

## Компьютерная модель сборки тубулиновых микротрубочек с изогнутыми протофиламентами на конце

Ульянов Е.В.<sup>1</sup>, Виноградов Д.С.<sup>2</sup>, Атауллаханов Ф.И.<sup>1,2</sup>, Гудимчук Н.Б.<sup>1,2</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

[gudimchuk@phys.msu.ru](mailto:gudimchuk@phys.msu.ru)

Тубулиновые микротрубочки – динамические элементы цитоскелета, пребывающие попеременно в фазах роста и укорочения. Их динамика играет ключевую роль во многих процессах, таких как деление клеток, миграция, поддержание формы клетки. Однако до сих пор не понятны механизмы полимеризации и деполимеризации микротрубочек. В частности, неясна связь между изменением конформации тубулина в результате гидролиза молекулы гуанозинтрифосфата (ГТФ) в его кармане и дестабилизацией микротрубочки. В данной работе, опираясь на последние структурные данные, мы формулируем новую модель полимеризации микротрубочки. Методом броуновской динамики мы показываем, что микротрубочка может собираться путем присоединения изогнутых ГТФ-тубулинов к изогнутым протофиламентам на ее конце. Согласно предсказаниям модели, даже небольшие изменения в латеральных связях, порядка 1–2 кТ способны приводить к переключению микротрубочки от полимеризации к деполимеризации. При этом уменьшение продольных связей необходимо для описания наблюдаемых длин протофиламентов во время разборки микротрубочек.

*Ключевые слова:* микротрубочка, броуновская динамика, изогнутый протофиламент.

## Computer model of tubulin microtubules assembly with curved protofilaments at the tip

Ulyanov E.V.<sup>1</sup>, Vinogradov D.S.<sup>2</sup>, Ataulakhanov F.I.<sup>1,2</sup>, Gudimchuk N.B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University named after M.V. Lomonosov Moscow, Russia

<sup>2</sup>Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology RAS, Moscow, Russia

Tubulin microtubules are dynamic elements of the cytoskeleton, alternating in phases of growth and shortening. Their dynamics play a key role in many processes, such as cell division, migration, and cell shape maintenance. However, the mechanisms of polymerization and depolymerization of microtubules are still not understood. In particular, the relationship between the change in the conformation of tubulin as a result of the hydrolysis of the guanosine triphosphate molecule (GTP) in tubulin pocket and the destabilization of the microtubule is not clear. In this work, based on the latest structural data, we formulate a new model of microtubule polymerization. Using the Brownian dynamics method, we show that the microtubule can be assembled by attaching curved GTP tubulins to the curved protofilaments at its end. According to the model's predictions, even small changes in lateral bonds, about 1–2 kT, can lead to microtubule switching from polymerization to depolymerization. The decrease in longitudinal bonds is also necessary to describe the observed lengths of curved protofilaments during disassembly of microtubules.

*Key words:* microtubule, Brownian dynamics, curved protofilament.

### 1. Введение

В клетках эукариот белок тубулин полимеризуется, образуя полые цилиндрические структуры, называемые микротрубочками. Микротрубочки состоят из 13-и тубулиновых протофиламентов, которые соединены между собой латеральными связями. Они собираются путем

присоединения к своему концу новых димеров тубулина в комплексе с гуанозинтрифосфатом (ГТФ). По мере присоединения к телу микротрубочки тубулины гидролизуют ГТФ, что влияет на конформацию тубулинов и ведет к дестабилизации микротрубочки. В конечном итоге это может привести к переходу микротрубочки к разборке, во время которой олигомеры ГДФ-

тубулина отсоединяются от конца микротрубочки [1].

На сегодняшний день нет единого мнения о механизме дестабилизации микротрубочек в результате гидролиза ГТФ [2, 3]. Согласно классической модели разница между ГТФ- и ГДФ-тубулинами в их равновесной форме [4]. Однако, существует и альтернативная гипотеза, согласно которой формы тубулинов в комплексе с ГТФ и ГДФ одинаковы, но разнятся латеральные связи [5, 6]. Наши последние экспериментальные данные подтверждают скорее вторую из перечисленных идей. Так, согласно криоэлектронной томографии на конце микротрубочек присутствуют изогнутые протофиламенты и во время полимеризации, и во время деполимеризации [7, 8]. Это согласуется и со сведениями о кривизне ГТФ-и ГДФ-тубулинов, полученных из кристаллических структур этих белков в комплексе с белком статмином [6].

## 2. Цель работы

Разработать новую модель микротрубочки для описания полимеризации микротрубочки с изогнутыми протофиламентами на конце и определить, способна ли такая модель непротиворечиво описать совокупность опубликованных наблюдений о динамике микротрубочек в рамках одного набора параметров.

## 3. Компьютерная модель

### 3.1. Описание модели

Алгоритм используемой здесь молекулярной модели микротрубочки был впервые представлен в статье [9]. Вкратце, микротрубочка моделировалась как набор сферических частиц, представляющих собой мономеры тубулина. Мономеры могли двигаться только в соответствующей им радиальной плоскости, т.е. в плоскости, проходящей через ось микротрубочки и соответствующий протофиламент. Таким образом, положение и ориентация каждого мономера полностью определялись тремя координатами: двумя декартовыми координатами центра мономера и углом ориентации. Каждый мономер имел четыре центра взаимодействия на своей поверхности: два центра бокового взаимодействия и два центра продольного взаимодействия. Энергия тубулин-тубулинового взаимодействия зависела от расстояния  $r$  между сайтами взаимодействия на поверхности соседних субъединиц и от угла наклона между соседними мономерами тубулина в протофиламенте.

Боковые и продольные взаимодействия между димерами тубулина определялись потенциалом, имеющим следующий вид:

$$v(r) = A \cdot \frac{r^2}{r_o^2} \cdot \exp\left(-\frac{r}{r_o}\right) - b \cdot \exp\left(-\frac{r^2}{r_o^2}\right), \quad (1)$$

где  $A$  и  $b$  определяли глубину потенциальной ямы и высоту энергетического барьера,  $r_o$  и  $d$  – параметры, задающие ширину потенциальной ямы и форму потенциала в целом. Продольные взаимодействия внутри димера моделировались как неразрывные пружины с квадратичным энергетическим потенциалом  $u(r)$ :

$$u(r) = \frac{1}{2} k \cdot r^2, \quad (2)$$

где  $k$  – жесткость связитубулин-тубулинового взаимодействия.

Энергия изгиба  $g(\chi)$  связана с поворотом мономеров друг относительно друга и также описывалась квадратичной неразрывной функцией:

$$g(\chi) = \frac{B}{2} (\chi - \chi_0)^2, \quad (3)$$

где  $\chi$  – угол между соседними мономерами тубулина в протофиламенте,  $\chi_0$  – равновесный угол между двумя мономерами,  $B$  – изгибная жесткость. Полная энергия микротрубочки записывалась следующим образом:

$$U_{total} = \sum_{n=1}^{13} \sum_{i=1}^{K_n} (v_{k,n}^{lateral} + v_{k,n}^{longitudinal} + u_{k,n} + g_{k,n}), \quad (4)$$

где  $n$  – номер протофиламента,  $i$  – номер мономера в  $n$ -ом протофиламенте,  $K_n$  – число субъединиц тубулина в  $n$ -ом протофиламенте,  $v_{k,n}^{lateral}$  – энергия бокового взаимодействия между мономерами,  $v_{k,n}^{longitudinal}$  – энергия продольного взаимодействия между димерами.

Эволюция системы рассчитывалась с помощью метода Броуновской динамики [10]. Изначальной конфигурацией микротрубочки была короткая «затравка», содержащая 12 мономеров тубулина в каждом протофиламенте. Мы моделировали все тубулины с равновесным углом  $\chi_0 = 0.2$  рад. Координаты всех мономеров системы на  $i$ -ой итерации выражались следующим образом:

$$\begin{cases} q_{k,n}^i = q_{k,n}^{i-1} - \frac{dt}{\gamma_q} \cdot \frac{\partial U_{total}}{\partial q_{k,n}^i} + \sqrt{2k_B T \frac{dt}{\gamma_q}} \cdot N(0,1), \\ \tau_{k,n}^i = \tau_{k,n}^{i-1} - \frac{dt}{\gamma_\tau} \cdot \frac{\partial U_{total}}{\partial \tau_{k,n}^i} + \sqrt{2k_B T \frac{dt}{\gamma_\tau}} \cdot N(0,1), \end{cases} \quad (5)$$

$$\gamma_q = 6\pi\eta, \quad \gamma_\tau = 8\pi r^3 \eta,$$

где  $dt$  – шаг по времени,  $U_{total}$  выражается через (4),  $k_B$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура,  $N(0,1)$  – случайное число из нормального распределения, сгенерированное с помощью алгоритма вихрь Мерсенна [11].  $\gamma_q$  и  $\gamma_\tau$  – вязкостные коэффициенты сопротивления для сдвига и поворота соответственно, рассчитанные для сфер радиуса  $r = 2$  нм.

### 3.1. Калибровка модели

Равновесный угол ГТФ- и ГДФ-тубулинов был выбран одинаковым и равным 0.2 рад/мономер исходя из структурных данных [12].

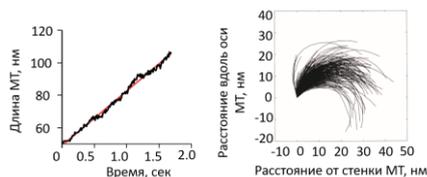
Изгибная жесткость  $B$  была выбрана на основе данных по амплитуде силы, которую может развивать отдельный протофиламент [13, 14]. По нашим оценкам, экспериментально наблюдаемым силам 2–5 пН соответствуют жесткости 35–87.5 ккал/рад/моль.

Параметры латеральных и продольных связей калибровались по скоростям роста и деполимеризации микротрубочек при концентрации свободного тубулина 10 мкМ [15].

## 4. Результаты

### 4.1. Модель описывает рост микротрубочки с изогнутыми протофиламентами на конце

Одним из основных результатов данной работы является установление теоретической возможности полимеризации микротрубочки с экспериментально наблюдаемой скоростью при концентрации 10 мкМ тубулина при наличии на конце микротрубочки изогнутых протофиламентов значительной длины (рис. 1), что хорошо соответствует последним экспериментальным данным [5].



**Рис. 1.** Слева: график зависимости длины микротрубочки от времени в численном эксперименте. Справа: форма изогнутых протофиламентов на конце растущей микротрубочки в том же численном эксперименте.

### 4.2. Модель воспроизводит линейную зависимость скорости микротрубочки от концентрации свободного тубулина

Поскольку на конце микротрубочки в расчетах присутствуют изогнутые протофиламенты, неочевидно, что скорость микротрубочки будет увеличиваться пропорционально концентрации свободного тубулина. Однако, как показывают наши расчеты, это действительно так. Объясняется это тем, что протофиламенты в расчетах вибрируют с большой частотой из-за броуновских флуктуаций. В результате, они многократно выпрямляются в достаточной степени, чтобы иметь возможность сформировать латеральную связи. Поэтому скорость полимеризации лимитируется лишь вероятностью присоединения нового димера тубулина, а не скоростью замыкания латеральных связей.

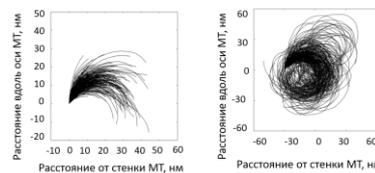
### 4.3. Небольшие изменения в латеральных связях достаточны для переключения микротрубочки от сборки к разборке

Согласно нашим расчетам, даже небольшие изменения в латеральных связях между тубулинами,

порядка 1–2 кТ приводят к переключению микротрубочки от сборки к разборке при условии, что микротрубочка полимеризовалась с длинными изогнутыми протофиламентами на конце, а значит, в режиме, когда энергия изгиба протофиламентов лишь немного меньше, чем энергия формирования латеральной связи.

### 4.4. Модель предсказывает, что изменение и латеральных, и продольных связей необходимо для описания эффекта гидролиза ГТФ на динамику микротрубочки

При этом, несмотря на достаточность небольших изменений в латеральных связях для перехода от сборки к разборке, дополнительное уменьшение продольных связей также необходимо для того, чтобы обеспечить экспериментально наблюдаемую длину изогнутых протофиламентов во время деполимеризации микротрубочек. И действительно, как видно из рисунка 2, если микротрубочка переключается в состояние деполимеризации только за счет латеральных связей, изогнутые протофиламенты оказываются чрезмерно длинными, существенно длиннее, чем при сборке, тогда как в эксперименте формы концов растущей и деполимеризующейся микротрубочки существенно не отличаются [5].



**Рис. 2.** Формы изогнутых протофиламентов на конце деполимеризующейся микротрубочки. Слева: и латеральные и продольные связи уменьшены по сравнению с ГТФ-тубулинами. Справа: уменьшены по сравнению с ГТФ-тубулинами только латеральные связи.

## 5. Выводы

В настоящей работе мы показали, что теоретически возможен режим полимеризации микротрубочек путем присоединения изогнутых ГТФ-тубулинов к изогнутым протофиламентам на конце микротрубочек. Этот механизм существенно отличается от ранее предложенных и позволяет устранить противоречия между структурными данными об изогнутой форме ГТФ тубулина и данными о динамике тубулина. Ключевым предсказанием модели является разница в латеральных и продольных связях между ГТФ- и ГДФ-тубулинами.

## 6. Благодарности

Работа была частично поддержана грантами РФФИ № 16-34-60113, 16-04-01862 и 18-34-00944.

## 7. 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. doi: [10.1146/annurev.cellbio.13.1.83](https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.83).
2. Brouhard G.J., Rice L.M. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2018. V. 19. № 7. P. 451–463. doi: [10.1038/s41580-018-0009-y](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0009-y).
3. Zakharov P.N., Arzhanik V.K., Ulyanov E.V., Gudimchuk N.B., Ataullakhanov F.I. Microtubules: dynamically unstable stochastic phase-switching polymers. *Physics-Uspeski*. 2016. V. 59. № 8. P. 773. doi: [10.3367/UFNe.2016.04.037779](https://doi.org/10.3367/UFNe.2016.04.037779).
4. Mandelkow E.M., Mandelkow E., Milligan R.A. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *The Journal of Cell Biology*. 1991. V. 114. № 5. P. 977–991.
5. Rice L.M., Montabana E.A., Agard D.A. The lattice as allosteric effector: structural studies of alpha-tubulin and gamma-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. V. 105. № 14. P. 5378–5383. doi: [10.1073/pnas.0801155105](https://doi.org/10.1073/pnas.0801155105).
6. Ravelli R.B.G., Gigant B., Curmi P.A., Jourdain I., Lachkar S., Sobel A., Knossow M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*. 2004. V. 428. № 6979. P. 198–202. doi: [10.1038/nature02393](https://doi.org/10.1038/nature02393).
7. McIntosh J.R., O'Toole E., Morgan G., Austin J., Ulyanov E., Ataullakhanov F., Gudimchuk N. Microtubules grow by the addition of bent guanosine triphosphate tubulin to the tips of curved protofilaments. *J. Cell Biol.* 2018. doi: [10.1083/jcb.201802138](https://doi.org/10.1083/jcb.201802138).
8. Höög J.L., Huisman S.M., Sebö-Lemke Z., Sandblad L., McIntosh J.R., Antony C., Brunner D. Electron tomography reveals a flared morphology on growing microtubule ends. *Journal of Cell Science*. 2011. V. 124. № Pt5. P. 693–698. doi: [10.1242/jcs.072967](https://doi.org/10.1242/jcs.072967).
9. Zakharov P., Gudimchuk N., Voevodin V., Tikhonravov A., Ataullakhanov F.I., Grishchuk E.L. Molecular and Mechanical Causes of Microtubule Catastrophe and Aging. *Biophysical Journal*. 2015. V. 109. № 12. P. 2574–2591. doi: [10.1016/j.bpj.2015.10.048](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.10.048).
10. Ermak D.L., McCammon J.A. Brownian dynamics with hydrodynamic interactions. *The Journal of Chemical Physics*. 1978. V. 69. № 4. P. 1352–1360. doi: [10.1063/1.436761](https://doi.org/10.1063/1.436761).
11. Matsumoto M., Nishimura T. Mersenne twister: a 623-dimensionally equidistributed uniform pseudo-random number generator. *ACM Trans. Model. Comput. Simul.* 1998. P. 3–30.
12. Brouhard G.J., Rice L.M. The contribution of alpha-tubulin curvature to microtubule dynamics. *The Journal of Cell Biology*. 2014. V. 207. № 3. P. 323–334. doi: [10.1083/jcb.201407095](https://doi.org/10.1083/jcb.201407095).
13. Grishchuk E.L., Molodtsov M.I., Ataullakhanov F.I., McIntosh J.R. Force production by disassembling microtubules. *Nature*. 2005. V. 438. № 7066. P. 384–388. doi: [10.1038/nature04132](https://doi.org/10.1038/nature04132).
14. Driver J.W., Geyer E.A., Bailey M.E., Rice L.M., Asbury C.L. Direct measurement of conformational strain energy in protofilaments curling outward from disassembling microtubule tips. *ELife*. 2017. V. 6. doi: [10.7554/eLife.28433](https://doi.org/10.7554/eLife.28433).
15. Walker R.A., O'Brien E.T., Pryer N.K., Soboeiro M.F., Voter W.A., Erickson H.P., Salmon E.D. 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.