

## Анализ формы конца микротрубочки

Александрова В.В.<sup>1</sup>, Анисимов М.Н.<sup>2</sup>, Мустяца В.В.<sup>1, 2, 3</sup>, Гудимчук Н.Б.<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН

<sup>2</sup>Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

<sup>3</sup>НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева

[Supercrazybird@gmail.com](mailto:Supercrazybird@gmail.com)

Димерный белок тубулин способен к самоорганизации в полимерные агрегаты – микротрубочки, непрерывно участвующие в жизненном цикле клетки. Ключевой особенностью микротрубочек служит их способность к спонтанному переключению между периодами удлинения и укорочения. Своему нестабильному поведению микротрубочки обязаны наличию молекул ГТФ, которые при гидролизе в  $\beta$ -субъединицах тубулина, создают внутренние напряжения в теле микротрубочки, тем самым повышая вероятность наступления быстро протекающей разборки – катастрофы. В свою очередь катастрофы не являются случайным одностадийным процессом, о чем свидетельствует неэкспоненциальный спад времен жизни микротрубочек, получивший название старения. Была высказана идея о том, что и форма распределения частоты катастроф по времени жизни МТ, и среднее значение этого распределения объясняется перестройкой конца микротрубочки, а именно его заострением. Заострение микротрубочки должно проявляться в неравномерности присоединения свободного тубулина к разным позициям на микротрубочке, т.е. в неоднородном нарастании высокоцентрированного ГТФ-тубулином участка, уберегающего микротрубочку от катастрофы. Экспериментальные предпосылки есть в статьях, где наблюдались продолговатые выступы некоторых протофиламентов, а также на этом предположении было построено несколько моделей, однако в то же время существуют модели, в которых не наблюдается заострения вовсе, либо оно не коррелирует с наступлением катастроф. За такими противоречивыми результатами может стоять либо ошибочная интерпретация данных, не до конца учитывающая все нюансы используемой микроскопии; либо различие в методиках подбора параметров, если речь идет о моделировании. Чтобы разобраться в том, какие условия располагают к появлению заострения, мы, на примере наиболее простой из кинетических моделей задались целью более подробно исследовать поведение конца микротрубочки и, кроме того, поставить контрольные эксперименты с помощью TIRF-микроскопии для проверки состоятельности гипотезы.

*Ключевые слова:* Монте-Карло моделирование, динамическая нестабильность, TIRF-микроскопия, механизм катастроф.

## Microtubule Tip Shape Analysis

Aleksandrova V.V.<sup>1</sup>, Anisimov M.N.<sup>2</sup>, Mustyatsa V.V.<sup>1, 2, 3</sup>, Gudimchuk N.B.<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology RAS

<sup>2</sup>Physics department, Lomonosov Moscow State University

<sup>3</sup>Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology

Dimeric protein tubulin is capable for self-organization into polymer aggregates, microtubules, which continuously participate in the cell life cycle. A key feature of microtubules is their ability to spontaneously switch between growing and shortening. The presence of GTP molecules is responsible for microtubule unstable behaviour due to its hydrolysis in  $\beta$ -tubulin subunits, which induces internal stresses in the microtubule body, thereby increasing the likelihood of a rapidly proceeding disassembly, catastrophe. In turn, catastrophes are not a random one-stage process, as evidenced by the nonexponential decay in the microtubules lifetimes, called aging. It was suggested that both the form of the catastrophe frequency distribution over the MT lifetime and the mean value of this distribution are explained by the changes at the microtubule tip, namely, its tapering. The tapering of the microtubule end should manifest itself in uneven attachment of free tubulin to different positions on the microtubule, i.e. in the inhomogeneous growth of a highly concentrated GTP-tubulin region that protects the microtubule from catastrophe. Experimental prerequisites exist in articles where elongated protrusions of some protofilaments were observed, as well as several models were built on this

assumption, but at the same time there are models in which no sharpening is observed at all, or it does not correlate with the onset of catastrophes. Behind such contradictory results, there may be either an erroneous interpretation of the data, which does not fully take into account all the nuances of the microscopy used; or the difference in the methods of parameters selection, when it comes to modeling. To understand what conditions favour tapering, we used one of the simplest of the kinetic models to investigate in more detail the behaviour of the microtubule tip and, in addition, to conduct control experiments using TIRF microscopy to test the consistency of the hypothesis.

*Key words: Monte Carlo simulation, dynamic instability, TIRF-microscopy, catastrophe mechanism.*

## 1. Введение

Микротрубочки (МТ) представляют собой полярные трубчатые полимеры, сформированные путем самосборки белка тубулина. МТ повсеместно встречаются в эукариотических клетках, где они являются основным компонентом клеточного цитоскелета и участвуют в ряде важных клеточных функций, таких как миграция клеток, морфогенез, внутриклеточный транспорт и деление клеток [1–3]. Основными субъединицами МТ являются гетеродимеры тубулина. Они образованы  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулином – двумя структурно похожими глобулярными белками. Димеры  $\alpha\beta$ -тубулина состыковываются продольно в линейные цепочки тубулина, называемые протофиламентами (ПФ). Некоторое количество (от 9 до 16, обычно 13) таких ПФ, латерально собранных в цилиндр составляют решетку МТ [4, 5].

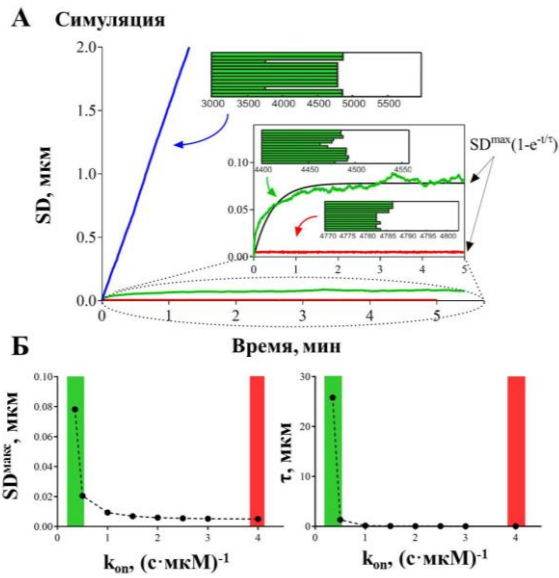
Микротрубочки - не статические образования, они могут многократно и стохастически изменять свою длину, проходя чередующиеся фазы сборки и разборки как *in vivo*, так и *in vitro*. Рост МТ происходит за счет добавления димеров тубулина к концу МТ, где затем протекает реакция гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ) в результате чего субъединицы тубулина претерпевают структурное преобразование, которое дестабилизирует субъединицу тубулина в решетке МТ, и вся микротрубочка переходит к фазе стремительной разборки – катастрофе. Феномен переключений между режимами роста и укорочения называется «динамической нестабильностью» и имеет важное значение для ряда клеточных процессов, таких как разделение хромосом, ремоделирование пространственной организации цитоскелета во время митоза или исследование внеклеточной среды [6]. Понимание факторов, которые регулируют динамическую нестабильность МТ, является центральным для физиологии клетки. Тем не менее, подробное понимание динамической нестабильности все еще не было достигнуто [7, 8].

## 2. Результаты и обсуждение

### 2.1. Димерная кинетическая модель микротрубочки

Для описания динамики микротрубочек мы применили базовый подход кинетической модели.

Хотя переход связанной с тубулином молекулой ГТФ в ГДФ состояние является необходимым требованием для наблюдения катастроф, при изучении заострения им можно пренебречь, поскольку заострение считается свойством присущим всем собирающимся микротрубочкам вне зависимости от их нуклеотидного состояния. Таким образом, для упрощения задачи мы моделировали динамику GMPCPP-тубулиновых микротрубочек, ограничившись тремя неизвестными параметрами, используемыми в моделях кинетических типа [9, 10]: константой присоединения субъединиц к микротрубочке  $k_{on}$  и двумя энергетическими характеристиками лонгитудальной  $E_{long}$  и латеральной  $E_{lat}$  связей. Несмотря на такое количество свободных параметров, поведение конца МТ может быть сведено к достаточно узкому диапазону возможных сценариев благодаря имеющимся экспериментальным наблюдениям за скоростью полимеризации микротрубочек [11, 12]. Из получившихся наборов параметров достаточно рассмотреть два предельных случая: при росте микротрубочек в условиях быстрой (рис. 1,А красная кривая) кинетики обновления субъединиц, когда микротрубочка остается на протяжении всего времени роста с практически неизменным затупленным концом; и медленной (рис. 1,А зеленая кривая) кинетики, где уже присутствует эволюция структуры конца МТ. Однако ни один из них не дает стандартного отклонения длин протофиламентов (SD), принятого здесь в качестве меры заостренности, больше 100 нм, а характерное время достижения стационарного состояния не превышает одной минуты, которого вероятно не достаточно для объяснения старения. Более того, мы заметили, что линейный рост SD, который наблюдался в работе [13], становится возможен только при присваивании позициям на микротрубочке с различным окружением различных кинетических характеристик, что позволяет учитывать стерические ограничения [14]. В то же время это приводит к неправдоподобным концам, с сильно запаздывающими отдельными протофиламентами длиной в несколько микрометров (8 мкм на рис. 1,А), которые были бы зарегистрированы с помощью криоэлектронной микроскопии, если бы существовали на самом деле.

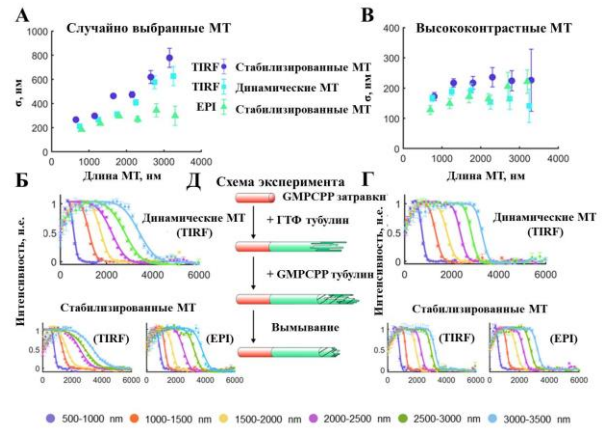


**Рис. 1.** Моделирование развития стандартного отклонения протофиламентов выявило три возможных режима роста микротрубочек (А): красной зависимости соответствует практически мгновенный выход на стационарное значение SD; зеленой – приобретение гетерогенности на конце МТ в течение нескольких минут; синей – линейное нарастание SD, реализуемое только за счет потери подвижности отдельных протофиламентов. Рядом с каждой зависимостью приведены очертания последних слоев микротрубочки, которые они принимают на последней расчетной минуте. Под каждой развернутой формой микротрубочки указано количество димеров, содержащихся в протофиламентах. (Б) Максимально достигаемое значение стандартного отклонения длин протофиламентов (слева) и характерного времени  $\tau$  нарастания (справа) для разных кинетических констант. Зеленым и красным отмечены значения констант, использованных при построении соответствующих графиков (А). Концентрация тубулина 15 мкМ.

## 2.2. Экспериментальная проверка степени заострения МТ

Возникло предположение, что метод TIRF микроскопии может быть не лишен недостатков в плане исследования конца микротрубочки, поскольку в фокусе находится лишь небольшая зона, протяженностью около 100 нм, считая от стекла. Для микротрубочек достигающих микронных размеров, экспериментальные данные могут оказаться недостоверными, поскольку временами конец микротрубочек будет отходить от стекла на расстояние больше фокусного. Проверку данного предположения мы осуществляли постановкой контрольного эксперимента, при котором растили трубочки с заведомо тупыми концами. Для приготовления эталонных микротрубочек после вымывания ГТФ-тубулина, мы кэпировали микротрубочки GMPCPP-тубулином, после чего вымывали весь растворимый тубулин

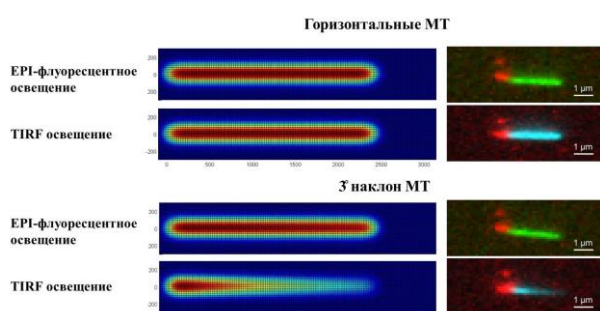
(рис. 2,Д). Согласно современным представлениям, GMPCPP-шапочка должна медленно послыбно разбираться, оставаясь при этом с затупленным концом [15]. Здесь в качестве количественной меры заостренности использовалась полуширина  $\sigma$  спада интенсивности [16]. К примеру, чем конец более неоднородный, тем более плавный склон должен наблюдаться на снятой интенсивности.



**Рис. 2.** *In vitro* эксперименты по проверке гипотезы о заострении микротрубочек. Профили интенсивности флуоресценции, снятые вдоль главной оси микротрубочек и соответствующие им функции ошибок (сплошные линии на Б, Г) для растущих в TIRF освещении и контрольных микротрубочек в TIRF/EPI освещении, полученных по схеме (Д). Сигма значения функции ошибок при обработке случайных кадров (А) и обработке кадров с горизонтально лежащими микротрубочками (Б) указывают на наличие термических флуктуаций, выводящих концы микротрубочек из области четкого видения TIRF-микроскопии. Всего было проанализировано порядка 1000 микротрубочек.

В соответствии с гипотезой о постепенном заострении конца МТ, мы ожидали увидеть постепенное нарастание  $\sigma$  по мере сборки МТ и отсутствие такой тенденции в случае стабилизированных трубочек после вымывания тубулина. Однако в случае контрольных микротрубочек наблюдался схожий рост полуширины спада интенсивности, который уже не может быть объяснен заострением (рис. 2,А и 2,Б). Для того чтобы исключить влияние расфокусировки, мы провели те же измерения с использованием EPI флуоресценции, благодаря тому, что теперь засветка от растворенного тубулина была устранена. В условиях EPI освещения на тех же самых трубочках вид профилей интенсивности практически не менялся со временем (рис. 2,Б). В то же время, если провести более тщательный отбор кадров, дожидаясь для каждой микротрубочки, пока она расположена параллельно покровному стеклу, можно заметить, что во всех случаях конец трубочек затуплен, и его структура не изменится со временем.

В качестве иллюстрации того, как в TIRF-освещении появляются ложно-положительные заострения, мы приводим результаты симуляции (рис. 3 слева) трубочек в двух типах освещения при разных положениях МТ относительно плоскости стекла. Напротив (рис. 3 справа) показаны экспериментальные изображения микротрубочки, которая, осциллируя под воздействием тепловых флуктуаций, в разные моменты времени находится под разными углами к поверхности покровного стекла. Предсказанные симуляцией формы конца микротрубочки находятся в согласии с полученными экспериментальными изображениями: в TIRF наклон хорошо различим и приводит к существенному повышению SD, в то время как в EPI трубочки выглядят практически идентичными вследствие проникновения излучения на большую глубину.



**Рис. 3.** Сравнение предсказания симуляции микротрубочки в двух видах освещения (слева) с полученными экспериментальными изображениями микротрубочки, претерпевающей тепловые колебания. Видно, что одна и та же МТ в разные моменты времени может выглядеть как с затупленным, так и с заостренным концом.

Кроме того, при съемке в TIRF часто происходит недооценка длины микротрубочек. Например, может оказаться так, что довольно длинные микротрубочки около 5–7 мкм в какой-то момент времени могут выйти из фокуса и их эффективная длина снизится до 2–4 мкм, в результате их вклад придется на соответствующие группы. За счет конусовидного конца их  $\sigma$ -значение окажется больше характерного для этой подвыборки, в итоге будет завышаться оценка их заострения. Вдобавок ко всему это может дать заметную концентрационную зависимость. При больших концентрациях тубулина МТ растут быстрее и становятся более гибкими, вследствие образующихся в них дефектов и их рост становится сложнее контролировать. По этой причине, на том же времени съемки образуется больше длинных трубочек, которые могут быть приняты за короткие микротрубочки, если не проводить специальный отбор кадров, а проводить обработку кадров в случайные моменты времени.

### 3. Заключение

Проведенный анализ концов микротрубочек позволил найти параметры в рамках упрощенной кинетической модели микротрубочки, способные описать медленный процесс “заострения” с максимальной величиной заострения меньше оцененной в опубликованных экспериментальных работах. Противоречие в численных оценках было устранено при проведении дополнительных контрольных экспериментов, позволивших обнаружить артефакты TIRF-микроскопии. Результаты полученные в работе приближают нас к пониманию природы ГТФ-шапочки, что является фундаментальным понятием для понимания механизмов, управляющих динамикой МТ, и разработки новых модулирующих соединений, нацеленных на динамику МТ.

### 4. Благодарности

Работа поддержана грантом Президента РФ для молодых ученых № МК-1869.2020.4. Анисимов М.Н. является стипендиатом Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС».

### 5. Список литературы

1. Desai A., Mitchison T.J. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997. V. 13. № 1. P. 83–117.
2. Gupta M., Sarangi B.R., Deschamps J., Nematbakhsh Y., Callan-Jones A., Margadant F., Mège R.-M., Lim C.T., Voituriez R., Ladoux B. Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nature Communications*. 2015. V. 6. Article No. 7525.
3. Fletcher D.A., Mullins R.D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010. V. 463. № 7280. P. 485–492.
4. Mandelkow E.M. On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam, and handedness. *The Journal of Cell Biology*. 1986. V. 102. № 3. P. 1067–1073.
5. Chrétien D., Wade R.H. New data on the microtubule surface lattice. *Biology of the Cell*. 1991. V. 71. № 1–2. P. 161–174.
6. Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 1984. V. 312. № 5991. P. 237–242.
7. Aher A., Akhmanova A. Tipping microtubule dynamics, one protofilament at a time. *Current Opinion in Cell Biology*. 2018. V. 50. P. 86–93.
8. Hemmat M., Castle B.T., Odde D.J. Microtubule dynamics: moving toward a multi-scale approach. *Current Opinion in Cell Biology*. 2018. V. 50. P. 8–13.
9. VanBuren V., Odde D.J., Cassimeris L. Estimates of lateral and longitudinal bond energies within the microtubule lattice. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences*. 2002. V. 99. № 9. P. 6035–6040.
10. Margolin G., Gregoret I.V., Cickovski T.M., Li C., Shi W., Alber M.S., Goodson H.V. The mechanisms of microtubule catastrophe and rescue: implications from analysis of a dimer-scale computational model. *Molecular Biology of the Cell*. 2012. V. 23. № 4. P. 642–656. doi: [10.1091/mbc.E11-08-0688](https://doi.org/10.1091/mbc.E11-08-0688).
  11. Walker R.A. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of Cell Biology*. 1988. V. 107. № 4. P. 1437–1448.
  12. Strothman C., Farmer V., Arpağ G., Rodgers N., Podolski M., Norris S., Ohi R., Zanic M. Microtubule minus-end stability is dictated by the tubulin off-rate. *The Journal of Cell Biology*. 2019. V. 218. P. 2841–2853. doi: [10.1083/jcb.201905019](https://doi.org/10.1083/jcb.201905019).
  13. Coombes C.E., Yamamoto A., Kenzie M.R., Odde D.J., Gardner M.K. Evolving Tip Structures Can Explain Age-Dependent Microtubule Catastrophe. *Current Biology*. 2013. V. 23. № 14. P. 1342–1348. doi: [10.1016/j.cub.2013.05.059](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.059).
  14. Castle B.T., Odde D.J. Brownian Dynamics of Subunit Addition-Loss Kinetics and Thermodynamics in Linear Polymer Self-Assembly. *Biophysical Journal*. 2013. V. 105. № 11. P. 2528–2540.
  15. Hyman A.A., Salser S., Drechsel D.N., Unwin N., Mitchison T.J. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Molecular Biology of the Cell*. 1992. V. 3. № 10. P. 1155–1167. doi: [10.1091/mbc.3.10.1155](https://doi.org/10.1091/mbc.3.10.1155).
  16. Demchouk A.O., Gardner M.K., Odde D.J. Microtubule Tip Tracking and Tip Structures at the Nanometer Scale Using Digital Fluorescence Microscopy. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2011. V. 4. № 2. P. 192–204.