

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЦЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ЦТП ФХФ РАН)

УДК 577.3.01 577.38 577.3:51-76

Рег. № НИОКТР АААА-А17-117112470049-3

Рег. № ИКРБС



УТВЕРЖДАЮ

ВРИО директора ЦТП ФХФ РАН

д-р физ.-мат. наук, член-корр. РАН, проф. РАН

М.А. Пантелеев М.А. Пантелеев

«24» сентября 2020 г.

МП

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная
биология и постгеномные технологии»


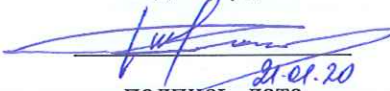

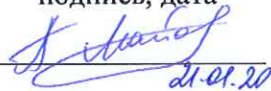
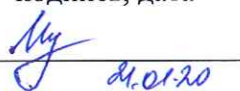
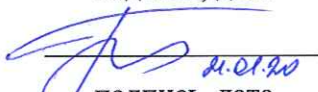
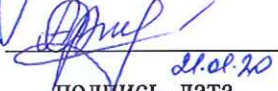

**СОЗДАНИЕ НАУЧНОЙ ГРУППЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ МИТОЗА**

Руководитель НИР,
канд. биол. наук,

Зайцев А.В. Зайцев

Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Заведующий группой, канд. биол. наук	 21.01.20 подпись, дата	А.В. Зайцев (введение, заключение)
Ответственный исполнитель, Зав. лабораторией, канд. физ.-мат. наук	 21.01.20 подпись, дата	Н.Б. Гудимчук (введение, нормоконтроль)
Исполнители:		
Ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 21.01.20 подпись, дата	А.В. Коршунова (раздел 1)
Мл. науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	А.С. Майоров (раздел 1)
Науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	В.В. Мустяца (раздел 1)
Мл. науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	Е.В. Тарасовец (раздел 1)
Стажер-исследователь	 21.01.20 подпись, дата	А.Е. Филиппова (раздел 1)
Науч. сотр.	 21.01.20 подпись, дата	С.С. Шахиджанов (раздел 1)

Отчет 16 с., 4 рис., 16 источн.

КЛЕТОЧНОЕ ДЕЛЕНИЕ, МИТОЗ, МИКРОТРУБОЧКА, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, EB-БЕЛКИ

Цель работы – изучение молекулярных механизмов митоза. Объект исследования – микротрубочки, EB-белки. В ходе проекта были исследованы свойства взаимодействия одного из главных белков-регуляторов микротрубочек – важнейших компонентов митотического аппарата, и концевое белка EB3. Экспериментально установлено, что белок EB3 может связываться не только на конце микротрубочки, но и часто накапливается вдоль ее решетки, вблизи конца, образуя «островки». Вторичные зоны связывания EB3 формируются с периодом полураспада 5.1 сек и частотой встречаемости каждые 9.3 мкм длины микротрубочек. Продемонстрировано, что дополнительные зоны связывания белка EB3, т.н. «EB3 островки» располагаются не только на пересечениях с другими микротрубочками, поэтому не могут быть целиком обусловлены такими пересечениями. С помощью компьютерного моделирования показано, что простой кинетики гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ) в карманах тубулина не достаточно для того, чтобы объяснить стохастическое возникновение ГТФ-островков

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ.....	2
ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	7
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	14
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	15

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

EB – белок, связывающийся с концами микротрубочек (англ. end binding protein)

RFP – красный флуоресцентный белок (англ. red fluorescent protein)

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ВВЕДЕНИЕ

Во время митотического деления клеток микротрубочки существенно меняют свою внутриклеточную организацию. Благодаря способности к сборке и разборке, они перестраиваются из радиальной структуры в би-полярную и образуют митотическое веретено деления. При этом целый набор белков-регуляторов отвечает подстройку динамики микротрубочек адекватно текущим задачам клетки. Понимание принципов митотического деления требует изучения механизмов этой регуляции.

Мы исследовали одну из главных групп-регуляторов микротрубочек - семейство EB-белков (от End Binding). Они характеризуется способностью связываться с растущими кончиками микротрубочек и модулировать их динамику как непосредственно, так и косвенно, путем присоединения дополнительных белков, что обеспечивает возможность тонкой настройки поведения микротрубочек для выполнения ими всего разнообразия их клеточных функций. Ранее было показано, что белки EB распознают стабилизирующий колпачок из ГТФ / ГДФ-Pi -содержащего тубулина на конце растущих микротрубочек, однако информация о дополнительных зонах связывания EB на микротрубочках была ограничена. Мы изучили профили интенсивности флуоресценции одного из трех EB-белков млекопитающих, EB3, соединенного с красным флуоресцентным белком. Было показано, что распределение EB3 на микротрубочках в фибробластах мыши часто отклоняется от моно-экспоненциального распада и в нем присутствуют вторичные пики. Эти вторичные пики, которые мы называем EB3-островками, были обнаружены в 56% профилях комет на растущих концах микротрубочек, встречались в среднем раз в 44 секунды в процессе роста микротрубочки, и имели среднее время жизни около 5 секунд. Большая часть обнаруженных EB3-островков вблизи конца микротрубочки были стационарны и появились отделением от основной кометы EB3, движущейся с растущим концом. Компьютерное моделирование декорирования белком EB3 динамических концов микротрубочек показало, что наблюдаемые экспериментально EB3-островки не могут быть объяснены простым стохастическим гидролизом / высвобождением фосфата первого порядка в молекулах ГТФ. Мы предполагаем, что дополнительные белковые факторы влияют на время пребывания EB3 на микротрубочках в клетках, вероятно модулируя динамику микротрубочек.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Многие клеточные процессы, в том числе деление, миграция и поляризация, зависят от динамической нестабильности - уникального свойства тубулиновых микротрубочек, проявляющееся в их самопроизвольном переключении между фазами их роста и укорочения [1]. В настоящее время лидирующая гипотеза состоит в том, что динамическая нестабильность объясняется наличием стабилизирующего колпачка на конце растущей микротрубочки, состоящего из ГТФ-связанных субъединиц тубулина [2], [3]. Пока стабилизирующий колпачок присутствует на кончике микротрубочки, микротрубочка может продолжать рост. Когда стабилизирующий колпачок утрачивается из-за стохастического гидролиза ГТФ, диссоциации ГТФ-тубулинов или потери боковых связей между ними, микротрубочка переходит в фазу деполимеризации [4]. Структура и динамика этого стабилизирующего колпачка, однако, остается слабо исследованной из-за отсутствия прямых методов его визуализации. Специализированные антитела были разработаны для распознавания ГТФ-тубулинов [5], но из-за их большого размера и медленной кинетики отсоединения они не позволяли осуществить исследование динамики распределения нуклеотидов в микротрубочке с достаточно высоким временным разрешением. Важная информация о поведении ГТФ-колпачка пришла из исследований EB-белков (от End Binding), связывающихся с растущими концами микротрубочек, которые в настоящее время служат наилучшим известным нативным зондом для исследования стабилизирующего колпачка [6]. Было показано, что EB-белки чувствуют нуклеотидное состояние тубулинов и распознают регион, ответственный за мгновенную стабильность микротрубочки *in vitro* [7]. У млекопитающих семейство EB-белков представлено тремя членами — EB1, EB2 и EB3 — функционирующими как модуляторы динамики микротрубочки и платформы для привлечения многих других факторов на растущий конец микротрубочки [8]. Исследования на клетках и на изолированных микротрубочках показали, что белки семейства EB декорируют кончики микротрубочек с комето-подобным распределением, слегка смещенным от самого кончика микротрубочки [9], [10]. Следуя предположению, что EB-белки распознают ГТФ/ГДФ-Рi связанный тубулин, переход которого в ГДФ-состояние является стохастическим процессом первого порядка, EB-профили на микротрубочках обычно усреднялись и аппроксимировались моно-экспоненциальной функцией затухания для извлечения характерной длины кометы во время фазы роста микротрубочки [11]–[13]. Такой подход содержал информацию об усреднённых свойствах колпачка на микротрубочках, но игнорировал потенциально важную информацию о более

тонкой его структуре. А именно, индивидуальные профили EB обычно бывают шумными и содержат дополнительные пики [14], которые могут отражать наличие дополнительных зон, связывающих EB и, соответственно содержащих ГТФ/ГДФ-Ri связанный тубулин — так называемые «остатки» или «островки» ГТФ/ГДФ-Ri колпачка [5], [15]. Частота, положение и динамика этих зон, которые считаются важными факторами спасения микротрубочек, систематически не изучались.

В рамках данной работы мы провели анализ формы и динамики распределения EB3 на растущих микротрубочках в фибробластах с высоким временным разрешением. Мы обнаружили, что длина и форма кометы EB3 остаются в среднем неизменными в течение фазы роста микротрубочки, хотя и значительно колеблются. При этом отдельные распределения EB3 вдоль микротрубочки часто отклоняются от экспоненциальной формы, образуя относительно долгоживущие EB3-островки. Хорошо охарактеризованная кинетическая модель динамики микротрубочки, основанная на гипотезе двух состояний тубулина [16], модифицированная для отражения декорирования EB3, не смогла объяснить долгоживущие островки EB3, указывая на то, что дополнительные факторы способствуют связыванию EB3 с микротрубочкой.

1. Экспериментально установлено, что белок EB3 может связываться не только на конце микротрубочки, но и часто накапливается вдоль ее решетки, вблизи конца, образуя «островки». Это свидетельствует, что механизм локализации белка EB3 более сложный, чем предполагали классические модели. А также дает ключ к пониманию необычной динамики и частых остановок деполимеризации концов микротрубочек в живых клетках.

Форма дополнительных зон связывания EB3 была разнообразной и часто представляла собой или диффузное расширение профиля кометы EB3-RFP (Рис 1, фигурная скобка), или же четкие участки дополнительной интенсивности EB3-RFP, которые мы впоследствии и будем называть островками EB3 (Рис 2, оранжевые стрелки).

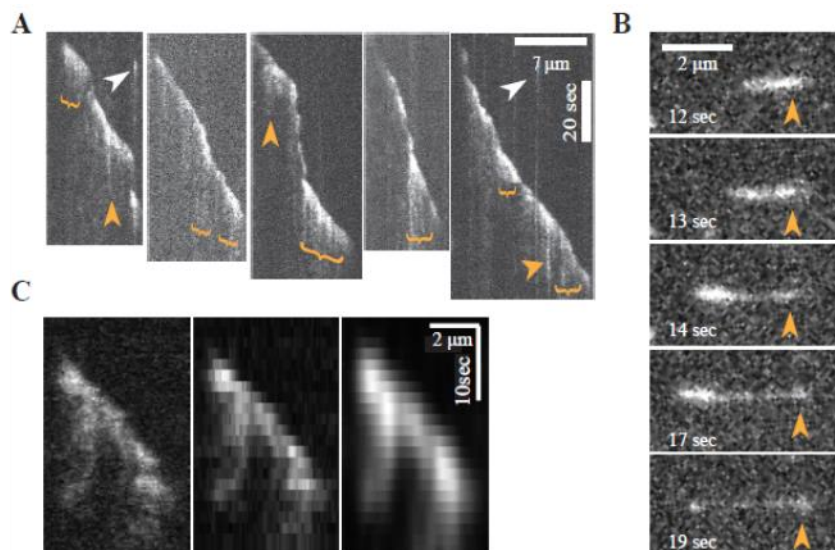


Рис. 1 Обнаружение EB3 островков вблизи растущих концов микротрубочек. (А) Примеры кимограмм, плохо описываемых кусочно-экспоненциальной / гауссовой функцией. Желтые стрелки отмечают EB3-островки. (В) Сравнение количества флуоресцентных пятен на микротрубочках по сравнению с фоном. (С) Слева направо: необработанная кимограмма EB3-RFP на микротрубочке, та же кимограмма с 1-секундным биннингом и сглаженная 2D-гауссовым фильтром (радиус фильтра = 1,5 пикселя).

Мы могли однозначно идентифицировать достаточно большие EB3-островки, используя автоматизированный алгоритм. Наш подход к идентификации островков EB3 основывался на подборе профиля интенсивности EB3-RFP с помощью функций с одним и несколькими пиками. Если совпадение для функции с большим количеством пиков показывало значительное улучшение по сравнению с функцией с единственным экспоненциальным/гауссовым пиком, мы определяли профиль как содержащий островок EB3. В целом, мы количественно охарактеризовали 82 EB3-островка на 120 микротрубочках в живых клетках фибробластов. Длительности жизни островков EB3 были распределены экспоненциально с периодом полураспада 5,1 секунд. Наблюдаемые EB3-островки не следовали за основным пиком интенсивности кометы EB3-RFP, а оставались неподвижными на микротрубочке, становясь все более удаленными от основной кометы с течением времени. EB3-островки появлялись в среднем один раз в 44 секунды времени роста кометы EB3-RFP, что соответствует пространственной частоте в один EB3-островок на 9,3 микрометра длины микротрубочки. Мы не наблюдали какой-либо четкой тенденции по части обогащения EB3-

островков у более молодых или более старых комет, что позволяет предположить, что их появление было случайным. Аналогично, не было никакой корреляции между частотой образования островков EB3 и скоростью соответствующих комет EB3-RFP.

2. Впервые показано, что один из основных регуляторов микротрубочек, белок EB3 локализуется не только на концах микротрубочек, но и формирует вторичные зоны связывания с периодом полураспада 5.1 сек и частотой встречаемости каждые 9.3 мкм длины микротрубочек.

Несмотря на хорошую аппроксимацию усредненного профиля EB3-RFP комбинацией гауссовой и экспоненциальной функций (Рис 2), мы обнаружили, что многие индивидуальные профили значительно отклоняются от этой модели.

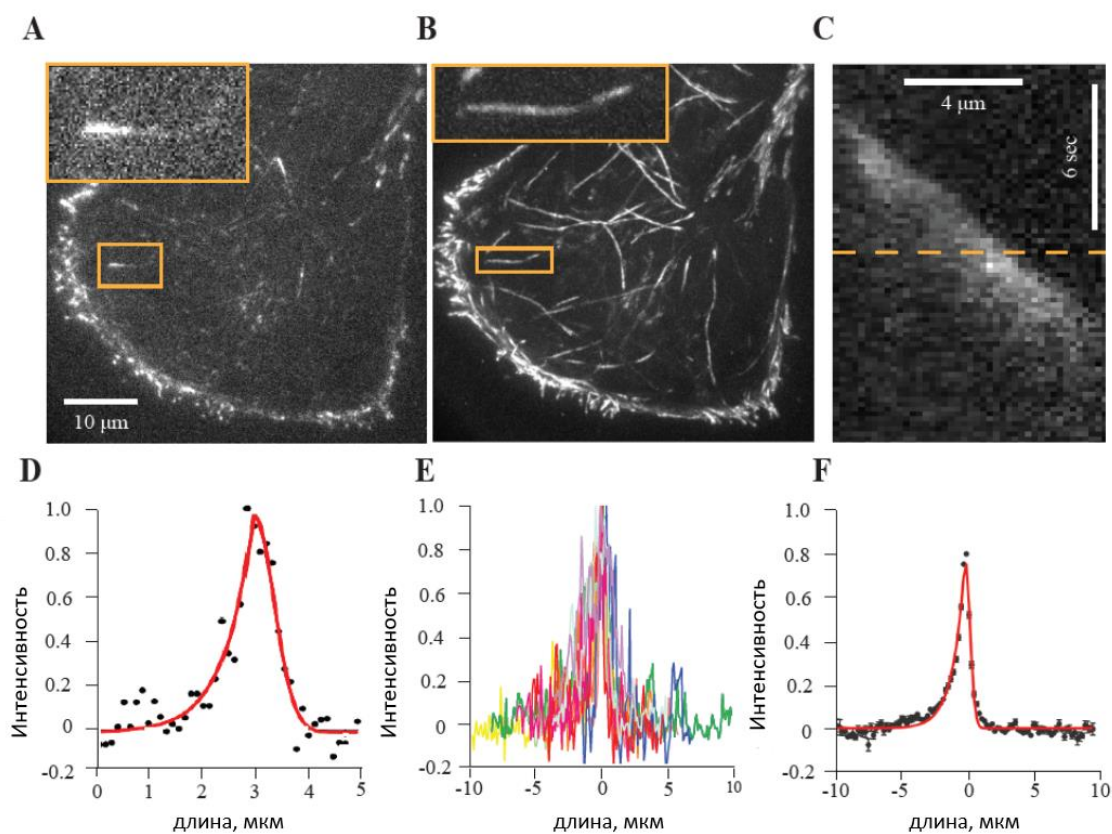


Рис. 2. Обработка профилей интенсивности вдоль треков EB3 в фибробластах. (А) Снимок фибробластов 3Т3, экспрессирующих кометы EB3-RFP. Врезка увеличивает отдельную комету (В) Максимальная проекция стека кадров, визуализирующая различные треки EB3-RFP. (С) Пример кимограммы EB3-RFP, взятый вдоль дорожки, выделенной желтым цветом на панели В. (D) Профиль интенсивности вдоль пунктирной линии панели С. Красный цвет показывает

соответствие экспоненциальной / гауссовой функции. (E) Индивидуальные профили интенсивности EB3-RFP выровнены по положению максимума функции подгонки (см. Методы). (F) Усредненный профиль интенсивности EB3-RFP, аппроксимированный кусочно-экспоненциальной / гауссовой функцией (красный).

3. Продемонстрировано, что дополнительные зоны связывания белка EB3, т.н. «EB3 островки» располагаются не только на пересечениях с другими микротрубочками, поэтому не могут быть целиком обусловлены такими пересечениями (Рис 3).

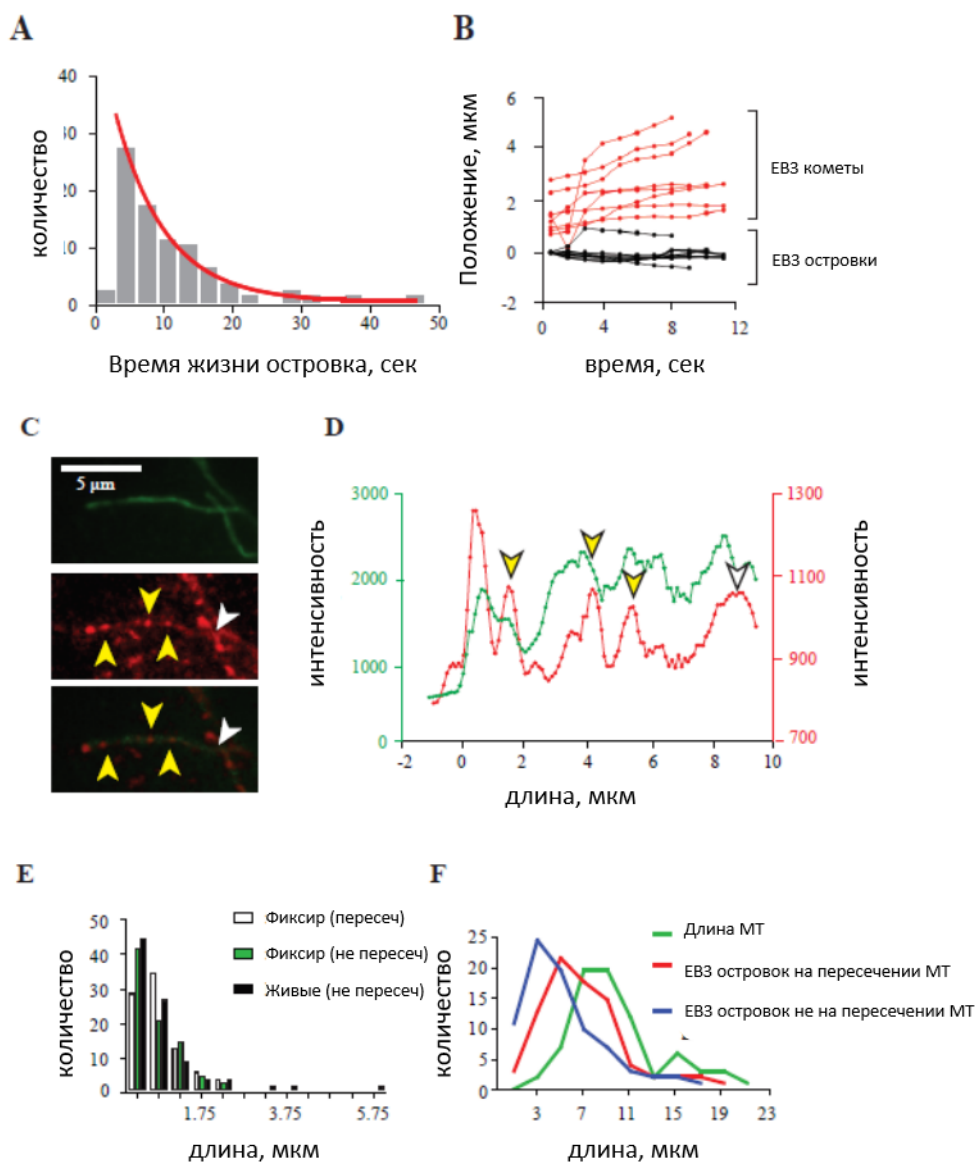


Рис. 3. Количественная оценка EB3-островков. (A) Распределение времен жизни EB3-островков (черные столбцы). Красная кривая – экспоненциальная аппроксимация. (B) График

зависимости положения от времени для восьми репрезентативных треков комет EB3-RFP (красный) и островков EB3 (черный) на одних и тех же кимограммах, показывающий, что кометы EB3-RFP движутся с растущей вершиной микротрубочке, в то время как EB3-островки остаются статичными. (С) Микротрубочки и EB3 видны в отдельных спектральных каналах и наложены друг на друга. Желтые стрелки указывают на островки EB3 вне пересечений с микротрубочками, белые стрелки указывают на островки EB3 на пересечениях микротрубочек. (D) Профиль интенсивности тубулина и сигнала EB3 вдоль микротрубочек. Стрелки окрашены, как на панели С. (E) Распределение длин островков EB3. Белые, зеленые и черные столбцы соответствуют EB3-островкам, расположенным на пересечениях микротрубочек в фиксированных ячейках, вне пересечений микротрубочек в фиксированных ячейках и в живых клетках соответственно. (F) Распределение местоположений островков EB3 относительно растущей вершины микротрубочки. Красные и синие кривые соответствуют EB3-островкам на пересечениях микротрубочек и вне пересечений микротрубочек, соответственно. Зеленая кривая показывает распределение длин сегментов микротрубочек, которые были проанализированы.

4. С помощью компьютерного моделирования показано, что простой кинетики гидролиза ГТФ в карманах тубулина не достаточно для того, чтобы объяснить стохастическое возникновение ГТФ-островков. (Рис 4)

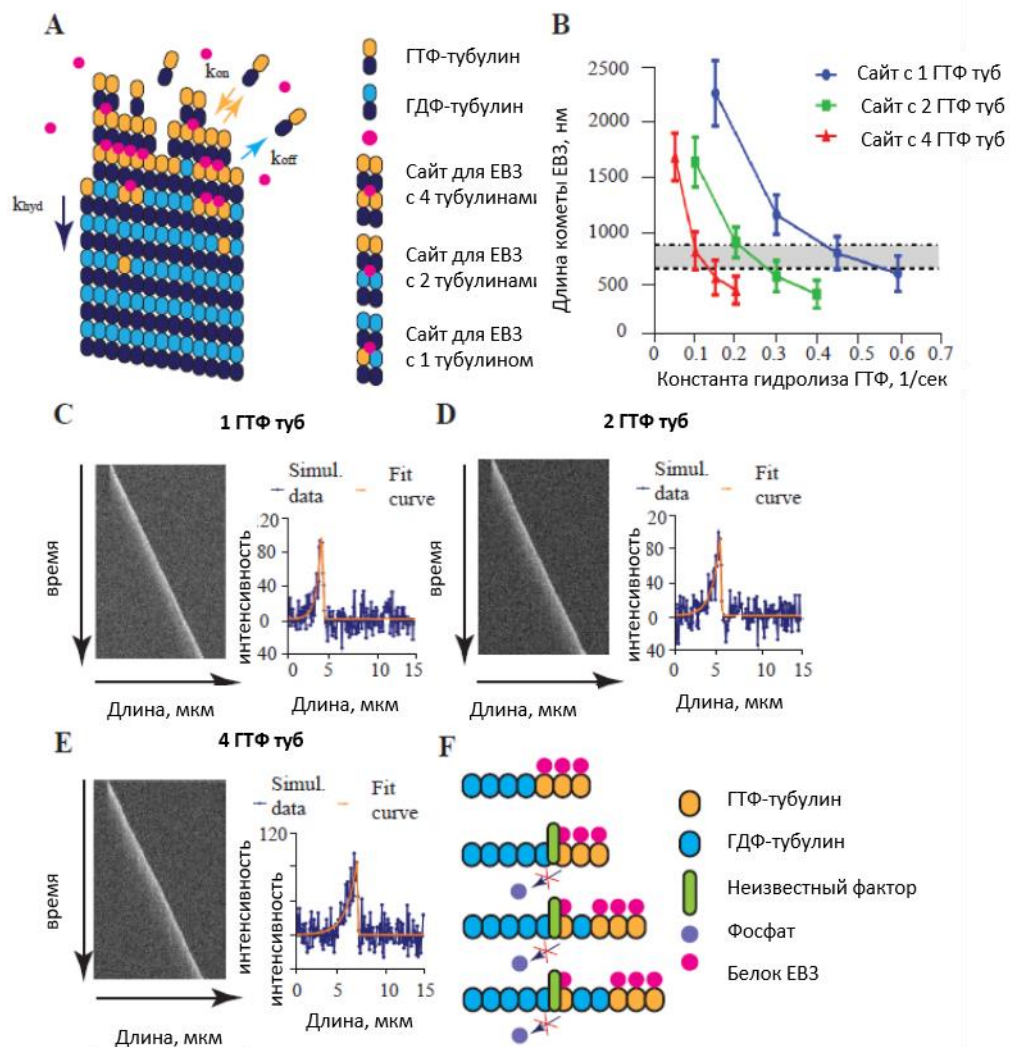


Рис. 4 Анализ потенциального механизма формирования EB3-островков. (А) Схема вычислительной модели растущего кончика микротрубочки с белками EB3. (В) Зависимость длины кометы EB3 в модели как функция константы гидролиза ГТФ. Кривые разных цветов соответствуют различным правилам связывания EB3 и тубулина. Серая область между пунктирными линиями представляет диапазон экспериментально оцененной длины кометы. (С) - (Е): репрезентативные кимограммы комет EB3 при моделировании с различными значениями констант гидролиза GTP и соответствующими репрезентативными профилями интенсивности. Оранжевый подходит с экспоненциальной / гауссовой функцией. (F) Схема гипотетического механизма формирования островка EB3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Экспериментально установлено, что белок EB3 может связываться не только на конце микротрубочки, но и часто накапливается вдоль ее решетки, вблизи конца, образуя «островки».
2. Вторичные зоны связывания EB3 формируются с периодом полураспада 5.1 сек и частотой встречаемости каждые 9.3 мкм длины микротрубочек
3. Продемонстрировано, что дополнительные зоны связывания белка EB3, т.н. «EB3 островки» располагаются не только на пересечениях с другими микротрубочками, поэтому не могут быть целиком обусловлены такими пересечениями.
4. С помощью компьютерного моделирования показано, что простой кинетики гидролиза ГТФ в карманах тубулина не достаточно для того, чтобы объяснить стохастическое возникновение ГТФ-островков

Совокупно полученные данные говорят о том, что описанные нами зоны EB3 на микротрубочках могут быть обязаны своему появлению неустановленным белковым партнерам или локальным нарушениям нормального протекания реакции гидролиза ГТФ в тубулинах в зоне EB3 островков, и не сводятся к известным факторам. Наличие существенной локализации белка EB3 на некотором расстоянии от растущего конца микротрубочки может являться маркером зоны активного обмена решетки микротрубочки с ГТФ-тубулинами из цитоплазмы, что свидетельствовало бы о локальном нарушении структуры микротрубочки. Такие зоны могут оказывать стабилизирующее влияние на микротрубочки и являться механизмом, важным для поддержания нормальной работы митотического веретена.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Desai A. & T. J. Mitchison. Microtubule Polymerization Dynamics. // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1997. V. 13, № 1. P. 83–117
2. Bowne-Anderson H., et al. Microtubule dynamic instability: a new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. // *Bioessays*. 2013. V. 35, № 5. P. 452–461
3. Brouhard G. J. & Rice L. M. The contribution of $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. // *J. Cell Biol.* 2014. V. 207, № 3. P. 323–334
4. Захаров П. Н. и др. Микротрубочка — динамически нестабильный биополимер со спонтанными переключениями между фазовыми состояниями. // *Успехи физических наук*. 2016. V. 186, № 8. P. 853–868
5. Dimitrov A., et al. 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. 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, № 4. P. 309–322
7. Duellberg C. et al. The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. // *eLife*. 2016. V. 5. P. e13470
8. Mustyatsa V. V. et al. EB-family proteins: Functions and microtubule interaction mechanisms. // *Biochemistry Moscow*. 2017. V. 82, № 7. P. 791–802
9. Nakamura S. et al. Dissecting the Nanoscale Distributions and Functions of Microtubule-End-Binding Proteins EB1 and ch-TOG in Interphase HeLa Cells. // *PLoS One*. 2012. V. 7, № 12. P. e51442
10. Roth D. et al. Spatial positioning of EB family proteins at microtubule tips involves distinct nucleotide-dependent binding properties. // *J. Cell. Sci.* 2018. V. 132. P. jcs219550
11. Bieling P. et al. CLIP-170 tracks growing microtubule ends by dynamically recognizing composite EB1/tubulin-binding sites. // *J Cell Biol.* 2008. V. 183, № 7. P. 1223–1233
12. Seetapun D. et al. Estimating the Microtubule GTP Cap Size In Vivo. // *Curr Biol*. 2012. V. 22, № 18. P. 1681–1687
13. Maurer S. P. et al. EB1 Accelerates Two Conformational Transitions Important for Microtubule Maturation and Dynamics. // *Curr Biol*. 2014. V. 24, № 4. P. 372–384
14. Komarova Y. et al. Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. // *J. Cell Biol.* 2009. V. 184, № 5. P. 691–706
15. Aumeier C. et al. Self-repair promotes microtubule rescue. // *Nat Cell Biol*. 2016. V. 18, № 10. P. 1054–1064

16. VanBuren V. et al. Estimates of lateral and longitudinal bond energies within the microtubule lattice. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002. V. 99, №. 9. P. 6035–6040