

## Теоретический анализ механизма спасений микротрубочек за счёт встраиваемых ГТФ островков

Зайцев А.В.<sup>1</sup>, Мустьяца В.В.<sup>1,2</sup>, Гудимчук Н.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова

<sup>2</sup>НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева

[zaycev.aleksandr@physics.msu.ru](mailto:zaycev.aleksandr@physics.msu.ru)

Микротрубочки (МТ) – полимеры белка тубулина – являются одним из ключевых компонентов клеточного цитоскелета. Они обеспечивают движение и деление клеток, выступают в качестве платформ для внутриклеточного транспорта и играют роль во многих других важных клеточных функциях. МТ демонстрируют явление динамической нестабильности: при одинаковых условиях МТ могут расти и укорачиваться, переходя от одной фазы к другой. Переход от роста к укорочению обычно называют катастрофой, а обратный процесс – спасением. На данный момент существует несколько гипотез о возможной природе спасений. Недавно была опубликована гипотеза о механизме спасений посредством определённых зон («островков») из ГТФ-тубулина, которые могут быть образованы из остаточного ГТФ-тубулина от растущего конца микротрубочки или от встраивания свежего ГТФ-тубулина. Ранее нами экспериментально было показано, что распределение длин деполимеризаций МТ перед спасениями имеет в своей форме характерный пик, наличие которого противоречит гипотезе остаточных ГТФ-островков и накладывает ограничения на гипотезу встраивания ГТФ-островков. Для изучения механизма спасений через встраиваемые ГТФ-островки мы сконструировали модель данного феномена. Из результатов моделирования следует, что формирование подобного распределения возможно только при определённых параметрах скорости встраивания островков и времени полу-гидролиза ГТФ-тубулина в них. Также модель предсказывает, что существует зависимость средней длины укорочений МТ перед спасением от предшествующей скорости роста МТ. Полученные следствия моделирования будут проверены экспериментально, и это позволит опровергнуть данный механизм или добавить аргументов в его пользу.

*Ключевые слова:* микротрубочки, динамическая нестабильность, механизм спасений микротрубочек, встраиваемый ГТФ-тубулин, моделирование микротрубочек.

## Theoretical analysis of the mechanism of microtubule rescue due to embedded GTP islands

Zaitsev A.V.<sup>1</sup>, Mustyatsa V.V.<sup>1,2</sup>, Gudimchuk N.B.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology

Microtubules (MT) – elongated polymers of tubulin protein are one of the key components of cellular cytoskeleton. They support cellular motion and division, serve as platform for cellular cargo motion and play a role in many other crucial cellular functions. Microtubules display a phenomenon of dynamic instability: under the same conditions, MTs can both grow and shrink, switching from one phase into the other. Transition from growth to shrinking is usually referred to as catastrophe, and the reverse – as rescue. At the moment there are several hypotheses about the possible nature of rescues. Recently, a hypothesis has been published about the mechanism of rescues through certain zones ("islands") of GTP-tubulin, which can be formed from the residual GTP-tubulin from the growing end of the microtubule or from the embedding of fresh GTP-tubulin. Earlier, we experimentally showed that the distribution of MT depolymerization lengths before rescue has in its form a distinctive peak, the presence of which contradicts the hypothesis of residual GTP-islands and imposes restrictions on the hypothesis of embedding GTP-islands. To study the mechanism of rescue through embedded GTP islands, we constructed a model for this phenomenon. It follows from the simulation results that the formation of such a distribution is possible only for certain parameters of the rate of embedding of the

islets and the time of semi-hydrolysis of GTP-tubulin in them. Also, the model predicts that there is a dependence of the average length of the MT shortenings before rescue from the MT growth rate. The resulting effects of modeling will be tested experimentally, and this will allow to refute this mechanism or add arguments in its favor.

*Key words: microtubules, dynamic instability, microtubule rescue mechanism, embedded GTP tubulin, microtubule modeling.*

## 1. Введение

Микротрубочки представляют собой белковые структуры, которые участвуют в формировании цитоскелета, обеспечивают деление клетки, выступают в качестве платформ для внутриклеточного транспорта и т. д. Деление клетки чрезвычайно сложный химический и механический процесс, который осуществляется за счёт самоорганизации и взаимодействия огромного количества белков.

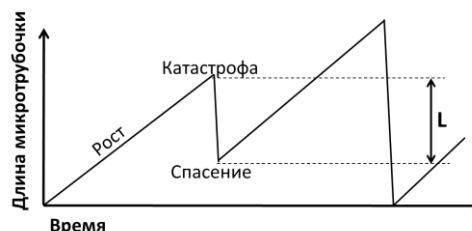
Важную роль в процессе деления клетки играет динамическая нестабильность микротрубочек. Динамическая нестабильность микротрубочек, в частности, помогает находить хромосомы при делении клетки, выравнивать их, и направлять в дочерние [1]. Динамическая нестабильность означает, что при одних и тех же внешних условиях микротрубочка может как расти, так и укорачиваться, и эти фазы сменяют друг друга [2, 3]. Переход от фазы роста к укорочению называют «катастрофой», а обратный процесс называется «спасением» [4]. В течение многих лет исследуется, что происходит с микротрубочкой в моменты этих переходов. На данный момент существует несколько гипотез со том, какие события приводят к «спасению» микротрубочки.

Одной из таких гипотез является гипотеза «ГТФ-островков» [5]. Под ГТФ-островком понимается группа близко расположенных тубулинов с молекулами ГТФ в решётке микротрубочки. При искусственном создании подобных островков, с использованием GMPCPP, медленно гидролизующего аналога GTP, спасения действительно наблюдаются [6]. Другим возможным механизмом является отсоединение изогнутых протофиламентов во время деполимеризации с последующим ростом микротрубочки из метастабильного состояния с тупым концом [7] (гипотеза «рожек»). Также известно о том, что спасения могут вызывать определённые белки, связывающиеся с микротрубочками [8], [9]. В тоже время есть свидетельства того, что спасения наблюдаются и в отсутствии подобных белков, и присущи самим микротрубочкам [10].

Механизм спасений микротрубочек посредством ГТФ-островков может быть реализован по двум сценариям. В первом из них наличие ГТФ-островков в теле микротрубочки объясняется остаточными молекулами ГТФ. При росте микротрубочки на её конец присоединяется тубулин

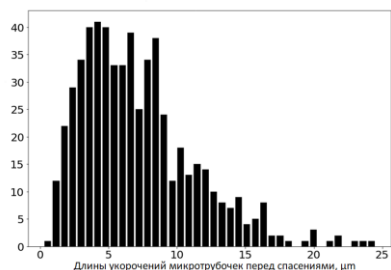
с молекулой ГТФ, которая затем гидролизует до ГДФ [11]. По мере гидролиза ГТФ на растущем конце микротрубочки, часть ГТФ может не успеть гидролизаться и присутствует в решётке микротрубочки на момент начала деполимеризации. Другой вариант может быть объяснён тем, что по мере роста микротрубочки в её решётке происходит обмен тубулина, то есть, встраивается свежий ГТФ-тубулин. Такой эффект «залечивания», вызывающий спасения, был продемонстрирован экспериментально [12, 13]. Однако остаётся неясным, реализуется ли подобный механизм в большинстве наблюдаемых спасений, или это происходит только в редких случаях после сильного повреждения микротрубочек.

Методом, позволяющим получить информацию о механизме спасений, является измерение длин деполимеризаций концов микротрубочек на момент спасений. Длина деполимеризаций отсчитывается от конца микротрубочки на момент её катастрофы до той точки, где микротрубочка переходит к росту (спасается).



**Рис. 1.** Схема измеряемых длин укорочений МТ перед спасениями  $L$  для построения распределения.

Распределение длин деполимеризаций позволяет проверить предсказания гипотез. Ранее нами экспериментально было показано, что форма этого распределения имеет характерный пик. Наличие этого пика говорит о том, что эффект спасений микротрубочек не может быть объяснён механизмом, который предполагает равномерное распределение этих событий по длине микротрубочки. В этом случае наблюдалось бы экспоненциальное распределение укорочений. Тот факт, что в распределении укорочений присутствует пик, указывает на то, что вероятность испытать спасение возрастает по мере деполимеризации микротрубочек.



**Рис. 2.** Распределение длин укороченных микротрубочек от событий катастроф до спасений, полученное в эксперименте.

Это указывает на то, что эффект спасений не может быть объяснён белками, связывающимися с микротрубочкой, или случайными дефектами микротрубочки, которые равновероятно образуются в решётке. Также не подходит и гипотеза остаточных ГТФ-островков, поскольку в этом случае вероятность наличия негидролизованного островка убывает по мере удаления от конца микротрубочки, и форма распределения длин деполимеризаций монотонно убывает.

Из предложенных выше гипотез о механизме спасений, только две из них могут объяснить наличие пика в форме распределений укорочений.

1) Состояние микротрубочки с отпавшими изогнутыми протофиламентами, которое способствует возобновлению роста, и вероятность возникновения которого увеличивается по мере деполимеризации микротрубочки. Возможная природа такого увеличения может быть аналогична эффекту «старения» микротрубочки, при котором эволюция конфигурации её конца во время роста способствует началу деполимеризации – «катастрофе» [14].

2) Встраивание ГТФ-тубулина в тело микротрубочки во время её роста, которое происходит таким образом, что растущий конец микротрубочки оказывается обеднённым в ГТФ-островках.

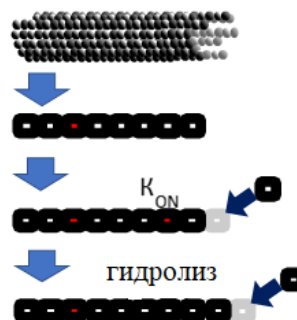
Однако для того, чтобы встраиваемые ГТФ-островки приводили к наблюдаемому распределению укорочений микротрубочек перед спасениями, необходимо, чтобы это встраивание происходило с определёнными кинетическими параметрами. Если характерные времена, на которых происходят события встраивания ГТФ-тубулина и гидролиза ГТФ, существенно быстрее того времени, за которое вырастает микротрубочка, то ближе к концу микротрубочки не будет образовываться зона, обеднённая от ГТФ-островков. Из определённой кинетики встраивания выводится ряд следствий, которые можно проверить экспериментально. Во-первых, микротрубочки, растущие с разной скоростью, должны иметь разный размер обеднённой от ГТФ-островков зоны. У микротрубочек, растущих быстрее, средняя длина деполимеризаций перед спасениями должна быть выше. Во-вторых, если во время роста зафиксировать длину микротрубочки с помощью

GMPCPP-тубулина, подождать некоторое время в присутствии ГТФ-тубулина, чтобы встраивание ГТФ-тубулина в тело микротрубочки происходило равномерно по её длине, и затем индуцировать деполимеризацию микротрубочки, то должно наблюдаться исчезновение пика в форме длин деполимеризаций микротрубочек.

Для того, чтобы сделать количественные предсказания подобных эффектов, для последующей проверки в экспериментах, возникла необходимость моделирования феномена встраиваемых ГТФ-островков.

## 2. Описание модели

В модели микротрубочки рассматриваются как последовательность сегментов по 8 нм (размер тубулина). В модели вводится упрощающее предположение, что такой сегмент отражает кольцо тубулинов. Расчёт эффектов встраивания ГТФ-тубулина, роста микротрубочки и гидролиза ГТФ моделируется как алгоритм добавления сегментов и изменения их состояния с определёнными вероятностями за цикл. Рост микротрубочки осуществляется добавлением одного сегмента на конце микротрубочки в среднем за цикл (стандартная скорость предполагается 1 мкм/мин). Сегменты отличаются двумя состояниями, которые упрощённо отражают наличие в микротрубочке областей с ГТФ или ГДФ тубулином.



**Рис. 3.** Схема моделируемых событий. Последовательно происходит добавление сегмента микротрубочки, встраивание ГТФ-островка и гидролиз ГТФ в этом островке.

При росте микротрубочки на её конец добавляются сегменты в состоянии ГТФ, которые не являются точкой спасения. Любой из уже существующих в микротрубочке сегментов на каждом цикле с равной вероятностью (константа  $K_{ON}$ ) может перейти в состояние ГТФ. Состояние ГТФ, в свою очередь, предполагается точкой гарантированного спасения. Также любой сегмент в состоянии ГТФ на каждом цикле может с равной вероятностью (определяемой временем полу-гидролиза ГТФ) перейти в состояние ГДФ.

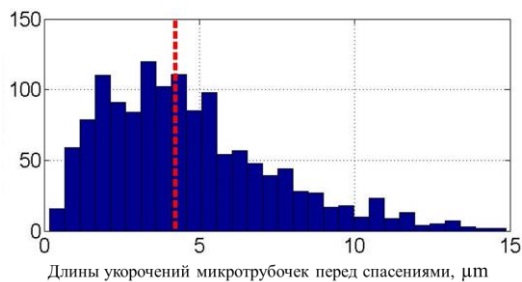
По указанному алгоритму генерируются массивы микротрубочек, рост которых происходит до длин, характерных для экспериментально наблюдаемых микротрубочек (выбирается

аналогичное экспериментальному распределение по длинам). Предполагается, что в этот момент происходит мгновенная деполимеризация микротрубочек (скорость деполимеризации в десятки раз выше скорости полимеризации микротрубочек [4]). Далее микротрубочки анализируются на предмет положения наиболее близкого к концу сегмента в состоянии ГТФ, формируя таким образом распределение точек спасений.

Параметры модели,  $K_{ON}$  и  $K_{hydrolysis}$ , калибруются так, чтобы воспроизводились экспериментальные данные: количество наблюдаемых спасений на количество деполимеризаций и положение наблюдаемого пика в распределении длин деполимеризаций перед спасениями.

### 3. Результаты и выводы

После калибровки параметра  $K_{ON}$  и  $K_{hydrolysis}$  модель воспроизводит форму распределения длин деполимеризаций микротрубочек перед спасениями. Время полу-гидролиза ГТФ-островка полагается равным 4 минутам.



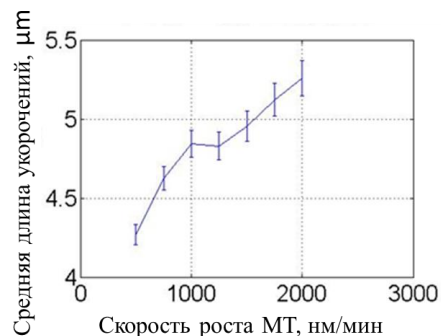
**Рис. 4.** Распределение длин укорочений микротрубочек от событий катастроф до спасений, полученное в модели.

В то же время, изменение параметра  $K_{ON}$  приводит к тому, что пропорционально изменяется количество наблюдаемых спасений на количество деполимеризаций, не влияя при этом на среднюю длину деполимеризации перед спасением. Изменение параметра полу-гидролиза ГТФ влияет на среднюю длину деполимеризации. Между значениями в 2 и 4 минуты разницы практически нет, но если использовать значение полу-гидролиза для одного ГТФ-тубулина в 10 секунд [15], средняя длина деполимеризации оказывается в два раза меньше, чем для времени полу-гидролиза в 4 минуты, а количество наблюдаемых спасений на деполимеризацию уменьшается в 8 раз.

Всё это указывает на то, что для наблюдаемых параметров, таких как форма распределения длин укорочений перед спасениями и количество спасений на деполимеризацию, необходимо, чтобы встраивание ГТФ-островков происходило с определённой кинетикой, а время полу-гидролиза ГТФ-островка как целого было существенно выше 10 секунд.

На модели была проанализирована зависимость длины деполимеризации микротрубочки перед

спасениями от скорости её роста. Для моделирования использовался экспериментально наблюдаемый диапазон скоростей в рамках одной концентрации тубулина и температуры 0.5–2  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Коэффициент корреляции Пирсона между этими параметрами оказался равен 0.1 с  $p\text{-value} \approx 10^{-21}$ . Несмотря на то, что коэффициент корреляции оказывается невысоким в этом диапазоне скоростей, зависимость существует, и просматривается при вычислении средних длин деполимеризации перед спасениями.



**Рис. 5.** Зависимость средней длины деполимеризации микротрубочек перед спасениями от предшествующей скорости роста.

Таким образом, если в экспериментальных данных подтвердится наличие независимости средней длины деполимеризации микротрубочек от скорости роста, а также, если будут измерены кинетика встраивания ГТФ-островков или время их полу-гидролиза, которые будут отличаться от вычисленных значений, это будет аргументом против того, что механизмом большей части спасений микротрубочек является встраивание ГТФ-тубулина.

### 4. Благодарности

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

### 4. Список литературы

1. McIntosh J.R., Grishchuk E.L., West R.R. Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2002. V. 18. P. 193–219.
2. Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 1984. V. 312. № 5991. P. 237–42.
3. Horio T., Hotani H., Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature.* 1986. V. 321. № 6070. P. 605–607.
4. 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 frequency. *J. Cell Biol.* 1988. V. 107. № 4. P. 1437–1448.

5. Dimitrov A., Quesnoit M., Moutel S., Cantaloube I., Poüs C., Perez F. Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science*. 2008. V. 322. № 5906. P. 1353–1356.
6. Tropini C., Roth E.A., Zanic M., Gardner M.K., Howard J. Islands containing slowly hydrolyzable GTP analogs promote microtubule rescues. *PLoS One*. 2012. V. 7. № 1. P. e30103.
7. Tran P.T., Walker R.A., Salmon E.D. A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends. *J. Cell Biol.* 1997. V. 138. № 1. P. 105–117.
8. Pryer N.K., Walker R.A., Skeen V.P., Bourns B.D., Soboeiro M.F., Salmon E.D. Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy. *J. Cell Sci.* 1992. V. 103. P. 965–976.
9. Al-Bassam J., Kim H., Brouhard G., van Oijen A., Harrison S.C., Chang F. CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Dev. Cell*. 2010. V. 19. № 2. P. 245–258.
10. Billger M.A., Bhattacharjee G., Williams R.C., Bhattacharjee G. Dynamic instability of microtubules assembled from microtubule-associated protein-free tubulin: neither variability of growth and shortening rates nor ‘rescue’ requires microtubule-associated proteins. *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 42. P. 13656–13663.
11. Caplow M., Shanks J. Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol. Biol. Cell*. 1996. V. 7. № 4. P. 663–675.
12. Schaedel L., John K., Gaillard J., Nachury M.V., Blanchoin L., Théry M. Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat. Mater.* 2015. V. 14. № 11. P. 1156–1163.
13. Aumeier C., Schaedel L., Gaillard J., John K., Blanchoin L., Théry M. Self-repair promotes microtubule rescue. *Nat. Cell Biol.* 2016. V. 18. № 10. P. 1054–1064.
14. Zakharov P., Gudimchuk N., Voevodin V., Tikhonravov A., Ataulakhanov F.I., Grishchuk E.L. Molecular and Mechanical Causes of Microtubule Catastrophe and Aging. *Biophys. J.* 2015. V. 109. № 12. P. 2574–2591.
15. Melki R., Fievez S., Carlier M.F. Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 37. P. 12038–12045.