

ВЛИЯНИЕ ФОСФАТА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКА EB1 С МИКРОТРУБОЧКОЙ

Саранцева М.Ю., Бояхчян А.В., Гудимчук Н.Б.

Московский Государственный университет им. М.В.Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, корп. 2, Москва, 119991, РФ; e-mail: msarantseva@mail.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Данная работа посвящена исследованию взаимодействия белка из семейства EB (End Binding protein) с микротрубочками (MT) *in vitro*. Согласно одной из гипотез, он имеет повышенное сродство к комплексу «тубулин-ГДФ-фосфат», откуда следует, что повышение концентрации неорганического фосфата в растворе должно увеличить аффинность EB1 к MT. Чтобы проверить данное предположение, проведены эксперименты по наблюдению кинетики накопления рекомбинантного белка EB1-eGFP на стабильных MT с помощью TIRF микроскопии (Total Internal Reflection Fluorescence) в присутствии таксола, подавляющего деполимеризацию MT. Так же произведены измерения динамических параметров MT и размера области связывания EB1-eGFP с динамическими MT. Сравнивая эти данные, полученные при разной концентрации дигидрофосфата натрия в растворе, можно делать выводы о влиянии фосфата на аффинность EB1 к MT, а значит, и о механизме их взаимодействия. Результаты исследования свидетельствуют против гипотезы о том, что EB1 связывается с ГДФ-фосфат-тубулином

Ключевые слова: микротрубочки, ГТФ-шапочка, EB1, MAPs.

ВВЕДЕНИЕ

Микротрубочки (MT) – это динамические компоненты цитоскелета, состоящие из белка тубулина, который при полимеризации присоединяется к концу MT в комплексе с гуанозинтрифосфатом (ГТФ). После присоединения тубулина молекула ГТФ гидролизуется до гуанозиндифосфата (ГДФ), высвобождая неорганический фосфат. Таким образом, лишь на растущем конце MT присутствуют тубулины, связанные с ГТФ, – так называемая ГТФ-шапочка. Считается, что ГТФ-шапочка защищает микротрубочку от деполимеризации. В живой клетке растущий конец MT предоставляет сайт связывания для исследуемого нами белка EB1 (Ending Bind protein). Этот белок регулирует полимеризацию MT в клетке и способствует связыванию других белков, которые не могут автономно распознавать конец MT [1].

На сегодняшний день не известно, как именно белок EB1 способен «узнавать» конец MT. Согласно одной из гипотез, он имеет повышенное сродство к ГТФ-шапочке. По другой гипотезе белок EB1 распознает промежуточную фазу механохимического цикла, когда гидролиз ГТФ уже произошел, но фосфат еще находится в кармане тубулина (рис. 1) [2]. В пользу последней гипотезы говорят данные о том, что максимум интенсивности флуоресценции меченого EB1, в отличие от других концевых белков, находится на расстоянии порядка сотен нм от плюс-конца [3]. Более того, показано, что EB1 лучше связывается с тубулином в комплексе с негидролизуемым аналогом ГТФ (GTP γ S), который, вероятно, структурно ближе к ГДФ-фосфату, чем к ГТФ [4, 5]. Если гипотеза о распознавании белком EB1 комплекса «тубулин-ГДФ-фосфат» верна, увеличение концентрации неорганического фосфата должно увеличить размера сайта связывания EB1 на MT и оказать влияние на динамические свойства MT. Задача исследования – проверить данное предположение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белка EB1-eGFP. Стандартными методами генной инженерии было проведено клонирование гена белка EB1. Плазмидой PET28a_h_EB1_eGFP трансформировали штамм Rosetta E.coli методом теплового шока. После инкубации клетки высевали на чашки Петри с LB-агаром, содержащим хлорамфеникол (к нему устойчив штамм Rosetta) и канамицин (к нему устойчива плазида). Далее отобранную колонию выращивали в течение 12-16 часов при 37 °C при перемешивании. Оценку эффективности экспрессии проводили после разделения белков клеточного лизата в 10 % ПААГ по Лэммли и окрашивания геля Кумасси бриллиантовым синим R-250. Выделение рекомбинантного белка проводилось методом афинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой.



Рисунок 1. Схематическая иллюстрация модели ГДФ-фосфатной шапки, потенциально узнаваемой EB-белками

Наблюдение за флуоресценцией EB1-eGFP на МТ. Герметичные проточные камеры промывались с помощью перистальтического насоса. Камеры содержали затравки МТ, иммобилизованные на покровном стекле с помощью DIG-антител, и раствор белков EB1 и тубулина в буфере: BRB80 с 5 мг/мл БСА, 6 мг/мл глюкозы, 68 мкг/мл каталазы, 0,1 мг/мл глюкозооксидазы, 0,5 % β -меркаптоэтанола, 1 мМ ГТФ, 2 мМ дитиотреитола. Концентрации белков EB1 – 200 нМ, тубулина – 10,72 мкМ. Концентрация фосфата варьировалась. В экспериментах со стабильными МТ в буфере и затравках присутствовал таксол в концентрации 10 мкМ. Для наблюдения микротрубочек проточная камера помещалась под объектив инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E. Флуоресценция возбуждалась с помощью модуля Nikon LU-4A, содержащего лазер Coherent Diode с длиной волны 488 нм и мощностью 100 мВт. Температура объектива поддерживалась 32 °С.

Обработка результатов. При съёмке динамики микротрубочек в режиме TIRF ($\lambda = 488$ нм) наблюдается зелёная флуоресценция, присущая белку EB1-eGFP, который присоединяется к растущему концу и отсоединяется от тела микротрубочки непрерывно (рис. 2.A). Таким образом рост микротрубочки сопровождается движением области наибольшего скопления EB1-eGFP, так называемой кометы EB1, имеющей экспоненциально убывающую яркость вдоль тела микротрубочки. В программе ImageJ стэк из кадров поля с интервалом 10 секунд используется для построения кимограмм – свёрток по времени для каждой микротрубочки (рис. 2B).

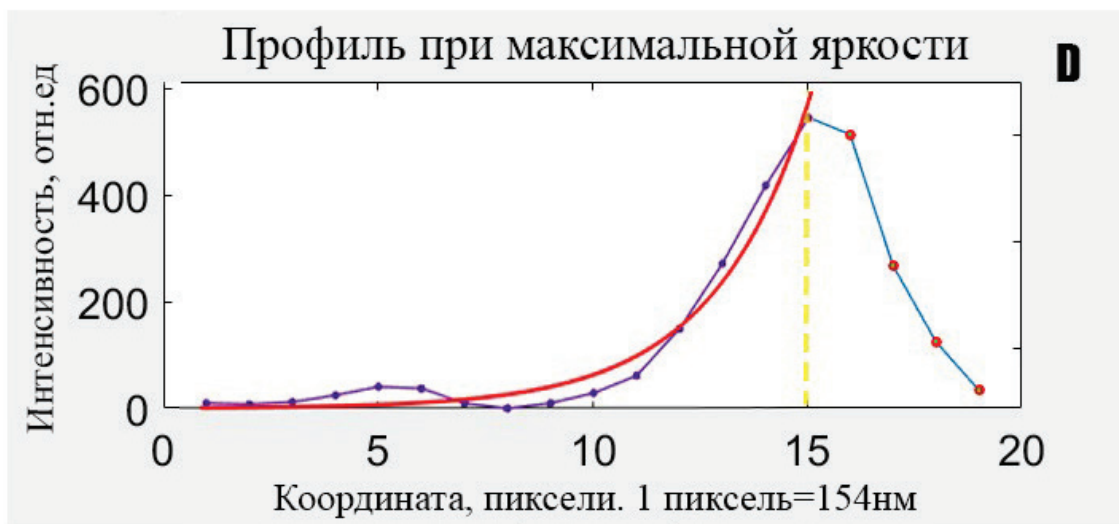
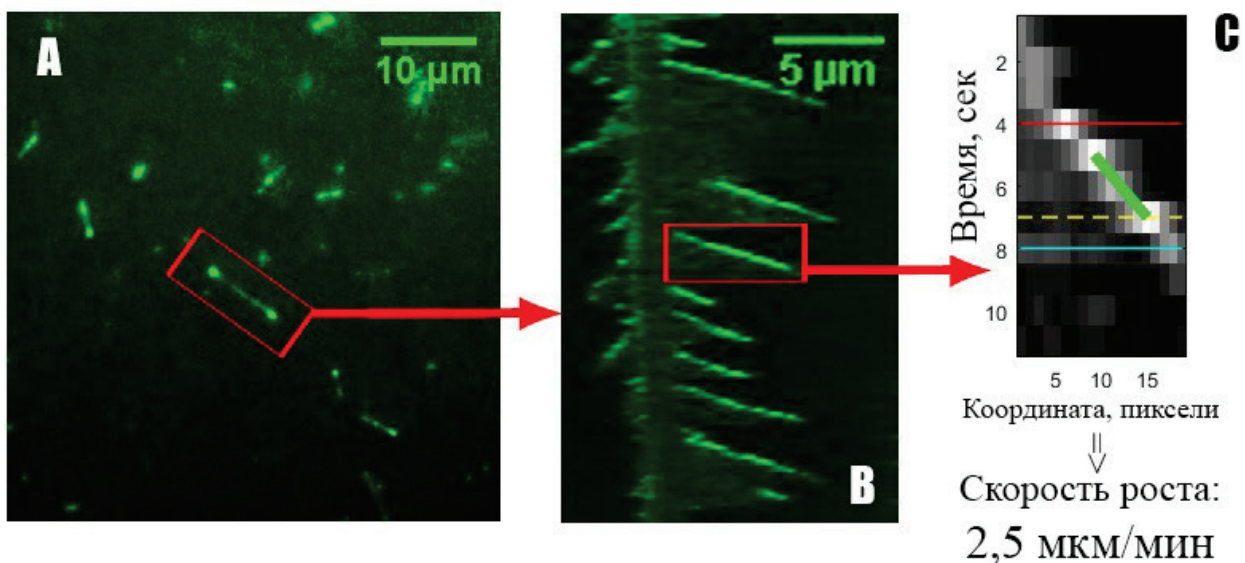


Рисунок 2. А. Фрагмент поля при съёмке динамики микротрубочек в режиме TIRF ($\lambda = 488$ нм). В. Кимограмма, построенная для выделенной микротрубочки с помощью ImageJ. С. Анализ одного акта катастрофы в Matlab. Скорость роста определена как котангенс угла наклона зелёной линии. Пунктирной линией обозначен момент максимальной суммарной интенсивности. D. Профиль интенсивности флуоресценции кометы в момент максимальной яркости. Красными точками обозначены реперные точки для аппроксимации пика функцией Гаусса, пунктирной жёлтой линией – положение максимума данной функции. Красной линией обозначен экспоненциальный фиттинг убывающего хвоста кометы

Для дальнейшей обработки в Matlab фрагмент кимограммы, соответствующий одному акту роста и катастрофы, преобразуется в численный массив яркости каждого пикселя (рис. 2С). После подсчета суммарной яркости по всем кадрам алгоритм автоматически распознаёт кометы EB1 по превышению порога в 40 % от максимальной суммарной яркости на протяжении семи последовательных кадров. Таким образом фиксируется временная область существования комет. Для аппроксимации профиля функцией Гаусса находим на переднем фронте кометы точку с интенсивностью, равной среднему арифметическому между максимальной и минимальной интенсивностью, далее фиксируется эта точка и от нее отступаем расстояние в 10 пикселей, чтобы захватить максимум профиля (сам максимум не подходит в качестве опорной точки из-за большого шума). Эта точка и ноль являются опорными для аппроксимации экспонентой (1) убывающего хвоста интенсивности в сторону тела микротрубочки (рис. 2D):

$$F(x) = A_0 e^{-x/l}. \quad (1)$$

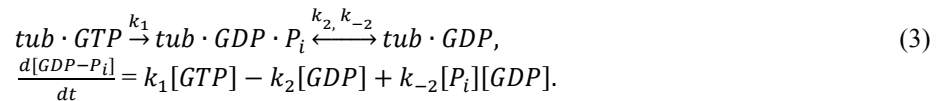
Программа выдает значение x показателя экспоненты. Длина в нм, на которой интенсивность свечения падает в e -раз, принимается за размер кометы EB1 и выражается через полученный показатель экспоненты x :

$$l_e = \frac{1}{x} \cdot 0,154, \quad (2)$$

где 0,154 – коэффициент перевода пикселей в нанометры.

В экспериментах со стабильными микротрубочками измерялась средняя интенсивность флуоресценции EB1-eGFP на единицу длины МТ в состоянии равновесия. Алгоритм обработки в ImageJ используется в соответствии со статьёй [7].

Выбор состава буферов. С одной стороны, в соответствии с уравнениями реакции:



Увеличение концентрации фосфата должно вести к смещению равновесия реакции в сторону комплекса «тубулин-ГДФ-фосфат», а значит, мы должны стремиться взять как можно большую концентрацию фосфата.

С другой стороны, однако, увеличение концентрации соли увеличивает ионную силу раствора, приводя к экранированию заряженных аминокислот и уменьшению эффективности взаимодействия EB1 и микротрубочки, сказываясь, в конечном итоге, на возможности достоверно детектировать связывание. Так же при добавлении солей не должен изменяться pH экспериментальной смеси, который поддерживается постоянным в буфере BRB-80 на значении pH 6,9. Эти условия оптимальны для полимеризации тубулина, поэтому отклонения недопустимы. Для компенсации влияния фосфата добавлялась щелочь КОН до требуемого значения pH.

Ионные силы растворов дигидрофосфата натрия и сульфата натрия (контроль) должны быть равны. Это позволит убрать из рассмотрения влияние ионной силы на результаты, и интерпретировать их лишь как следствие добавление фосфата.

Сульфат натрия ($c[Na_2SO_4] = c_S$) в водном растворе диссоциирует полностью как сильный электролит:

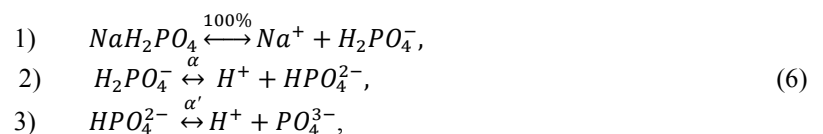


Ионная сила раствора сульфата может быть получена из формулы:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 = 3 \cdot c_S, \quad (5)$$

где c_i – молярные концентрации отдельных ионов; z_i – заряды ионов.

Дигидрофосфат натрия ($c[NaH_2PO_4] = c_P$) в растворе распадается на ионы ступенчато:



Так как диссоциация многоосновной кислоты наиболее активна по первой ступени, в убывающей степени – по следующим ступеням (степень диссоциации $\alpha \gg \alpha'$), в дальнейших расчётах рассматриваются только первые две ступени диссоциации. Ионная сила раствора:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 = \frac{1}{2} [Na^+] + (1 - \alpha)[H_2PO_4^-] + \alpha[HPO_4^{2-}] = \frac{1}{2} c_P (2 + 3\alpha). \quad (7)$$

Таблица 1. Коэффициенты диффузии и заряды ионов

Ион	z	$D_i \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$
Na^+	1	1,33
H_2PO_4^-	1	0,846
HPO_4^{2-}	2	0,69
SO_4^{2-}	2	1,07
K^+	1	1,96

Из-за отсутствия в литературе нужных значений констант диссоциации, была проведена экспериментальная оценка содержания ионов в растворах при постоянном рН 6,9, указывающем на степень диссоциации:

$$\text{pH} = \lg[H^+] = \lg(\alpha c_p). \quad (8)$$

Электрическая проводимость – непосредственно измеряемая величина с помощью кондуктометра – линейно зависит от концентраций ионов. В приближении отсутствия ионного взаимодействия, которое справедливо для сильно разбавленных растворов, получены теоретические значения для удельной электрической проводимости растворов с помощью уравнения Нернста-Эйнштейна:

$$EC = \frac{F^2}{RT} \sum_i D_i z_i^2 c_i, \quad (9)$$

где F – постоянная Фарадея; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура в Кельвинах; D_i – коэффициент диффузии i -го иона, значения указаны в таблице 1.

При малых концентрациях солей в приближении сильно разбавленных растворов удельная электропроводность зависит линейно от концентрации. (рис. 3). Это позволило установить соответствие между концентрациями солей и ионной силой:

$$I(c_p) = I\left(c_s = \frac{2}{3}c_p\right). \quad (10)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из таблицы 2 видно, что добавление NaH_2PO_4 в экспериментальный раствор не оказывает эффекта на частоту катастроф микротрубочек. Это косвенно свидетельствует о том, что ЕВ не связывается с тубулином-ГДФ-фосфатом, потому что иначе бы ожидался эффект стабилизации МТ из-за встраивания в тубулин фосфата, который удлинял бы стабилизирующую структуру на конце МТ, предотвращая деполимеризацию.

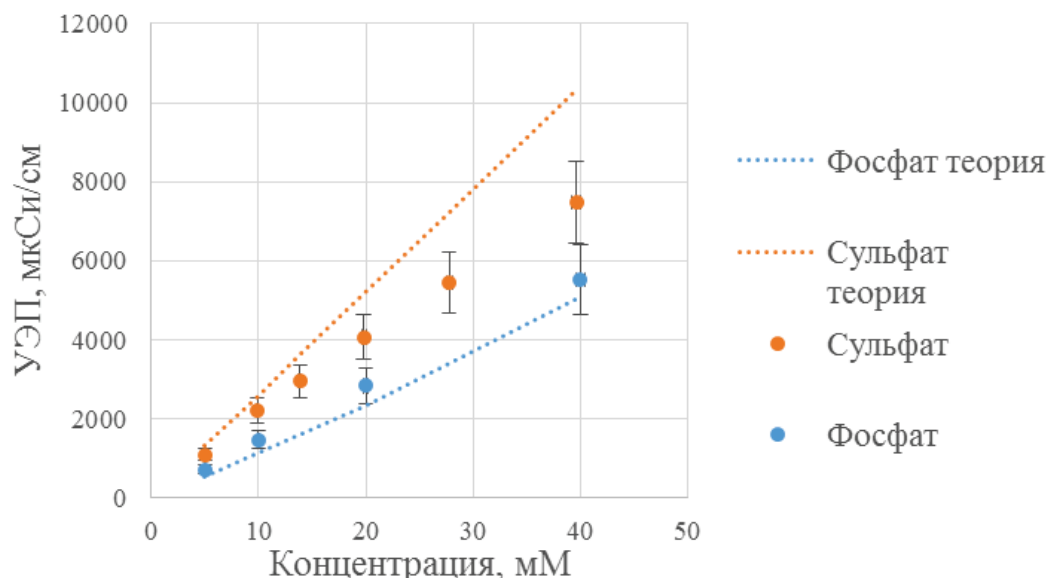


Рисунок 3. Зависимость удельной электропроводности от концентрации солей

Таблица 2. Параметры динамики МТ. в присутствии NaH_2PO_4 / Na_2SO_4 , $C(\text{тубулина}) = 10,72\text{мкМ}$

	Ионная сила, мМ	Концентрация соли, мМ	Кол-во микро-трубочек	Скорость роста МТ, мкм/мин	Длина МТ, мкм	Частота катастроф, шт/30мин
Эксперимент		C (NaH_2PO_4)				
	31,9	16,78	69	$1,26 \pm 0,23$	$6,88 \pm 4,24$	$3,41 \pm 1,46$
Контроль		C (Na_2SO_4)				
	32,2	11,16	26	$1,29 \pm 0,23$	$6,07 \pm 4,10$	$3,92 \pm 1,47$
	66,2	33,57	33	$1,35 \pm 0,23$	$5,52 \pm 3,18$	$4,42 \pm 1,56$
	63,1	22,31	33	$1,52 \pm 0,28$	$5,23 \pm 3,23$	$5,11 \pm 1,75$

Далее логично проверить непосредственно, увеличивается ли область связывания EB1 (комета) на МТ при повышении концентрации фосфата. Обработка порядка сотни комет для каждой экспериментальной точки не выявила явной зависимости размера кометы EB1 от ионной силы раствора, а также значимого различия с контрольными точками. Для сравнения двух независимых выборок применён t-критерий Стьюдента.

Однако метод анализа размера комет, указанный выше, имеет свои недостатки: при определении показателя экспоненты не учитывается возможное накопление EB1 не только на плюс конце МТ, но и на самом теле микротрубочки. Действительно, фосфат может встраиваться вдоль всего тела микротрубочки, что не позволило бы задетектировать увеличение размера кометы. Отсюда возникла необходимость в дополнительной постановке эксперимента со стабилизированными таксом микротрубочками. В этом случае суммарная интенсивность флуоресценции EB1 на МТ соответствует максимальной возможной при доступном количестве сайтов связывания. Предварительные результаты серии экспериментов представлены в таблице 3 (указана SEM). Данные не отображают значимого увеличения числа сайтов связывания EB1 при добавлении фосфата в раствор.

Несмотря на литературные данные, косвенно свидетельствующие в пользу узнавания EB1 ГДФ-фосфатного состояния тубулина, проведенные в рамках данной исследовательской работы опыты не позволяют выявить достоверно предпочтительное связывание EB с ГДФ-фосфатом на микротрубочке. Это говорит в пользу господствующей гипотезы, что EB связывается все же с ГТФ-тубулином. Полученные результаты позволяют лучше понять механизм связывания EB1 с МТ а так же структуру плюс-конца МТ.

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

Таблица 3. Средняя интенсивность флуоресценции EB1-eGFP на единицу длины МТ, отн.ед.

	20 мМ	60 мМ
Эксперимент: NaH_2PO_4	485 ± 3	457 ± 2
Контроль: Na_2SO_4	459 ± 2	400 ± 2

Список литературы / References:

1. Komarova Y. [et al.] Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *J. Cell Biol.*, 2009, vol. 184, pp. 691-706.
2. 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, vol. 149(2), pp. 371-382.
3. 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: CB*, 2014, 24(4), pp. 372-384.
4. Maurer S.P., Bieling P., Cope J., Hoenger A., Surrey T. GTP γ S microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108(10), pp. 3988-3993.
5. Zhang R., Alushin G.M., Brown A., Nogales E. Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell*, 2015, vol. 162(4), pp. 849-859.

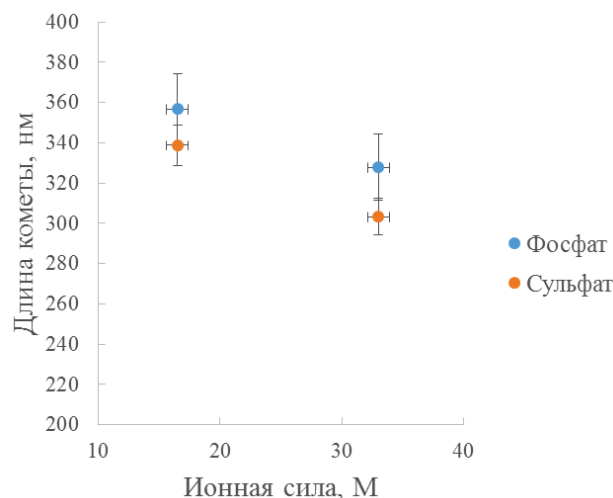


Рисунок 4. Зависимость длины кометы EB1-eGFP от ионной силы раствора

6. Zaytsev A.V., Mickb J.E., Maslennikov E., Nikashina B., DeLucab J.G., Grishchuk E.L. Multisite phosphorylation of the NDC 80 complex gradually tunes its microtubule-binding affinity. *Molecular Biology of the Cell*, 2015, vol. 26, pp. 1829-44.

EFFECTS OF PHOSPHATE ON PROTEIN EB1 INTERACTION WITH MICROTUBULE

Sarantseva M.Y., Boyakhchyan A.V., Gudimchuk N.B.

M.V. Lomonosov Moscow State University

Leninskiye Gory str., 1-2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: msarantseva@mail.ru

Abstract. This paper is devoted to investigation of the interaction of a protein from the EB family (End Binding protein) with microtubules (MT) *in vitro*. According to one of the hypotheses, it has an enhanced affinity for the «tubulin-GDF-phosphate» complex, suggesting that the addition of inorganic phosphate to solution should increase the affinity of EB1 to MT. To test this assumption, we conducted experiments to observe the kinetics of accumulation of recombinant EB1-eGFP protein on stable MTs using TIRF microscopy (Total Internal Reflection Fluorescence) in the presence of taxol, which suppresses the depolymerization of MT. Moreover, the dynamic MT parameters and the size of the binding region of EB1-eGFP with dynamic MTs were measured. Comparing these data obtained at different concentrations of sodium dihydrogen phosphate in solution, one can draw conclusions about the effect of phosphate on the affinity of EB1 to MT, and therefore on the mechanism of their interaction. The results of this study evidence against the hypothesis that EB1 binds to GDF-phosphate-tubulin

Key words: *microtubules, GTP-cap, EB1, MAPs.*