

Разработка модели взаимодействия белка EB1 с микротрубочкой

Анисимов М.Н.¹, Александрова В.В.², Саранцева М.Ю.¹, Гудимчук Н.Б.^{1,2,3}

¹Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия
³Детский центр гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

amih199898@gmail.com

Динамически нестабильные микротрубочки состоят из белка тубулина и являются элементами цитоскелета. Вместе с другими внутриклеточными полимерами и белками микротрубочки поддерживают структуру клетки, обеспечивают её подвижность, осуществляют внутриклеточный транспорт и разделяют хромосомы по двум дочерним клеткам во время деления. Среди белков, ассоциированных с микротрубочками, одним из самых распространённых является белок EB1, отличающийся способностью локализоваться на растущих концах микротрубочек, следовать за ними и значительно влиять на параметры динамической нестабильности. Механизмы такого специфического распознавания остаются предметом споров, а механизмы регуляции динамики микротрубочек практически не исследованы. Мы разработали стохастическую модель взаимодействия белка EB1 с микротрубочкой, в которой аффинность связывания белка EB1 с тубулином зависит от его нуклеотидного состояния. Это позволяет описать экспериментальные данные о локализации белка EB1 в области вблизи растущего конца микротрубочки. В соответствии с существующими экспериментальными данными протяженность этой области растет при увеличении концентрации свободного тубулина. Таким образом, нуклеотидно-зависимый характер связывания белка EB1 с тубулином объясняет механизм его специфического распознавания полимеризующихся концов микротрубочек. Предложенная модель может быть использована в дальнейшем для изучения влияния белка EB1 на параметры динамической нестабильности микротрубочки.

Ключевые слова: микротрубочки, димер тубулина, белок EB1, компьютерное моделирование.

Development of the Model of Eb1-Microtubule Interaction

Anisimov M.N.¹, Alexandrova V.V.², Sarantseva M.Yu.¹, Gudimchuk N.B.^{1,2,3}

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology RAS, Moscow, Russia

³Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

Microtubules are highly dynamic tubulin polymers which form cytoskeleton with a help of other intracellular polymers and microtubule associated proteins. Along with other cellular filaments, they enable motility of the cell, define its structure, and provide intracellular transport and chromosome segregation during cell division. One of the most ubiquitous microtubule associated proteins is EB1. Its remarkable feature is the ability to recognize growing microtubule ends and tracking with them. EB1 can significantly affect the parameters of dynamic instability of the microtubules. The mechanism of such a specific recognition of the growing microtubule ends is under debate, and the mechanism of microtubule dynamics regulation is poorly investigated. Here we have developed a stochastic model of EB1-microtubule interaction based on the assumption that the affinity of the interaction depends on the nucleotide state of the tubulin dimers. That assumption has allowed us to describe the experimental data for EB1 localization at the growing microtubule tips. In agreement with the experiments, in the model the EB1 localization area becomes larger as the free tubulin concentration increases. Thus, the nucleotide-dependent EB1-tubulin binding explains the specific ability of EB1 to track with the microtubule growing ends. The proposed model can be useful for further investigation of EB1 effects on microtubule dynamic instability parameters.

Key words: microtubules, tubulin dimers, EB1, computer simulation.

1. Введение

Микротрубочки вместе с другими полимерами образуют цитоскелет и выполняют множество функций внутри клетки. Белок тубулин, из которого состоят микротрубочки, входит в их состав в виде димеров, состоящих из α - и β -мономеров. За счет продольных контактов между димерами образуются протофиламенты, а взаимодействие в поперечном направлении между протофиламентами позволяет им замкнуться в полый цилиндр. Конец микротрубочки, представленный β -мономерами, принято называть «плюс»-концом, а α -мономерами – «минус»-концом. Количество протофиламентов в клеточных микротрубочках обычно равно 13 [1]. Недавно полученные данные криоэлектронной томографии о структуре полимеризующихся и деполимеризующихся концов микротрубочек [2], а также результаты подробной интерпретации этих данных с использованием метода броуновской динамики [3] позволили установить механизм динамического поведения микротрубочек. Так, полимеризация происходит за счет присоединения свободных димеров тубулина с молекулой гуанозинтрифосфата (ГТФ) в своём составе к загнутым концевым участкам протофиламентов с последующим их выпрямлением и образованием поперечных связей. Деполимеризация происходит в обратном порядке после того, как критическое количество молекул ГТФ гидролизуется до гуанозиндифосфата (ГДФ) в составе димеров тубулина вблизи конца микротрубочки [4]. Фазы полимеризации и деполимеризации спонтанно сменяют друг друга, что является уникальным свойством микротрубочек и называется динамической нестабильностью [5]. Динамическая нестабильность играет ключевую роль в обеспечении функций микротрубочек в клетке.

Помимо тубулина, большое разнообразие внутриклеточных белков включает в себя белки, ассоциированные с микротрубочками. Среди них белки семейства EB (аббревиатура от англ. End Binding) присутствуют во всех клетках эукариот. Они отличаются уникальной способностью присоединяться к растущим концам микротрубочек и следовать за ними [6]. EB1 – один из таких белков. Он влияет на параметры динамической нестабильности и способен усиливать эффекты других ассоциированных белков [7, 8]. Область локализации белка EB1 представляет собой протяженный участок на растущем конце в виде так называемой «кометы». Существующие экспериментальные данные показывают, что длина кометы становится больше при увеличении концентрации свободного тубулина. Имеющиеся интерпретации этого явления основаны на предположении о том, что белок EB1 распознаёт стабилизирующий участок на конце

микротрубочки, обогащенный димерами тубулина с ГТФ в своём составе [6, 9]. Это подтверждается исследованием поведения кометы с использованием флуоресцентно меченого белка EB1 с помощью TIRF микроскопии [10]. Помимо этого, использование негидролизующихся аналогов ГТФ позволило оценить аффинность белка EB1 к димерам тубулина в теле микротрубочки с разными нуклеотидами в своём составе [11]. Простые кинетические модели [12, 13] пролили свет на механизм формирования кометы, однако не позволили установить связь между специфической локализацией белка EB1 и его эффектами на параметры динамической нестабильности. Понимание механизмов модуляции динамической нестабильности белком EB1 требует разработки более детальной модели.

2. Цель работы

Разработать детальную модель взаимодействия белка EB1 с динамической микротрубочкой и установить с её помощью механизм специфической локализации этого белка вблизи растущего конца микротрубочки.

3. Компьютерная модель

3.1. Описание модели

На основе наших данных о структуре растущих и укорачивающихся концов микротрубочки здесь предложена модифицированная версия стохастической модели, развитой в работе [14]. Оригинальная версия модели позволяет исследовать параметры динамической нестабильности микротрубочки на больших временных интервалах. В ней используется стохастический метод Монте-Карло для описания эволюции системы в виде временной последовательности заранее определённых событий [15]. Ключевыми отличиями нашей модели является дополнительное рассмотрение конформационных состояний димеров тубулина и взаимодействия микротрубочки с белком EB1.

Тело микротрубочки моделируется с помощью таблицы, каждая ячейка которой соответствует одному димеру тубулина. 13 столбцов таблицы соответствуют протофиламентам, причем первый и последний столбцы являются соседними. Каждой ячейке таблицы присваивается определенное число, соответствующее наличию или отсутствию димера тубулина, а также нахождению ГТФ или ГДФ в его составе. Взаимодействия между димерами характеризуются энергиями продольных и поперечных связей (E_{long} , E_{lat}) и зависят от нуклеотидных состояний соседних димеров. Вероятности событий перехода между данными состояниями задаются с помощью соответствующей константы присоединения k_{on} и отсоединения k_{off}

димеров (1), а также константой гидролиза ГТФ k_{hydr} . На каждой итерации симуляции определяется наиболее вероятное событие, соответствующее наименьшему интервалу времени, в течение которого оно происходит. Затем система обновляется в соответствии с произошедшим событием. Мы добавили рассмотрение двух конформационных состояний димеров, так называемых «прямых» и «изогнутых», которые экспериментально обнаруживаются в решетке микротрубочки, на её концах и в растворе. В нашей модели каждый из димеров может принимать любую из конформаций независимо от своего нуклеотидного состояния. Дополнительные события описывают переходы между конформационными состояниями с помощью константы выпрямления k_{str} , константы изгиба k_{bend} , энергии изгиба E_{bend} и энергии латеральной связи, E_{lat} . Эти параметры связаны формулой (2), причем значение энергии в показателе экспоненты определяется суммой E_{bend} и aE_{lat} , где a равно количеству разрушающихся поперечных контактов при изгибании димера.

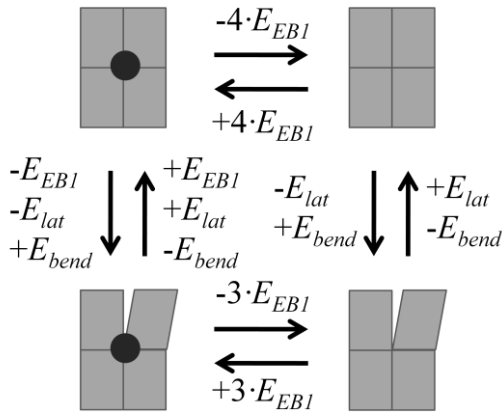


Рис. 1. Показаны основные состояния димеров тубулина кроме нуклеотидного: прямая и изогнутая конформации, взаимодействие с белком EB1 (черный круг). Стрелками показаны возможные переходы между состояниями, рядом с ними указаны соответствующие изменения в энергии системы.

Моделирование взаимодействия белка EB1 с микротрубочкой осуществлено с помощью включения в модель микротрубочки дополнительных модификаций. Данные электронной микроскопии [16] показывают, что сайт связывания белка EB1 располагается между четырьмя димерами тубулина. Помимо этого, известно, что белок EB1 не взаимодействует с расторгнутым тубулином [17]. Поэтому в нашей модели связывание белка EB1 с каждым из димеров тубулина соответствует дополнительному состоянию соответствующих ячеек таблицы (рис. 1). Энергия связывания белка EB1 с димером тубулина E_{EB1} зависит от его нуклеотидного состояния и вместе с константой связывания, $k_{\text{on_EB1}}$, и константой отсоединения, $k_{\text{off_EB1}}$, определяет вероятность присоединения белка EB1 к телу

микротрубочки и отсоединения от него. В выражении (3), связывающим константы присоединения и отсоединения белка EB1, энергия в показателе экспоненты зависит от E_{EB1} и определяется количеством связей белка EB1 с димерами, которые разрываются при его отсоединении от тела микротрубочки. В предположении, что наличие загнутых димеров нарушает сайт связывания белка EB1, в нашей модели он может связываться только с прямыми димерами.

$$k_{\text{off}} = k_{\text{on}} e^{E_{\text{long}}}, \quad (1)$$

$$k_{\text{bend}} = k_{\text{str}} e^{E(E_{\text{bend}}, E_{\text{lat}})}, \quad (2)$$

$$k_{\text{off_EB1}} = k_{\text{on_EB1}} e^{E(E_{\text{EB1}})}. \quad (3)$$

3.2. Калибровка модели

Экспериментальные данные [17–19, 2, 21] о зависимости скорости полимеризации и деполимеризации «плюс»-конца микротрубочки, а также частоты переключений фазы полимеризации на деполимеризацию от концентрации свободного тубулина позволили провести калибровку энергий продольных и поперечных контактов между димерами и константы гидролиза. Константы присоединения, выпрямления и энергии изгиба ($k_{\text{on}} = 0.6 \text{ с}^{-1} \cdot \text{мкМ}^{-1}$, $k_{\text{str}} = 100 \text{ с}^{-1}$, $E_{\text{bend}} = 4.2 \text{ кТ}$, соответственно) взяты из работы [3]. Константа присоединения белка EB1 $k_{\text{on_EB1}}$ равна $0.15 \text{ с}^{-1} \cdot \text{нМ}^{-1}$, энергии связывания белка EB1 с каждым из четырех димеров (E_{EB1}) равны -2.8 и -4.6 кТ в случае ГТФ и ГДФ димеров, соответственно; калибровка значений этих величин проведена по данным [11]. Для описания экспериментальных данных о длине кометы при разных концентрациях свободного тубулина [12] мы предположили, что белок EB1 ускоряет гидролиз ГТФ в димерах тубулина, с которыми он связан, поэтому константа гидролиза ГТФ $k_{\text{hydr_EB1}}$ в случае наличия связи между соответствующим димером и белком EB1 равна 0.23 с^{-1} , что существенно больше значения той же константы в случае отсутствия связи димера с белком EB1 ($k_{\text{hydr}} = 0.08 \text{ с}^{-1}$).

4. Результаты

4.1. Модель позволяет описать локализацию белка EB1 на «плюс»-конце микротрубочки в виде кометы

Типичный вид кометы флуоресцентно меченого белка EB1 в TIRF эксперименте показан на рисунке 2,а с помощью кимограммы, которая отражает локализацию белка EB1 на растущем «плюс»-конце микротрубочки в последовательные моменты времени. Для наблюдения кометы на растущем «плюс»-конце микротрубочки в симуляции с использованием тех же концентраций белка EB1 (150 нМ) и свободного тубулина (15 мкМ) построена аналогичная кимограмма (рис. 2,б). В данном случае предполагалось, что

интенсивность флуоресценции белка EB1 пропорциональна количеству занятых им сайтов в определенном положении вдоль оси микротрубочки. Помимо этого, учитывались оптические преобразования, создаваемые микроскопом.

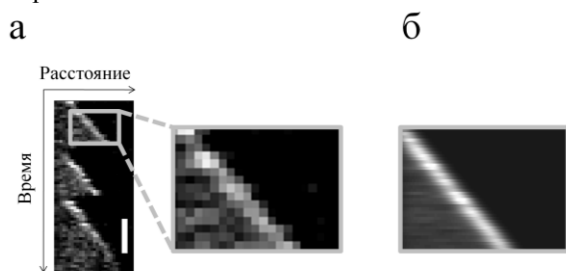


Рис. 2. а) Экспериментальная кимограмма и её увеличенная область. б) Симуляционная кимограмма аналогичного участка роста микротрубочки. Масштабный отрезок соответствует 2 мин.

4.2. Длина кометы становится больше при увеличении концентрации тубулина

Согласно экспериментальным данным [12], длина кометы белка EB1 пропорциональна концентрации свободного тубулина (рис. 3). В этой работе концентрация белка EB1 равна 1 нМ, а комета измерена по длине участка с экспоненциальным спадом интенсивности флуоресценции в направлении «минус»-конца микротрубочки. Значение скорости гидролиза ГТФ в димерах тубулина, связанных с белком EB1, полученное в результате проведения калибровки, позволило воспроизвести эти экспериментальные данные (рис. 3).

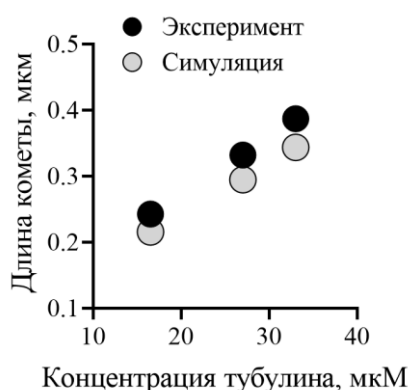


Рис. 3. Показана зависимость длины кометы от концентрации свободного тубулина. Черные круги соответствуют экспериментальным данным [12], серые – результатам симуляции. В обоих случаях погрешность находится в пределах размера кругов.

5. Выводы

В данной работе мы разработали детальную модель взаимодействия белка EB1 с динамической микротрубочкой. Результаты моделирования позволили заключить, что зависимость аффинности белка EB1 к димерам тубулина от их нуклеотидного состояния объясняет локализацию белка EB1 на растущем «плюс»-конце микротрубочки в виде кометы. Длина кометы растёт при увеличении концентрации свободного тубулина, что соответствует современным экспериментальным данным. Мы считаем, что данная модель может быть впоследствии использована для изучения параметров динамической нестабильности микротрубочки в присутствии белка EB1.

3. Благодарности

Анисимов М.Н. является стипендиатом Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС». Работа была поддержана грантом президента РФ № МК-1869.2020.4.

4. Список литературы

1. Tilney L.G., Bryan J., Bush D.J., Fujiwara K., Mooseker M.S., Murphy D.B., Snyder D.H. Microtubules: Evidence for 13 protofilaments. *Journal of Cell Biology*. 1973. V. 59. № 2. P. 267–275. doi: [10.1083/jcb.59.2.267](https://doi.org/10.1083/jcb.59.2.267).
2. Richard McIntosh J., 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. *Journal of Cell Biology*. 2018. V. 217. № 8. P. 2691–2708. doi: [10.1083/jcb.201802138](https://doi.org/10.1083/jcb.201802138).
3. Gudimchuk N.B., Ulyanov E.V., Toole E.O., Page C.L., Vinogradov D.S., Morgan G., Li G., Moore J.K., Szczesna E., Roll-mecak A., Ataullakhanov F.I., Mcintosh J.R. Mechanisms of microtubule dynamics and force generation examined with computational modeling and electron cryotomography. *Nature Communications*. 2020. V. 11. № 1. P. 1–15. doi: [10.1038/s41467-020-17553-2](https://doi.org/10.1038/s41467-020-17553-2).
4. 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).
5. Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 1984. V. 312. № 5991. P. 237–242. doi: [10.1038/312237a0](https://doi.org/10.1038/312237a0).
6. Bieling P., Laan L., Schek H., Munteanu E.L., Sandblad L., Dogterom M., Brunner D., Surrey T. Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature*. 2007. V. 450. № 7172. P. 1100–1105. doi: [10.1038/nature06386](https://doi.org/10.1038/nature06386).

7. Vitre B., Coquelle F.M., Heichette C., Garnier C., Chrétien D., Arnal I. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. *Nature Cell Biology*. 2008. V. 10. № 4. P. 415–421. doi: [10.1038/ncb1703](https://doi.org/10.1038/ncb1703).
8. Zanic M., Widlund P.O., Hyman A.A., Howard J. Synergy between XMAP215 and EB1 increases microtubule growth rates to physiological levels. *Nature Cell Biology*. 2013. V. 15. № 6. P. 688–693. doi: [10.1038/ncb2744](https://doi.org/10.1038/ncb2744).
9. Zanic M., Stear J.H., Hyman A.A., Howard J. EB1 recognizes the nucleotide state of tubulin in the microtubule lattice. *PLoS ONE*. 2009. V. 4. № 10. P. 1–5. doi: [10.1371/journal.pone.0007585](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007585).
10. Duellberg C., Cade N.I., Holmes D., Surrey T. The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. *eLife*. 2016. V. 5. № 4. P. 1–23. doi: [10.7554/eLife.13470](https://doi.org/10.7554/eLife.13470).
11. Roth D., Fitton B.P., Chmel N.P., Wasiluk N., Straube A. Spatial positioning of EB family proteins at microtubule tips involves distinct nucleotide-dependent binding properties. *Journal of Cell Science*. 2019. V. 132. № 4. doi: [10.1242/jcs.219550](https://doi.org/10.1242/jcs.219550).
12. Mustyatsa V.V., Kostarev A.V., Tvorogova A.V., Ataulakhanov F.I., Gudimchuk N.B., Vorobjev I.A. Fine structure and dynamics of EB3 binding zones on microtubules in fibroblast cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2019. V. 30. № 17. P. 2105–2114. doi: [10.1091/mbc.E18-11-0723](https://doi.org/10.1091/mbc.E18-11-0723).
13. Maurer S.P., Cade N.I., Bohner G., Gustafsson N., Boutant E., Surrey T. EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics. *Current Biology*. 2014. V. 24. № 4. P. 372–384. doi: [10.1016/j.cub.2013.12.042](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.042).
14. 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. doi: [10.1073/pnas.092504999](https://doi.org/10.1073/pnas.092504999).
15. Gillespie D.T. A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *Journal of Computational Physics*. 1976. V. 22. № 4. P. 403–434. doi: [10.1016/0021-9991\(76\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0021-9991(76)90041-3).
16. 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. № 2. P. 371–382. doi: [10.1016/j.cell.2012.02.049](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.049).
17. Mustyatsa V.V., Boyakhchyan A.V., Ataulakhanov F.I., Gudimchuk N.B. EB-family proteins: Functions and microtubule interaction mechanisms. *Biochemistry (Moscow)*. 2017. V. 82. № 7. P. 791–802. doi: [10.1134/S0006297917070045](https://doi.org/10.1134/S0006297917070045).
18. 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. *The Journal of Cell Biology*. 1988. V. 107. № 4. P. 1437–1448. doi: [10.1083/jcb.107.4.1437](https://doi.org/10.1083/jcb.107.4.1437).
19. Chrétien D., Fuller S.D., Karsenti E. Structure of growing microtubule ends: Two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *Journal of Cell Biology*. 1995. V. 129. № 5. P. 1311–1328. doi: [10.1083/jcb.129.5.1311](https://doi.org/10.1083/jcb.129.5.1311).
20. Brouhard G.J., Stear J.H., Noetzel T.L., Al-Bassam J., Kinoshita K., Harrison S.C., Howard J., Hyman A.A. XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase. *Cell*. 2008. V. 132. № 1. P. 79–88. doi: [10.1016/j.cell.2007.11.043](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.043).
21. 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. *Journal of Cell Biology*. 2019. V. 218. № 9. P. 2841–2853. doi: [10.1083/jcb.201905019](https://doi.org/10.1083/jcb.201905019).