC80, но и к уровню экспрессии генов этого комплекса. Действительно, патологической пролиферации опухолевых клеток, которая не обходится без тех или иных сбоя в аппарате деления, зачастую сопутствует повышенная выработка NDC80.

Можно предположить, что направленная блокировка NDC80 может оказаться перспективной в терапии злокачественных новообразований. Ассортимент известных малых молекул, способных каким-то образом модулировать работу NDC80 комплекса, пока ограничивается лишь несколькими соединениями, одно из которых, вероятно, препятствует посадке NDC80 на микротрубочку, связываясь с тубулином [105], а остальные – ингибируют взаимодействие комплекса NDC80 с Nek2-киназой [106–109]. Как и ожидалось, все эти вещества в той или иной степени подавляют рост целого ряда опухолей *in vitro* и/или *in vivo* [106–109]. Подбор блокаторов не к тубулину, а напрямую к NDC80 в будущем, возможно, обеспечит не только высокую эффективность остановки клеточного деления, но и меньшее количество негативных побочных воздействий на организм по сравнению с существующими препаратами. Последние подавляют динамику не только митотических, но и, например, аксональных микротрубочек, тем самым провоцируя нейродегенеративные эффекты [110]. Прямые ингибиторы функций NDC80 обещают быть избавленными от этой проблемы и помочь в борьбе со злокачественными новообразованиями с меньшими отрицательными последствиями для нервной системы и организма человека в целом.

Конфликт интересов. У авторов отсутствует конфликт интересов.

Благодарности. Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект 17-74-20152).

Соблюдение этических норм. Данная работа не содержит исследований, в которых были бы использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petry, S. (2016) Mechanisms of mitotic spindle assembly, *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 659-683, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014528.
2. Miki-Noumura, T., and Mori, H. (1972) Polymerization of tubulin: the linear polymer and its side-by-side aggregates, *J. Mechanochem. Cell. Motil.*, **1**, 175-188, doi: 10.1038/331499a0.
3. Bergen, L. G., and Borisy, G. G. (1980) Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. Electron microscope analysis of seeded assembly, *J. Cell Biol.*, **84**, 141-150, doi: 10.1083/jcb.84.1.141.
4. Huitorel, P., and Kirschner, M. W. (1988) The polarity and stability of microtubule capture by the kinetochore, *J. Cell Biol.*, **106**, 151-159, doi: 10.1083/jcb.106.1.151.
5. Koshland, D. E., Mitchison, T. J., and Kirschner, M. W. (1988) Polewards chromosome movement driven by microtubule depolymerization *in vitro*, *Nature*, **331**, 499-504.
6. Mitchison, T. J., and Kirschner, M. W. (1985) Properties of the kinetochore *in vitro*. I. Microtubule nucleation and tubulin binding, *J. Cell. Biol.*, **101**, 755-765, doi: 10.1083/jcb.101.3.755.
7. McAinsh, A. D., Tytell, J. D., and Sorger, P. K. (2003) Structure, function, and regulation of budding yeast kinetochores, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 519-539, doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.155607.
8. Westermann, S., Drubin, D. G., and Barnes, G. (2007) Structures and functions of yeast kinetochore complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 563-591, doi: 10.1146/annurev-biochem.76.052705.160607.
9. Cheeseman, I. M., and Desai, A. (2008) Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 33-46, doi: 10.1038/nrm2310.
10. Welburn, J. P. I., and Cheeseman, I. M. (2008) Toward a molecular structure of the eukaryotic kinetochore, *Dev. Cell*, **15**, 645-655, doi: 10.1016/j.devcel.2008.10.011.
11. Cheeseman, I. M., Chappie, J. S., Wilson-Kubalek, E. M., and Desai, A. (2006) The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore, *Cell*, **127**, 983-997, doi: 10.1016/j.cell.2006.09.039.
12. Janke, C., Ortiz, J., Lechner, J., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Magiera, M. M., Schramm, C., and Schiebel, E. (2001) The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control, *EMBO J.*, **20**, 777-791, doi: 10.1093/emboj/20.4.777.
13. Joglekar, A. P., Bouck, D. C., Molk, J. N., Bloom, K. S., and Salmon, E. D. (2006) Molecular architecture of a kinetochore-microtubule attachment site, *Nat. Cell Biol.*, **8**, 581-585, doi: 10.1038/ncb1414.
14. Aravamudhan, P., Felzer-Kim, I., Gurunathan, K., and Joglekar, A. P. (2014) Assembling the protein architecture of the budding yeast kinetochore-microtubule attachment using FRET, *Curr. Biol.*, **24**, 1437-1446, doi: 10.1016/j.cub.2014.05.014.
15. Suzuki, A., Badger, B. L., and Salmon, E. D. (2015) A quantitative description of Ndc80 complex linkage to human kinetochores, *Nat. Commun.*, **6**, 8161, doi: 10.1038/ncomms9161.
16. Lawrimore, J., Bloom, K. S., and Salmon, E. D. (2011) Point centromeres contain more than a single centromere-specific Cse4 (CENP-A) nucleosome, *J. Cell Biol.*, **195**, 573-582, doi: 10.1083/jcb.201106036.
17. Bharadwaj, R., and Yu, H. (2004) The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer, *Oncogene*, **23**, 2016-2027, doi: 10.1038/sj.onc.1207374.
18. Qu, Y., Li, J., Cai, Q., and Liu, B. (2014) Hec1/Ndc80 is overexpressed in human gastric cancer and regulates cell growth, *J. Gastroenterol.*, **49**, 408-418, doi: 10.1007/s00535-013-0809-y.
19. Hu, P., Chen, X., Sun, J., Bie, P., and Zhang, L.-D. (2015) siRNA-mediated knockdown against NUF2 suppresses pancreatic cancer proliferation *in vitro* and *in vivo*, *Biosci. Rep.*, **35**, doi: 10.1042/BSR20140124.
20. Meng, Q.-C., Wang, H.-C., Song, Z.-L., Shan, Z.-Z., Yuan, Z., Zheng, Q., and Huang, X.-Y. (2015) Overexpression of NDC80 is correlated with prognosis of pancreatic cancer and regulates cell proliferation, *Am. J. Cancer Res.*, **5**, 1730-1740.
21. Wang, H., Gao, X., Lu, X., Wang, Y., Ma, C., Shi, Z., Zhu, F., He, B., Xu, C., and Sun, Y. (2015) The mitotic regulator Hec1 is a critical modulator of prostate cancer through the long non-coding RNA BX647187 *in vitro*, *Biosci. Rep.*, **35**, doi: 10.1042/BSR20150003.
22. Yan, X., Huang, L., Liu, L., Qin, H., and Song, Z. (2018) Nuclear division cycle 80 promotes malignant progression and predicts clinical outcome in colorectal cancer, *Cancer Med.*, **7**, 420-432, doi: 10.1002/cam4.1284.
23. Wei, R. R., Sorger, P. K., and Harrison, S. C. (2005) Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5363-5367, doi: 10.1073/pnas.0501168102.
24. DeLuca, J. G., Gall, W. E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., and Salmon, E. D. (2006) Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1, *Cell*, **127**, 969-982, doi: 10.1016/j.cell.2006.09.047.
25. Wei, R. R., Al-Bassam, J., and Harrison, S. C. (2007) The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 54-59, doi: 10.1038/nsmb1186.
26. Ciferri, C., Pasqualato, S., Screpanti, E., Varetto, G., Santaguida, S., Dos Reis, G., Maiolica, A., Polka, J., De Luca, J. G., and De Wulf, P. et al. (2008) Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex, *Cell*, **133**, 427-439, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.020.
27. Sundin, L. J. R., Guimaraes, G. J., and DeLuca, J. G. (2011) The NDC80 complex proteins Nuf2 and Hec1 make distinct contributions to kinetochore-microtubule attachment in mitosis, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 759-768, doi: 10.1091/mbc.E10-08-0671.
28. McClelland, M. L., Kallio, M. J., Barrett-Wilt, G. A., Kestner, C. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Gorbisky, G. J., and Stukenberg, P. T. (2004) The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment, *Curr. Biol.*, **14**, 131-137, doi: 10.1016/j.cub.2003.12.058.
29. Malvezzi, F., Litos, G., Schleiffer, A., Heuck, A., Mechtler, K., Clausen, T., and Westermann, S. (2013) A structural basis for kinetochore recruitment of the Ndc80 complex *via* two distinct centromere receptors, *EMBO J.*, **32**, 409-423, doi: 10.1038/emboj.2012.356.
30. Wei, R. R., Schnell, J. R., Larsen, N. A., Sorger, P. K., Chou, J. J., and Harrison, S. C. (2006) Structure of a central component of the yeast kinetochore: the Spc24p/Spc25p globular domain, *Structure*, **14**, 1003-1009, doi: 10.1016/j.str.2006.04.007.
31. Valverde, R., Ingram, J., and Harrison, S. C. (2016) Conserved tetramer junction in the kinetochore Ndc80 complex, *Cell Rep.*, **17**, 1915-1922, doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.065.
32. Mustyatsa, V. V., Boyakhchyan, A. V., Ataulakhanov, F. I., and Gudimchuk, N. B. (2017) EB-family proteins: functions and microtubule interaction mechanisms, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 791-802, doi: 10.1134/S0006297917070045.
33. Wang, H.-W., Long, S., Ciferri, C., Westermann, S., Drubin, D., Barnes, G., and Nogales, E. (2008) Architecture and flexibility of the yeast Ndc80 kinetochore

- complex, *J. Mol. Biol.*, **383**, 894-903, doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.077.
34. Hsu, K.-S., and Toda, T. (2011) Ndc80 internal loop interacts with Dis1/TOG to ensure proper kinetochore-spindle attachment in fission yeast, *Curr. Biol.*, **21**, 214-220, doi: 10.1016/j.cub.2010.12.048.
 35. Varma, D., Chandrasekaran, S., Sundin, L. J. R., Reidy, K. T., Wan, X., Chasse, D. A. D., Nevis, K. R., DeLuca, J. G., Salmon, E. D., and Cook, J. G. (2012) Recruitment of the human Cdt1 replication licensing protein by the loop domain of Hec1 is required for stable kinetochore-microtubule attachment, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 593-603, doi: 10.1038/ncb2489.
 36. Zhang, G., Kelstrup, C. D., Hu, X.-W., Kaas Hansen, M. J., Singleton, M. R., Olsen, J. V., and Nilsson, J. (2012) The Ndc80 internal loop is required for recruitment of the Ska complex to establish end-on microtubule attachment to kinetochores, *J. Cell. Sci.*, **125**, 3243-3253, doi: 10.1242/jcs.104208.
 37. Tang, N. H., Takada, H., Hsu, K.-S., and Toda, T. (2013) The internal loop of fission yeast Ndc80 binds Alp7/TACC-Alp14/TOG and ensures proper chromosome attachment, *Mol. Biol. Cell*, **24**, 1122-1133, doi: 10.1091/mbc.E12-11-0817.
 38. Maure, J.-F., Komoto, S., Oku, Y., Mino, A., Pasqualato, S., Natsume, K., Clayton, L., Musacchio, A., and Tanaka, T. U. (2011) The Ndc80 loop region facilitates formation of kinetochore attachment to the dynamic microtubule plus end, *Curr. Biol.*, **21**, 207-213, doi: 10.1016/j.cub.2010.12.050.
 39. Joglekar, A. P., Bloom, K., and Salmon, E. D. (2009) *In vivo* protein architecture of the eukaryotic kinetochore with nanometer scale accuracy, *Curr. Biol.*, **19**, 694-699, doi: 10.1016/j.cub.2009.02.056.
 40. Scarborough, E. A., Davis, T. N., and Asbury, C. L. (2019) Tight bending of the Ndc80 complex provides intrinsic regulation of its binding to microtubules, *Elife*, **8**, doi: 10.7554/eLife.44489.
 41. Tien, J. F., Umbreit, N. T., Zelter, A., Riffle, M., Hoopmann, M. R., Johnson, R. S., Fonslow, B. R., Yates, J. R., MacCoss, M. J., and Moritz, R. L. et al. (2014) Kinetochore biorientation in *Saccharomyces cerevisiae* requires a tightly folded conformation of the Ndc80 complex, *Genetics*, **198**, 1483-1493, doi: 10.1534/genetics.114.167775.
 42. Guimaraes, G. J., Dong, Y., McEwen, B. F., and DeLuca, J. G. (2008) Kinetochore-microtubule attachment relies on the disordered N-terminal tail domain of Hec1, *Curr. Biol.*, **18**, 1778-1784, doi: 10.1016/j.cub.2008.08.012.
 43. Miller, S. A., Johnson, M. L., and Stukenberg, P. T. (2008) Kinetochore attachments require an interaction between unstructured tails on microtubules and Ndc80(Hec1), *Curr. Biol.*, **18**, 1785-1791, doi: 10.1016/j.cub.2008.11.007.
 44. Malik, R., Lenobel, R., Santamaria, A., Ries, A., Nigg, E. A., and Körner, R. (2009) Quantitative analysis of the human spindle phosphoproteome at distinct mitotic stages, *J. Proteome Res.*, **8**, 4553-4563, doi: 10.1021/pr9003773.
 45. DeLuca, K. F., Meppelink, A., Broad, A. J., Mick, J. E., Peersen, O. B., Pektas, S., Lens, S. M. A., and DeLuca, J. G. (2018) Aurora A kinase phosphorylates Hec1 to regulate metaphase kinetochore-microtubule dynamics, *J. Cell Biol.*, **217**, 163-177, doi: 10.1083/jcb.201707160.
 46. DeLuca, K. F., Lens, S. M. A., and DeLuca, J. G. (2011) Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis, *J. Cell. Sci.*, **124**, 622-634, doi: 10.1242/jcs.072629.
 47. Biggins, S., Severin, F. F., Bhalla, N., Sassoon, I., Hyman, A. A., and Murray, A. W. (1999) The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast, *Genes Dev.*, **13**, 532-544, doi: 10.1101/gad.13.5.532.
 48. Liu, D., Vleugel, M., Backer, C. B., Hori, T., Fukagawa, T., Cheeseman, I. M., and Lampson, M. A. (2010) Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase, *J. Cell Biol.*, **188**, 809-820, doi: 10.1083/jcb.201001006.
 49. Zaytsev, A. V., Sundin, L. J. R., DeLuca, K. F., Grishchuk, E. L., and DeLuca, J. G. (2014) Accurate phosphoregulation of kinetochore-microtubule affinity requires unconstrained molecular interactions, *J. Cell Biol.*, **206**, 45-59, doi: 10.1083/jcb.201312107.
 50. Yoo, T. Y., Choi, J.-M., Conway, W., Yu, C.-H., Pappu, R. V., and Needleman, D. J. (2018) Measuring NDC80 binding reveals the molecular basis of tension-dependent kinetochore-microtubule attachments, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.36392.
 51. Alushin, G. M., Ramey, V. H., Pasqualato, S., Ball, D. A., Grigorieff, N., Musacchio, A., and Nogales, E. (2010) The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules, *Nature*, **467**, 805-810, doi: 10.1038/nature09423.
 52. Alushin, G. M., Musinipally, V., Matson, D., Tooley, J., Stukenberg, P. T., and Nogales, E. (2012) Multimodal microtubule binding by the Ndc80 kinetochore complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1161-1167, doi: 10.1038/nsmb.2411.
 53. Sarangapani, K. K., Akiyoshi, B., Duggan, N. M., Biggins, S., and Asbury, C. L. (2013) Phosphoregulation promotes release of kinetochores from dynamic microtubules via multiple mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7282-7287, doi: 10.1073/pnas.1220700110.
 54. Zaytsev, A. V., Mick, J. E., Maslennikov, E., Nikashin, B., DeLuca, J. G., and Grishchuk, E. L. (2015) Multisite phosphorylation of the NDC80 complex gradually tunes its microtubule-binding affinity, *Mol. Biol. Cell*, **26**, 1829-1844, doi: 10.1091/mbc.E14-11-1539.
 55. Petrovic, A., Pasqualato, S., Dube, P., Krenn, V., Santaguada, S., Cittaro, D., Monzani, S., Massimiliano, L., Keller, J., and Tarricone, A. et al. (2010) The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly, *J. Cell Biol.*, **190**, 835-852, doi: 10.1083/jcb.201002070.
 56. Maskell, D. P., Hu, X.-W., and Singleton, M. R. (2010) Molecular architecture and assembly of the yeast kinetochore MIND complex, *J. Cell Biol.*, **190**, 823-834, doi: 10.1083/jcb.201002059.
 57. Screpanti, E., De Antoni, A., Alushin, G. M., Petrovic, A., Melis, T., Nogales, E., and Musacchio, A. (2011) Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore, *Curr. Biol.*, **21**, 391-398, doi: 10.1016/j.cub.2010.12.039.
 58. Gascoigne, K. E., Takeuchi, K., Suzuki, A., Hori, T., Fukagawa, T., and Cheeseman, I. M. (2011) Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes, *Cell*, **145**, 410-422, doi: 10.1016/j.cell.2011.03.031.
 59. Yiap, B. C., Radhakrishnan, A. K., and Varma, N. R. (2008) DSN1 deletion is deleterious to the *Saccharomyces cerevisiae* while Dsn1p disrupts nuclear segregation process of chinese hamster ovary cell, *Afr. J. Biotech.*, **7**, 2315-2320.
 60. Kline, S. L., Cheeseman, I. M., Hori, T., Fukagawa, T., and Desai, A. (2006) The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation, *J. Cell Biol.*, **173**, 9-17, doi: 10.1083/jcb.200509158.
 61. Schleiffer, A., Maier, M., Litos, G., Lampert, F., Hornung, P., Mechtler, K., and Westermann, S. (2012) CENP-T proteins are conserved centromere receptors of the Ndc80 complex, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 604-613, doi: 10.1038/ncb2493.
 62. Bock, L. J., Pagliuca, C., Kobayashi, N., Grove, R. A., Oku, Y., Shrestha, K., Alfieri, C., Golfieri, C., Oldani, A., and Dal Maschio, M. et al. (2012) Cnn1 inhibits the interactions between the KMN complexes of the yeast kinetochore, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 614-624, doi: 10.1038/ncb2495.
 63. Palframan, W. J., Meehl, J. B., Jaspersen, S. L., Winey, M., and Murray, A. W. (2006) Anaphase inactivation of the

- spindle checkpoint, *Science*, **313**, 680-684, doi: 10.1126/science.1127205.
64. Dhatchinamoorthy, K., Shivaraju, M., Lange, J. J., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Slaughter, B. D., and Gerton, J. L. (2017) Structural plasticity of the living kinetochore, *J. Cell Biol.*, **216**, 3551-3570, doi: 10.1083/jcb.201703152.
 65. Lang, J., Barber, A., and Biggins, S. (2018) An assay for de novo kinetochore assembly reveals a key role for the CENP-T pathway in budding yeast, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.37819.
 66. Akiyoshi, B., Nelson, C. R., and Biggins, S. (2013) The aurora B kinase promotes inner and outer kinetochore interactions in budding yeast, *Genetics*, **194**, 785-789, doi: 10.1534/genetics.113.150839.
 67. Huis In 't Veld, P. J., Jeganathan, S., Petrovic, A., Singh, P., John, J., Krenn, V., Weissmann, F., Bange, T., and Musacchio, A. (2016) Molecular basis of outer kinetochore assembly on CENP-T, *Elife*, **5**, doi: 10.7554/eLife.21007.
 68. Caldas, G. V., and DeLuca, J. G. (2014) KNLI: bringing order to the kinetochore, *Chromosoma*, **123**, 169-181, doi: 10.1007/s00412-013-0446-5.
 69. Ghongane, P., Kapanidou, M., Asghar, A., Elowe, S., and Bolanos-Garcia, V. M. (2014) The dynamic protein Knl1-a kinetochore rendezvous, *J. Cell. Sci.*, **127**, 3415-3423, doi: 10.1242/jcs.149922.
 70. Pagliuca, C., Draviam, V. M., Marco, E., Sorger, P. K., and De Wulf, P. (2009) Roles for the conserved spc105p/kre28p complex in kinetochore-microtubule binding and the spindle assembly checkpoint, *PLoS One*, **4**, e7640, doi: 10.1371/journal.pone.0007640.
 71. Espeut, J., Cheerambathur, D. K., Krenning, L., Oegema, K., and Desai, A. (2012) Microtubule binding by KNL-1 contributes to spindle checkpoint silencing at the kinetochore, *J. Cell Biol.*, **196**, 469-482, doi: 10.1083/jcb.201111107.
 72. Kerres, A., Jakopiec, V., and Fleig, U. (2007) The conserved Spc7 protein is required for spindle integrity and links kinetochore complexes in fission yeast, *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2441-2454, doi: 10.1091/mbc.e06-08-0738.
 73. Jeyaprakash, A. A., Santamaria, A., Jayachandran, U., Chan, Y. W., Benda, C., Nigg, E. A., and Conti, E. (2012) Structural and functional organization of the Ska complex, a key component of the kinetochore-microtubule interface, *Mol. Cell*, **46**, 274-286, doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.005.
 74. Helgeson, L. A., Zelter, A., Riffle, M., MacCoss, M. J., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2018) Human Ska complex and Ndc80 complex interact to form a load-bearing assembly that strengthens kinetochore-microtubule attachments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 2740-2745, doi: 10.1073/pnas.1718553115.
 75. Wimbish, R., DeLuca, K. F., Mick, J. E., Himes, J., Sánchez, I. J., Jeyaprakash, A. A., and DeLuca, J. G. (2019) Coordination of NDC80 and Ska complexes at the kinetochore-microtubule interface in human cells, preprint, *Cell Biol.*, doi: 10.1101/820530.
 76. Schmidt, J. C., Arthanari, H., Boeszoermyeni, A., Dashkevich, N. M., Wilson-Kubalek, E. M., Monnier, N., Markus, M., Oberer, M., Milligan, R. A., and Bathe, M. et al. (2012) The kinetochore-bound Skal complex tracks depolymerizing microtubules and binds to curved protofilaments, *Dev. Cell*, **23**, 968-980, doi: 10.1016/j.devcel.2012.09.012.
 77. Abad, M. A., Medina, B., Santamaria, A., Zou, J., Plasberg-Hill, C., Madhumalar, A., Jayachandran, U., Redli, P. M., Rappsilber, J., and Nigg, E. A. et al. (2014) Structural basis for microtubule recognition by the human kinetochore Ska complex, *Nat. Commun.*, **5**, 2964, doi: 10.1038/ncomms3964.
 78. Ramey, V. H., Wong, A., Fang, J., Howes, S., Barnes, G., and Nogales, E. (2011) Subunit organization in the Dam1 kinetochore complex and its ring around microtubules., *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4335-4342, doi: 10.1091/mbc.E11-07-0659.
 79. Westermann, S., Avila-Sakar, A., Wang, H.-W., Niederstrasser, H., Wong, J., Drubin, D. G., Nogales, E., and Barnes, G. (2005) Formation of a dynamic kinetochore-microtubule interface through assembly of the Dam1 ring complex, *Mol. Cell.*, **17**, 277-290, doi: 10.1016/j.molcel.2004.12.019.
 80. Miranda, J. J. L., De Wulf, P., Sorger, P. K., and Harrison, S. C. (2005) The yeast DASH complex forms closed rings on microtubules, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 138-143, doi: 10.1038/nsmb896.
 81. Ng, C. T., Deng, L., Chen, C., Lim, H. H., Shi, J., Surana, U., and Gan, L. (2019) Electron cryotomography analysis of Dam1C/DASH at the kinetochore-spindle interface *in situ*, *J. Cell Biol.*, **218**, 455-473, doi: 10.1083/jcb.201809088.
 82. Westermann, S., Wang, H.-W., Avila-Sakar, A., Drubin, D. G., Nogales, E., and Barnes, G. (2006) The Dam1 kinetochore ring complex moves processively on depolymerizing microtubule ends, *Nature*, **440**, 565-569, doi: 10.1038/nature04409.
 83. Grishchuk, E. L., Spiridonov, I. S., Volkov, V. A., Efremov, A., Westermann, S., Drubin, D., Barnes, G., Ataulakhanov, F. I., and McIntosh, J. R. (2008) Different assemblies of the DAM1 complex follow shortening microtubules by distinct mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6918-6923, doi: 10.1073/pnas.0801811105.
 84. Lampert, F., Hornung, P., and Westermann, S. (2010) The Dam1 complex confers microtubule plus end-tracking activity to the Ndc80 kinetochore complex, *J. Cell Biol.*, **189**, 641-649, doi: 10.1083/jcb.200912021.
 85. Gestaut, D. R., Graczyk, B., Cooper, J., Widlund, P. O., Zelter, A., Wordeman, L., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2008) Phosphoregulation and depolymerization-driven movement of the Dam1 complex do not require ring formation, *Nat. Cell Biol.*, **10**, 407-414, doi: 10.1038/ncb1702.
 86. Tien, J. F., Umbreit, N. T., Gestaut, D. R., Franck, A. D., Cooper, J., Wordeman, L., Gonen, T., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2010) Cooperation of the Dam1 and Ndc80 kinetochore complexes enhances microtubule coupling and is regulated by aurora B, *J. Cell Biol.*, **189**, 713-723, doi: 10.1083/jcb.200910142.
 87. Lampert, F., Mieck, C., Alushin, G. M., Nogales, E., and Westermann, S. (2013) Molecular requirements for the formation of a kinetochore-microtubule interface by Dam1 and Ndc80 complexes, *J. Cell Biol.*, **200**, 21-30, doi: 10.1083/jcb.201210091.
 88. Volkov, V. A., Huis In 't Veld, P. J., Dogterom, M., and Musacchio, A. (2018) Multivalency of NDC80 in the outer kinetochore is essential to track shortening microtubules and generate forces, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.36764.
 89. Umbreit, N. T., Miller, M. P., Tien, J. F., Ortolá, J. C., Gui, L., Lee, K. K., Biggins, S., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2014) Kinetochores require oligomerization of Dam1 complex to maintain microtubule attachments against tension and promote biorientation, *Nat. Commun.*, **5**, 4951, doi: 10.1038/ncomms5951.
 90. Kuriyan, J., and O'Donnell, M. (1993) Sliding clamps of DNA polymerases, *J. Mol. Biol.*, **234**, 915-925, doi: 10.1006/jmbi.1993.1644.
 91. King, S. J., and Schroer, T. A. (2000) Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 20-24, doi: 10.1038/71338.
 92. Kalantzaki, M., Kitamura, E., Zhang, T., Mino, A., Novák, B., and Tanaka, T. U. (2015) Kinetochore-microtubule error correction is driven by differentially regulated interaction modes, *Nat. Cell Biol.*, **17**, 421-433, doi: 10.1038/ncb3128.
 93. Kim, J. O., Zelter, A., Umbreit, N. T., Bollozos, A., Riffle, M., Johnson, R., MacCoss, M. J., Asbury, C. L., and Davis, T. N. (2017) The Ndc80 complex bridges two Dam1 complex rings, *Elife*, **6**, doi: 10.7554/eLife.21069.
 94. Tang, N. H., and Toda, T. (2015) Alp7/TACC recruits kinesin-8-PP1 to the Ndc80 kinetochore protein for time-

- ly mitotic progression and chromosome movement, *J. Cell. Sci.*, **128**, 354-363, doi: 10.1242/jcs.160036.
95. Miller, M. P., Asbury, C. L., and Biggins, S. (2016) A TOG protein confers tension sensitivity to kinetochore-microtubule attachments, *Cell*, **165**, 1428-1439, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.030.
 96. Agarwal, S., Smith, K. P., Zhou, Y., Suzuki, A., McKenney, R. J., and Varma, D. (2018) Cdt1 stabilizes kinetochore-microtubule attachments via an Aurora B kinase-dependent mechanism, *J. Cell Biol.*, **217**, 3446-3463, doi: 10.1083/jcb.201705127.
 97. Diaz-Rodríguez, E., Sotillo, R., Schwartzman, J.-M., and Benzra, R. (2008) Hec1 overexpression hyperactivates the mitotic checkpoint and induces tumor formation *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16719-16724, doi: 10.1073/pnas.0803504105.
 98. Gurzov, E. N., and Izquierdo, M. (2006) RNA interference against Hec1 inhibits tumor growth *in vivo*, *Gene Ther.*, **13**, 1-7, doi: 10.1038/sj.gt.3302595.
 99. Tang, N. H., and Toda, T. (2015) MAPPING the Ndc80 loop in cancer: A possible link between Ndc80/Hec1 overproduction and cancer formation, *Bioessays*, **37**, 248-256, doi: 10.1002/bies.201400175.
 100. Still, I. H., Vince, P., and Cowell, J. K. (1999) The third member of the transforming acidic coiled coil-containing gene family, TACC3, maps in 4p16, close to translocation breakpoints in multiple myeloma, and is upregulated in various cancer cell lines, *Genomics*, **58**, 165-170, doi: 10.1006/geno.1999.5829.
 101. Nagahara, M., Nishida, N., Iwatsuki, M., Ishimaru, S., Mimori, K., Tanaka, F., Nakagawa, T., Sato, T., Sugihara, K., and Hoon, D.S. et al. (2011) Kinesin 18A expression: clinical relevance to colorectal cancer progression, *Int. J. Cancer*, **129**, 2543-2552, doi: 10.1002/ijc.25916.
 102. Karavias, D., Maroulis, I., Papadaki, H., Gogos, C., Kakkos, S., Karavias, D., and Bravou, V. (2016) Overexpression of CDT1 is a predictor of poor survival in patients with hepatocellular carcinoma, *J. Gastrointest. Surg.*, **20**, 568-579, doi: 10.1007/s11605-015-2960-7.
 103. Ling, Y., Zhang, X., Bai, Y., Li, P., Wei, C., Song, T., Zheng, Z., Guan, K., Zhang, Y., Zhang, B. et al. (2014) Overexpression of Mps1 in colon cancer cells attenuates the spindle assembly checkpoint and increases aneuploidy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 1690-1695, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.071.
 104. Sotillo, R., Hernando, E., Díaz-Rodríguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., and Benzra, R. (2007) Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice, *Cancer Cell*, **11**, 9-23, doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.019.
 105. Screpanti, E., Santaguida, S., Nguyen, T., Silvestri, R., Gussio, R., Musacchio, A., Hamel, E., and De Wulf, P. (2010) A screen for kinetochore-microtubule interaction inhibitors identifies novel antitubulin compounds, *PLoS One*, **5**, e11603, doi: 10.1371/journal.pone.0011603.
 106. Wu, G., Qiu, X.-L., Zhou, L., Zhu, J., Chamberlin, R., Lau, J., Chen, P.-L., and Lee, W.-H. (2008) Small molecule targeting the Hec1/Nek2 mitotic pathway suppresses tumor cell growth in culture and in animal, *Cancer Res.*, **68**, 8393-8399, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1915.
 107. Huang, L. Y. L., Lee, Y.-S., Huang, J.-J., Chang, C., Chang, J.-M., Chuang, S.-H., Kao, K.-J., Tsai, Y.-J., Tsai, P.-Y., and Liu, C.-W. et al. (2014) Characterization of the biological activity of a potent small molecule Hec1 inhibitor TAI-1, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **33**, 6, doi: 10.1186/1756-9966-33-6.
 108. Huang, L. Y. L., Chang, C.-C., Lee, Y.-S., Chang, J.-M., Huang, J.-J., Chuang, S.-H., Kao, K.-J., Lau, G. M. G., Tsai, P.-Y., and Liu, C.-W. et al. (2014) Activity of a novel Hec1-targeted anticancer compound against breast cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cancer Ther.*, **13**, 1419-1430, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0700.
 109. Hu, C.-M., Zhu, J., Guo, X. E., Chen, W., Qiu, X.-L., Ngo, B., Chien, R., Wang, Y. V., Tsai, C. Y., and Wu, G. et al. (2015) Novel small molecules disrupting Hec1/Nek2 interaction ablate tumor progression by triggering Nek2 degradation through a death-trap mechanism, *Oncogene*, **34**, 1220-1230, doi: 10.1038/onc.2014.67.
 110. Carozzi, V. A., Canta, A., and Chiorazzi, A. (2015) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: what do we know about mechanisms? *Neurosci. Lett.*, **596**, 90-107, doi: 10.1016/j.neulet.2014.10.014.

PROTEIN COMPLEX NDC80: PROPERTIES, FUNCTIONS AND POSSIBLE ROLE IN PATHOPHYSIOLOGY OF CELL DIVISION

Review

N. B. Ustinov¹, A. V. Korshunova^{1,2}, and N. B. Gudimchuk^{1,2*}

¹ Center for Theoretical Problems of Physico-chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: gudimchuk@phys.msu.ru

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, 119991 Moscow, Russia

Received January 30, 2020

Revised March 2, 2020

Accepted March 2, 2020

Mitotic division maintains the genetic identity of any multicellular organism throughout a whole lifetime. Each time when a mother cell divides, chromosomes are equally distributed between daughter cells thanks to the action of mitotic spindle apparatus, assembled from microtubules – dynamic polymers of the tubulin protein. Spindle microtubules attach to kinetochores – large multi-protein complexes on chromosomes – in a manner called end-on attachment. This review is devoted to one of the most important kinetochore elements, the four-subunit complex NDC80, which plays a major role in the attachment of assembling and disassembling microtubule ends to chromosomes. Here we systematize literature data about the structure, properties and regulation of the NDC80 complex in cells. In the review, we also trace the possible relationship between misexpression of the genes, coding components of the NDC80 complex, mitotic disorders and oncogenesis, drawing the readers' attention to the diagnostic and therapeutic potential of this protein complex.

Keywords: mitosis, mitotic spindle, microtubules, kinetochore, phosphoregulation, inhibition of mitosis, NDC80, antimitotic drugs