

## Компьютерное моделирование динамики и структуры концов микротрубочек

Мустяца В.В.<sup>1,2</sup>, Костарев А.В.<sup>2</sup>, Творогова А.В.<sup>2</sup>, Атауллаханов Ф.И.<sup>1,2,3</sup>,  
Воробьев И.А.<sup>2,4</sup>, Гудимчук Н.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова

<sup>3</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН

<sup>4</sup>Назарбаев Университет, Астана, Казахстан

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

Микротрубочки являются одним из основных компонентов клеточного цитоскелета. Одной из уникальных их характеристик, обеспечивающих выполнение свойственных им клеточных функций, является способность к нахождению в состоянии динамической нестабильности. В исследовании физико-химических механизмов данного состояния ключевую роль играет понимание процессов, происходящих на конце микротрубочки. Одним из наиболее широко используемых способов отслеживания концов микротрубочек являются белки семейства EB, образующие кометообразные зоны связывания на концах растущих микротрубочек. Для более детального понимания наблюдаемых экспериментально профилей белка EB3 необходимо сопоставить их предсказаниям компьютерного моделирования. На базе ранее опубликованной группой Дэвида Оуде кинетической модели нами была разработана модель, позволяющая получать предсказания о форме и динамике зоны связывания белка EB3 и сравнивать их с наблюдаемыми экспериментально. По результатам анализа данной модели нами были сделаны выводы о возможной конфигурации сайта связывания EB3. Наблюдаемые отличия предсказываемых моделью и полученных экспериментально динамических характеристик комет EB3 позволяют сделать вывод о необходимости дальнейшего развития модели, а также предложить направление такого развития.

*Ключевые слова:* математическое моделирование, микротрубочки, динамическая нестабильность, кинетическая модель, EB-белки.

### *In Silico* modeling of microtubule tip dynamics and structure

Mustyatsa V.<sup>1,2</sup>, Kostarev A.<sup>2</sup>, Tvorogova A.<sup>2</sup>, Ataulakhanov F.<sup>1,2,3</sup>, Vorobjev I.<sup>2,4</sup>, Gudimchuk N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology

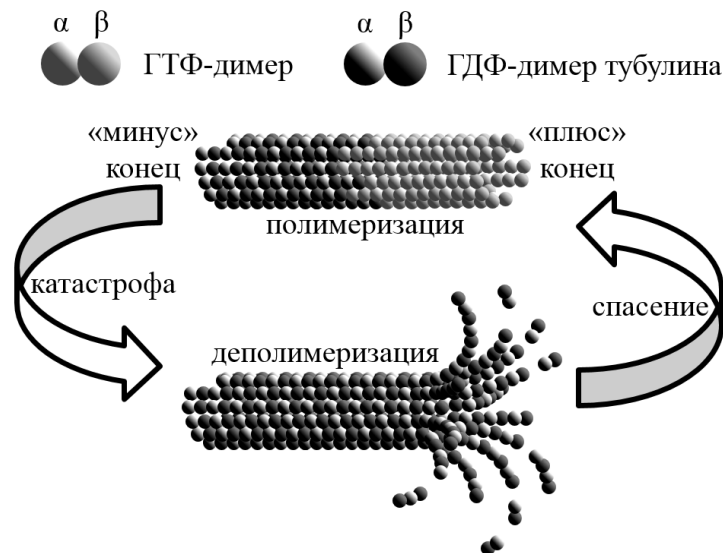
<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University

<sup>3</sup>Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology

<sup>4</sup>Nazarbayev University, Astana, Kazakhstan

Microtubules are one of the main components of the cellular cytoskeleton. One of their unique characteristics, required for the execution of their cellular functions, is their ability to be in a state of dynamic instability. Processes occurring at the end of a growing microtubule play a key role in the study of the chemical and mechanical mechanisms of this state. EB family proteins are one of the most widely used methods for tracking the ends of microtubule. These proteins form comet-like binding zones at the ends of growing microtubules. To gain a more detailed understanding of the experimentally observed EB3 protein profiles, they must be compared to the predictions of computer simulation. Based on the kinetic model published by David Odde, we developed a model that allows us to obtain predictions about the shape and dynamics of the binding zone of EB3 protein and compare them with those observed experimentally. Based on the results of analysis of this model, conclusions about the possible configuration of the EB3 binding site were made. The observed differences between dynamic characteristics of EB3 comets that were predicted by the model and obtained experimentally allow us to conclude that the model should be further developed, as well as suggest direction of such development.

*Key words:* mathematical modeling, microtubules, dynamic instability, kinetic model, EB-proteins.



**Рис. 1.** Общее строение и динамика микротрубочки. Переход от полимеризации к деполимеризации показан только для плюс-конца.

## 1. Введение

Микротрубочки являются одним из основных типов филаментов клеточного цитоскелета. Они присутствуют во всех эукариотических клетках, а их аналоги есть и в прокариотических клетках. Помимо чисто структурной функции они так же играют роль клеточных «магистралей», по которым производится транспортировка грузов, участвуют в формировании веретена деления [1], участвуют в обеспечении клеточной подвижности [2, 3]. Более полное понимание механизма их функционирования важно не только с фундаментальной точки зрения, но и напрямую связано с возможностью терапии имеющих патологическую активность клеточных линий, в частности злокачественных.

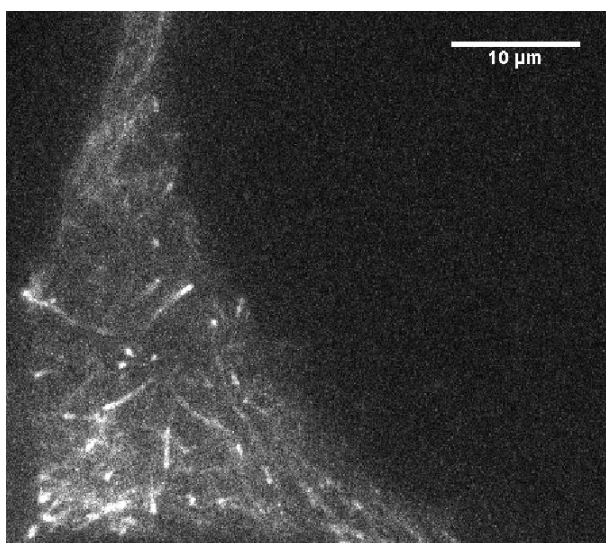
Микротрубочки представляют собой полые цилиндры диаметром 25 нанометров и длиной до нескольких десятков микрометров, образованные за счет полимеризации димеров белка тубулина (см. рис. 1). Такой димер состоит из одного мономера  $\alpha$ -тубулина и одного мономера  $\beta$ -тубулина [4]. При этом цепочки полимера, образованные за счет стыковки димеров по длине и идущие вдоль оси цилиндра микротрубочки, называют протофиламентами. В клетках наиболее распространены микротрубочки, образованные за счет объединения параллельно и со-направленно 13 протофиламентов. Микротрубочки полярны, при этом конец микротрубочки, на котором выставлены оказываются  $\beta$ -мономеры тубулина называют «плюс» концом, а противоположный конец – «минус» концом.

Уникальной особенностью микротрубочек является существование у них режима «динамической нестабильности» – состояния, в котором происходит одновременный рост и

укорочение микротрубочек [5, 6]. При этом отдельные микротрубочки находятся в этих фазах попеременно, периодически переключаясь от роста к укорочению (т.н. «катастрофа»), и назад от укорочения к росту (т.н. «спасение»). Принципиальная возможность перехода от фазы роста к укорочению обеспечивается за счет того, что через некоторое время после присоединения димеры тубулина, изначально связанные с молекулами ГТФ, гидролизуются до ГДФ, в следствии чего это область микротрубочки становится менее устойчивой [7]. Хотя точные физико-химические механизмы, обеспечивающие различные фазы режима динамической нестабильности и переходы между ними, до сих пор изучены слабо, однако из современных данных следует, что ключевую роль всегда играют процессы, происходящие непосредственно на конце микротрубочки – в зоне активного присоединения, гидролиза и отсоединения тубулина [8, 9].

Одним из перспективных направлений в экспериментальном исследовании динамики микротрубочек является использование белков семейства EB (от англ. EndBinding – «связывающиеся на конце»), ключевым свойством которых является способность узнавать и связываться с растущим концом микротрубочки [10]. По современным представлениям белки EB1/3 связываются с участком микротрубочки, в котором ещё не произошел гидролиз молекулы ГТФ в  $\beta$ -субъединице тубулина – так называемым участком «ГТФ-шапочки» [11]. Именно этот участок на сегодняшний день считается структурой, предохраняющей растущую микротрубочку от перехода к деполимеризации. Потеря ГТФ-шапочки ведет к наступлению катастрофы [12]. Аналогично, одним из ключевых этапов спасения микротрубочки является формирование новой ГТФ-шапочки,

сопряженное с возобновлением полимеризации. Так как белки семейства EB способны узнавать ГТФ-шапочку, использование флуоресцентно-меченых EB-белков позволяет визуализировать соответствующую зону в реальном времени как *in vivo*, так и *in vitro*. Визуализируемая посредством флуоресцентной микроскопии, эта зона связывания EB движется вместе с растущим концом микротрубочки. При этом она обладает резким и ярким передним краем и вытянутым, постепенно тускнеющим «хвостом» – за что наблюдаемые структуры были названы «кометами» EB-белка (см. рис. 2). Экспериментальное исследование профилей этих комет позволяет оценить не только размер и динамику самой ГТФ-шапочки, но и детектировать потенциально возникающие зоны вторичного встраивания ГТФ-тубулина в теле микротрубочки, которые, среди прочего, могут способствовать остановке деполимеризации в этой зоне [13, 14].



**Рис. 2.** «Кометы» белка eb3-RFP, снятые в клетках фибробластов линии 3t3.

В процессе проводимого нами экспериментального исследования профилей комет EB3 в клетках *in vivo* возникла необходимость компьютерного моделирования динамики микротрубочек и взаимодействия с ними EB3. Однако, существующие на сегодняшний момент модели, включающие в себя EB-белки, оказываются недостаточно подробными для описания конца микротрубочки с интересующей нас детализацией.

## 2. Цель работы

Создать на основе опубликованных данных математическую модель, которая позволит описать форму и динамику наблюдаемого экспериментально распределения EB-белка микротрубочках.

## 3. Разработка и калибровка модели

Одной из наиболее известных моделей микротрубочки на сегодняшний день является модель группы Дэвида Одде (OddeDJ), впервые

реализованная в работе [15]. В дальнейшем эта модель была доработана [16], и текущая её версия опубликована в формате открытого кода в версии 2016 года.

Кратко, эта модель является классической кинетической моделью, в которой микротрубочка представляет собой последовательность из ячеек, в каждой из которых может быть связан димер тубулина в том или ином состоянии. При этом по ширине присутствуют 13 рядов ячеек, соответствующие 13 протофиламентам микротрубочки, а по длине ячейки добавляются и убавляются по мере роста и укорочения микротрубочки. Последовательность событий присоединения, отсоединения или гидролиза димеров моделируемой микротрубочки определяется по методу Монте-Карло.

На основании опубликованного кода данной модели и параметров, позволяющих описать поведение микротрубочек *in vivo* [17], нами была разработана усложненная модель, в которой добавлено связывание с такой микротрубочкой белка EB3. Для прямого сравнения результатов моделирования с экспериментальными данными в модель дополнительно был введен алгоритм, преобразующий предсказываемое распределение EB3 на микротрубочке в формат кимограмм, аналогичных экспериментальным, с учетом оптических преобразований флуоресцентного сигнала микроскопом, аналогичных экспериментальным. Калибровка основных наблюдаемых характеристик модели (скорость движения кометы, её размер и яркость) была произведена на основании литературных данных о клеточной концентрации тубулина и особенностях освещения в используемом нами экспериментально режиме съемки (TIRF).

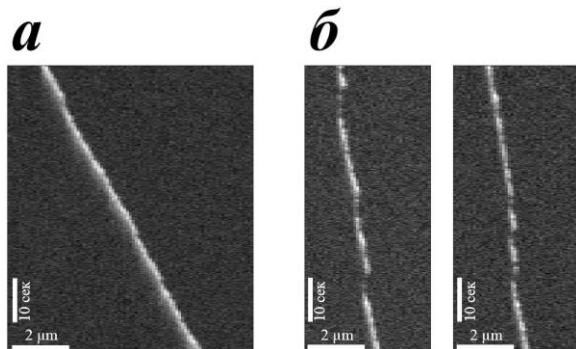
## 4. Результаты и выводы

Сравнение предсказаний нашей модели с экспериментально наблюдаемыми профилями EB3 показало, что эта модель способна удовлетворительно описать большинство наблюдаемых мгновенных профилей комет EB3.

Анализ потенциальных конфигураций сайтов связывания EB3 на микротрубочке, совместных с известными литературными данными [11, 18], показал, что в данной модели экспериментально наблюдаемые профили комет EB3 могут соответствовать различным сочетаниям ГТФ и ГДФ димеров внутри октомера, формирующего сайт связывания. При этом моделью предсказываются различные значения константы гидролиза для различных конфигураций ГТФ и ГДФ. Все они, однако, находятся в рамках диапазона констант гидролиза, опубликованных ранее в литературе.

Модель не предсказывает наличие «вторичных» зон связывания EB3 (см. рис. 3,а), хотя такие зоны присутствуют на некоторых экспериментальных кимограммах. Так же (при параметрах модели,

соответствующих используемых в предыдущих работах) оказывается практически невозможным достигнуть наблюдаемого экспериментально распределения скоростей движения кометы в пределах одного периода роста микротрубочки – при соответствии средних скоростей экспериментально наблюдаемые скорости имеют значительно большую вариацию на частотах порядка нескольких герц. Качественно более схожие распределения могут, однако, быть получены в модели при использовании параметров, переводящих систему в состояние склонности к «микродеполимеризациям» (см. рис. 3,б).



**Рис. 3.** Примеры кимограмм, полученных из модели: (а) кимограмма, полученная в режиме стабильной полимеризации; (б) две кимограммы, иллюстрирующие режим микродеполимеризации – состояние, в котором наблюдается частая и быстрая смена полимеризации на деполимеризацию и обратно.

Таким образом, при использовании в качестве базовой модели микротрубочки кинетическую модель, опубликованную группой Одде, нам удалось описать большинство наблюдаемых мгновенных профилей комет EB3. Было показано, что опубликованные на сегодняшний момент оценки для константы гидролиза не накладывают прямых ограничений на конфигурацию сайта связывания EB3. Существующие проблемы с описанием экспериментально наблюдаемого распределения скоростей и «вторичных» зон связывания EB3 позволяют, однако, говорить о необходимости дальнейшего усложнения модели для более полного описания динамики и структуры конца микротрубочек.

## 5. Благодарности

Работа была поддержана грантами РФФИ № 16-34-60113 и 18-34-00944.

## 6. 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. doi: [10.1146/annurev.cellbio.18.032002.132412](https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.032002.132412).

2. Satir P., Christensen S.T. Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu. Rev. Physiol.* 2007. V. 69. P. 377–400. doi: [10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236).
3. Tanaka E.M., Kirschner M.W. Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J. Cell Biol.* 1991. V. 115. P. 345–363.
4. Hawkins T., Mirigian M., Selcuk Yasar M., Ross J.L. Mechanics of microtubules. *J. Biomech.* 2010. V. 43. P. 23–30. doi: [10.1016/j.jbiomech.2009.09.005](https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.09.005).
5. Cassimeris L., Pryer N.K., Salmon E.D. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* 1988. V. 107. P. 2223–2231. doi: [10.1083/jcb.107.6.2223](https://doi.org/10.1083/jcb.107.6.2223).
6. Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 1984. V. 312. P. 237–242.
7. Desai A., Mitchison T.J. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997. V. 13. P. 83–117. doi: [10.1146/annurev.cellbio.13.1.83](https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.83).
8. Lansbergen G., Akhmanova A. Microtubule Plus End: A Hub of Cellular Activities. *Traffic.* 2006. V. 7. P. 499–507. doi: [10.1111/j.1600-0854.2006.00400.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00400.x).
9. Akhmanova A., Steinmetz M.O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. P. 309–322. doi: [10.1038/nrm2369](https://doi.org/10.1038/nrm2369).
10. Mustyatsa V.V., Boyakhchyan A.V., Ataullakhanov F.I., Gudimchuk N.B. EB-family proteins: Functions and microtubule interaction mechanisms. *Biochem. Mosc.* 2017. V. 82. P. 791–802. doi: [10.1134/S0006297917070045](https://doi.org/10.1134/S0006297917070045).
11. Maurer S.P., Fourniol F.J., Bohner G., Moores C.A., Surrey T. EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. *Cell.* 2012. V. 149. P. 371–382. doi: [10.1016/j.cell.2012.02.049](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.049).
12. Duellberg C., Cade N.I., Holmes D., Surrey T. The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. *ELife.* 2016. V. 5. doi: [10.7554/eLife.13470](https://doi.org/10.7554/eLife.13470).
13. de Forges H., Pilon A., Cantaloube I., Pallandre A., Haghiri-Gosnet A.-M., Perez F., Poüs C. Localized Mechanical Stress Promotes Microtubule Rescue. *Curr. Biol. CB.* 2016. V. 26. P. 3399–3406. doi: [10.1016/j.cub.2016.10.048](https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.048).
14. Aumeier C., Schaedel L., Gaillard J., John K., Blanchoin L., Théry M. Self-repair promotes microtubule rescue. *Nat. Cell Biol.* 2016. V. 18. P. 1054–1064. doi: [10.1038/ncb3406](https://doi.org/10.1038/ncb3406).
15. Van Buren V., Odde D.J., Cassimeris L. Estimates of lateral and longitudinal bond energies within the microtubule lattice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002. V. 99. P. 6035–6040. doi: [10.1073/pnas.092504999](https://doi.org/10.1073/pnas.092504999).
16. Castle B.T., Odde D.J. Brownian dynamics of subunit addition-loss kinetics and thermodynamics

- in linear polymer self-assembly. *Biophys. J.* 2013. V. 105. P. 2528–2540. doi: [10.1016/j.bpj.2013.10.009](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.10.009).
17. Mechanisms of kinetic stabilization by the drugs paclitaxel and vinblastine. *PubMed – NCBI*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298489> (дата обращения: 16.08.2018).
18. Zhang R., Alushin G.M., Brown A., Nogales E. Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell*. 2015. V. 162. P. 849–859. doi: [10.1016/j.cell.2015.07.012](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.012).