

## Моделирование движения кинетохорного комплекса NDC80 по микротрубочке

Лопанская Ю.Н.<sup>1</sup>, Холина Е.Г.<sup>1,2</sup>, Федоров В.А.<sup>1,2</sup>, Коваленко И.Б.<sup>1,2,3</sup>, Гудимчук Н.Б.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup>Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия

<sup>4</sup>Детский центр гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

[lopanskaia.in14@msu.physics.ru](mailto:lopanskaia.in14@msu.physics.ru)

Свойства взаимодействия хромосом с микротрубочками в митозе во многом зависят от характеристик контактов белкового комплекса NDC80 с тубулином. В данной работе с помощью методов молекулярной динамики было показано, что взаимодействие между NDC80 и микротрубочкой сложное, многокомпонентное. Помимо контактов типа «глобула-глобула», модель указала на существенную роль неструктурированных С-концов тубулина при взаимодействии с субъединицами комплекса NDC80. Это позволяет интерпретировать ранее опубликованные результаты об эффектах точечных мутаций на взаимодействие между NDC80 и микротрубочкой. Используя метод кинетического Монте-Карло моделирования, мы показали, каким образом может происходить взаимодействие между различными доменами комплекса NDC80 и тубулинов при связывании комплекса NDC80 и его диффузии вдоль микротрубочки. Этот анализ позволяет лучше понять молекулярные механизмы работы кинетохора и перемещения хромосом в митозе.

*Ключевые слова:* митоз, кинетохор, микротрубочка, комплекс NDC80, взаимодействие NDC80 – микротрубочка, диффузия NDC80.

## Modeling the Movement of Kinetochore Complex Ndc80 along a Microtubule

Lopanskaia I.N.<sup>1</sup>, Kholina E.G.<sup>1,2</sup>, Fedorov V.A.<sup>1,2</sup>, Kovalenko I.B.<sup>1,2,3</sup>, Gudimchuk N.B.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

The characteristics of the interaction of chromosomes with microtubules in mitosis largely depend on the characteristics of the protein complex NDC80 with tubulin. Using molecular dynamics we have shown that the interaction between NDC80 and a microtubule is complex and multistage. In addition to contacts between the globular domains of the proteins, the modeling has revealed an essential role of unstructured C-termini of tubulin in interaction with subunits of the NDC80 complex. This allows interpreting previously published results about the effects of point mutations on the interaction between NDC80 and microtubule. Using the kinetic Monte Carlo simulation method, we have shown how the interaction between different domains of the NDC80 complex and tubulins can occur upon binding of the NDC80 complex and its diffusion along the microtubule. This analysis provides a better understanding of the molecular mechanisms of kinetochore and chromosome movement during mitosis.

*Key words:* mitosis, kinetochore, microtubule, NDC80 complex, NDC80 - microtubule interaction, NDC80 diffusion.

## 1. Введение

Митоз является сложным процессом, в ходе которого необходимо точное выстраивание метафазной пластинки, при котором возможны неправильные прикрепления микротрубочек к хромосомам. Поэтому кинетохор должен иметь возможность терять неправильный контакт с веретеном деления для образования нового [1]. Основным компонентом эукариотического кинетохора, который обеспечивает прямую связь между хромосомой и микротрубочкой, является белковый комплекс NDC80 [2–4]. Домен, который отвечает за связь с микротрубочкой, состоит из двух белков: Nuf2 и Hec1, последний из которых имеет длинный неструктурированный 80-аминокислотный N-конец. Микротрубочки состоят из белков тубулина, каждый из которых имеет C-концевую неупорядоченную часть. Молекулярные аспекты взаимодействия тубулинов с NDC80 до сих пор не изучены. Так, в кристаллической структуре комплекса микротрубочки и NDC80 наблюдается связь только между глобулярной частью Hec1 и тубулином [5]. Но мутации в белке Nuf2 также ослабляют взаимодействие комплекса NDC80 с микротрубочкой, позволяя предположить, что и белок Nuf2 вносит вклад в связывание с тубулином [5].

Известно, что комплекс NDC80 способен формировать динамический контакт с разбирающейся или собирающейся микротрубочкой [6]. За счет одномерной диффузии вдоль микротрубочки NDC80 способен отслеживать конец микротрубочки [6]. Однако, в то же время, контакты кинетохора с микротрубочкой должны быть достаточно прочными для эффективного перемещения хромосомы [7]. Такие разрозненные на первый взгляд предполагаемые молекулярные свойства NDC80 (высокая аффинность к тубулину и быстрая диффузия [8]) еще предстоит связать в единую модель взаимодействия микротрубочки и кинетохорного комплекса в будущем, так как механизм, лежащий в основе способности NDC80 формировать нагруженный и в то же время динамический контакт, неизвестен.

## 2. Цель работы

Целью настоящей работы являлось определение механизма взаимодействия кинетохорного комплекса NDC80 с микротрубочкой методами молекулярной динамики и кинетического Монте-Карло моделирования.

## 3. Молекулярно-динамическая модель взаимодействия NDC80 и микротрубочки

Нами была построена полноатомная молекулярно-динамическая модель комплекса фрагмента микротрубочки и NDC80 с явным

растворителем на основе данных криоэлектронной микроскопии. Модель включала фрагмент стенки микротрубочки из девяти тубулинов (решетка  $3 \times 3$ ) и две субъединицы комплекса NDC80: Hec1 и Nuf2. В расчете учитывались не только глобулярные домены белков NDC80 и тубулина, но и их важные подвижные неструктурированные цепи на N- и C-концах.

Совокупно, используя метод молекулярной динамики, мы показали, что взаимодействие между комплексом NDC80 и микротрубочкой сложное, многостадийное. Помимо контактов типа «глобула-глобула», модель указала на существенную роль неструктурированных C-концов тубулина при взаимодействии с субъединицами Hec1 и Nuf2. Это объясняет влияние мутаций в домене Nuf2 на взаимодействие между NDC80 и микротрубочкой.

Исходя из полученных данных, можно сказать, что между частями NDC80 и микротрубочки существуют семь разных контактов:

- 1) Hec1 – верхний хвост тубулина;
- 2) Hec1 – глобулярный тубулин;
- 3) Hec1 – нижний хвост тубулина;
- 4) Nuf2 – верхний хвост тубулина;
- 5) Nuf2 – глобулярный тубулин;
- 6) Nuf2 – нижний хвост тубулина;
- 7) Hec1 хвост – тубулин.

Таким образом, молекулярно-динамические симуляции позволяют объяснить влияние экспериментально известных точечных мутаций в домене Nuf2 на взаимодействие между NDC80 и микротрубочкой.

Для дальнейшего моделирования поведения такой сложно взаимодействующей системы мы выбрали метод Монте-Карло, который позволяет моделировать поведение системы на больших временных и пространственных масштабах, чем молекулярная динамика [9].

## 4. Монте-Карло модель взаимодействующих NDC80 и микротрубочки

На данном этапе работы было решено ограничиться моделированием динамического контакта NDC80 и микротрубочки, где кинетохорный комплекс способен диффундировать вдоль микротрубочки. Таким образом, Монте-Карло модель описывает равновесную систему взаимодействующих белков NDC80 и тубулина. На основе данных, полученных из молекулярно-динамических расчетов, можно сказать, что комплекс NDC80, связанный с микротрубочкой, может быть описан с помощью матрицы, состоящей из нескольких элементов. Каждая ячейка матрицы описывает соответствующий контакт между NDC80 и микротрубочкой. При этом содержимым каждого элемента является целое число. Ноль соответствует отсутствию контакта, а любое другое число показывает наличие контакта и номер ряда микротрубочки, занимаемого комплексом NDC80.

В Монте-Карло модели реализованы следующие состояния, которые осуществляют переход между состояниями системы:

- 1) образование контакта;
- 2) его распад;
- 3) перемещение комплекса NDC80 к плюсконцу микротрубочки;
- 4) перемещение комплекса NDC80 к минусконцу микротрубочки;

Первые два события предназначены для обеспечения динамичности контактов NDC80 и микротрубочки. Ввиду того, что диффузия кинетохорного комплекса является одномерной и происходит вдоль микротрубочки [8], должно быть достаточно событий 3 и 4 для моделирования перемещения комплекса NDC80.

Все перечисленные переходы происходят по Монте-Карло алгоритму [10]:

- 1) инициализация начальных состояния системы и времени:  $t = t_0$ ;
- 2) вычисление вероятности каждого возможного события  $k_i$ ;
- 3) вычисление времени, за которое произойдет событие  $i$  по формуле:  $t_i = \frac{-\log(r_i)}{k_i}$ , где  $r_i$  – равномерно распределенное на интервале (0, 1) случайное число;

4) реализация события с наименьшим соответствующим временем. При этом изменяется состояние системы, а время на данном шаге обновляется:  $t \rightarrow t + t_i$ ;

- 5) повторение пунктов 2–4;

При определении вероятности наступления события вычисляются константы скоростей прямой и обратной реакции соединения. Так как комплекс NDC80 в модели рассматривается в связи с микротрубочкой в течение всего времени симуляции, и не берутся во внимание события присоединения комплекса из раствора, то получение скорости присоединения отдельных доменов к микротрубочке осуществляется умножением соответствующей константы скорости на эффективную (локальную) концентрацию NDC80 на микротрубочке ( $concentration_{eff}$ ), которая неизвестна и является параметром модели:

$$k_{on} = k_{plus} \cdot concentration_{eff}$$

Однако оценочно эффективная концентрация для С-концов тубулина рассчитывается следующим образом:

$$concentration_{eff} = \frac{2}{\frac{4}{3}\pi r^3}, \text{ где } r = 2.5\text{нм}, \text{ что}$$

соответствует наиболее вероятной (средней) длине С-конца тубулина. Константа диссоциации связана с энергией взаимодействия  $E$  соответствующих частей NDC80 и микротрубочки:

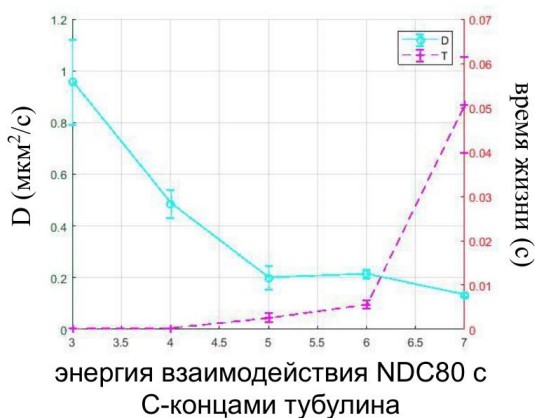
$$k_{off} = k_{plus} \cdot 10^6 \cdot e^{-E}$$

Мы предполагаем, что комплекс NDC80 способен перемещаться по микротрубочке благодаря связи с подвижными С-концами тубулина, связь с которыми была показана в нашей молекулярно-динамической модели и косвенно подтверждается данными мутационного анализа и электронной микроскопии. Ведь при такой связи подвижность хвостов тубулина помогает комплексу NDC80 находить новую позицию на микротрубочке. Глобулярные домены NDC80 обладают высоким сродством к микротрубочке, и, скорее всего, увеличивают аффинность всего комплекса в целом. Из экспериментальных данных известно, что Нес1 хвост также вносит вклад в аффинность связывания всего комплекса с микротрубочкой, давая возможность ее регуляции фосфорилированием [1, 11–13].

С помощью построенной нами модели можно получить траекторию движения комплекса NDC80 на микротрубочке, а, значит, коэффициент диффузии и времени жизни комплекса при определенных параметрах системы.

Нами было показано, что модель, включающая только контакты С-концов тубулинов с глобулярной частью NDC80 недостаточна для описания всех характеристик поведения комплекса. Ведь слабые контакты с хвостами тубулинов позволяют NDC80 быстро диффундировать, но аффинность всего комплекса вследствие этого оказывается невысокой. Добавление в такую систему глобулярных взаимодействий качественно не меняют систему. Так может быть увеличено время жизни комплекса с одновременным уменьшением коэффициентов его диффузии. Однако если предположить, что в NDC80 есть часть, которая увеличивает аффинность всего комплекса, но не мешает диффузии, то это могло бы дать нужный результат. Такой частью мог бы быть N-конец белка Нес1. Действительно, Нес1 хвост является неструктурированным и может иметь свойства, похожие на хвосты тубулина. С другой стороны, он является длинным и положительно заряженным, а, значит, более аффинным к отрицательно заряженной микротрубочке. Можно предположить, что Нес1 обладает гибкостью и позволяет NDC80 диффундировать на соседние мономеры даже в случае, когда контакт Нес1 хвост – микротрубочка сохраняется. В этом состоит его принципиальное отличие от глобулярной части NDC80.

На рисунке 1 видно, что для модели, включающей не только контакты с С-концами тубулинов, но и контакт микротрубочки с Нес1 хвостом, можно подобрать параметры, при которых достижимы по порядку величины экспериментально наблюдаемые коэффициент диффузии и время жизни ( $D = 0.19\text{мк}^2/\text{с}$  и  $\tau = 20\text{мс}$ ).



**Рис. 1.** Модель с гибким Hec1 хвостом и С-концами тубулинов (голубой график показывает зависимость коэффициента диффузии от энергии взаимодействия NDC80 с С-концами тубулинов, розовый график - зависимость времени жизни комплекса от энергии взаимодействия NDC80 с С-концами тубулинов).

## 5. Результаты и выводы

С помощью метода кинетического Монте-Карло моделирования мы показали, что взаимодействие с С-концами тубулина не может значительно увеличить время жизни всего комплекса. Это свойство, по-видимому, обеспечивается за счет Hec1 хвоста и глобулярной части NDC80. Для обеспечения быстрой диффузии необходим гибкий хвост Hec1, который даже в случае его связи с микротрубочкой позволяет NDC80 диффундировать вдоль микротрубочки.

Используя метод молекулярной динамики, мы показали, что взаимодействие между NDC80 и микротрубочкой сложное, многостадийное. Открытый нами механизм существенно отличается от ранее предложенных. Мы считаем, что контакты NDC80 с С-концами тубулинов могут играть большую роль в поведении белкового комплекса. Ранее возможность взаимодействия Nuf2 с глобулярными частями тубулинов было только гипотетическим предположением, а мы получили свидетельство данного события, используя метод молекулярной динамики. Кроме того, наша молекулярно-динамическая модель позволяет объяснить влияние всех мутированных аминокислот на взаимодействие NDC80 с микротрубочкой, что устраняет загадку участия Nuf2 в этом контакте.

Мы надеемся, что полученные нами результаты помогут в дальнейшем построении более детальной модели, точно воспроизводящей экспериментальные данные.

## 6. Благодарности

Работа поддержана грантами РФФИ 20-34-70159 и 17-00-00482 (проект #17-00-00479).

## 7. Список литературы

1. Ruchaud S., Carmena M., Earnshaw W.C. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. V. 8. № 10. P. 798–812. doi: [10.1038/nrm2257](https://doi.org/10.1038/nrm2257).
2. Tooley J., Stukenberg P.T. The Ndc80 complex: integrating the kinetochore's many movements. *Chromosome Res*. 2011. V. 19. № 3. P. 377–391. doi: [10.1007/s10577-010-9180-5](https://doi.org/10.1007/s10577-010-9180-5).
3. Suzuki A., Badger B.L., Salmon E.D. A quantitative description of Ndc80 complex linkage to human kinetochores. *Nature Communications*. 2015. V. 6. № 1. P. 8161. doi: [10.1038/ncomms9161](https://doi.org/10.1038/ncomms9161).
4. Lawrimore J., Bloom K.S., Salmon E.D. Point centromeres contain more than a single centromere-specific Cse4 (CENP-A) nucleosome. *J. Cell Biol*. 2011. V. 195. № 4. P. 573–582. doi: [10.1083/jcb.201106036](https://doi.org/10.1083/jcb.201106036).
5. Ciferri C., Pasqualato S., Screpanti E., Varetto G., Santaguida S., Dos Reis G., Maiolica A., Polka J., De Luca J.G., De Wulf P., Salek M., Rappsilber J., Moores C.A., Salmon E.D., Musacchio A. Implications for Kinetochore-Microtubule Attachment from the Structure of an Engineered Ndc80 Complex. *Cell*. 2008. V. 133. № 3. P. 427–439. doi: [10.1016/j.cell.2008.03.020](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.020).
6. Powers A.F., Franck A.D., Gestaut D.R., Cooper J., Graczyk B., Wei R.R., Wordeman L., Davis T.N., Asbury C.L. The Ndc80 Kinetochore Complex Forms Load-Bearing Attachments to Dynamic Microtubule Tips via Biased Diffusion. *Cell*. 2009. V. 136. № 5. P. 865–875. doi: [10.1016/j.cell.2008.12.045](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.045).
7. Nicklas R.B., Koch C.A. Chromosome micromanipulation. *J. Cell Biol*. 1969. V. 43. № 1. P. 40–50.
8. Zaytsev A.V., Mick J.E., Maslennikov E., Nikashin B., DeLuca J.G., Grishchuk E.L., Surrey T. Multisite phosphorylation of the NDC80 complex gradually tunes its microtubule-binding affinity. *MBoC*. 2015. V. 26. № 10. P. 1829–1844. doi: [10.1091/mbc.e14-11-1539](https://doi.org/10.1091/mbc.e14-11-1539).
9. Henkelman G., Jónsson H. Long time scale kinetic Monte Carlo simulations without lattice approximation and predefined event table. *J. Chem. Phys*. 2001. V. 115. № 21. P. 9657–9666. doi: [10.1063/1.1415500](https://doi.org/10.1063/1.1415500).
10. VanBuren V., Odde D.J., Cassimeris L. Estimates of lateral and longitudinal bond energies within the microtubule lattice. *PNAS*. 2002. V. 99. № 9. P. 6035–6040. doi: [10.1073/pnas.092504999](https://doi.org/10.1073/pnas.092504999).
11. Guimaraes G.J., Dong Y., McEwen B.F., DeLuca J.G. Kinetochore-Microtubule Attachment Relies on the Disordered N-Terminal Tail Domain of Hec1. *Current Biology*. 2008. V. 18. № 22. P. 1778–1784. doi: [10.1016/j.cub.2008.08.012](https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.012).

12. Miller S.A., Johnson M.L., Stukenberg P.T. Kinetochore Attachments Require an Interaction between Unstructured Tails on Microtubules and Ndc80Hec1. *Current Biology*. 2008. V. 18. № 22. P. 1785–1791. doi: [10.1016/j.cub.2008.11.007](https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.007).
13. Cheeseman I.M., Chappie J.S., Wilson-Kubalek E.M., Desai A. The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell*. 2006. V. 127. № 5. P. 983–997. doi: [10.1016/j.cell.2006.09.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.039).