

## ТОНКАЯ СТРУКТУРА И ДИНАМИКА ПРОФИЛЕЙ EB3 НА МИКРОТРУБОЧКАХ В КЛЕТКАХ ФИБРОБЛАСТОВ

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

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
ул. Воробьевы горы, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ

<sup>2</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН  
ул. Косыгина, стр. 4, г. Москва, 119991, РФ

<sup>3</sup>Назарбаев университет

ул. Кабанбай Батыра, стр. 53, г. Астана, 010000, Казахстан; e-mail: aleksandrkostarevv@gmail.com

Поступила в редакцию: 04.07.2018.

**Аннотация.** У млекопитающих семейство плюс-конец-связывающих белков микротрубочек (EB) содержит три белка EB1 / 2/3, которые ассоциируются с растущими кончиками микротрубочек и могут регулировать их динамику, путем привлечения белков-партнеров для полимеризации тубулина. Было показано ранее, что EB-белки распознавали стабилизирующую шапочку из ГТФ / ГДФ-фосфат тубулина в растущих микротрубочках *in vitro*, служащую маркером мгновенной стабильности микротрубочки. Тонкая структура и динамика зоны связывания распознаются EB-белками в живых клетках. В этой работе на культуре фибробластов 3T3, трансфицированных EB3-RFP мы изучили профиль интенсивности EB3-комет. Было показано, что профили распределения белка EB3-RFP на микротрубочках в мышинных фибробластах хорошо описываются базовыми теоретическими представлениями. Однако мы обнаружили, что в некоторых случаях профиль имеет более сложную структуру, отличающуюся от классического представления. Под сложной формой мы понимаем дополнительную зону повышенной интенсивности белка EB3-RFP на микротрубочке позади основной кометы, которая проявляется на кимограммах в виде характерных стационарных полос, которые в свою очередь могут появляться как в теле микротрубочки, так и вблизи основного пика. Мы считаем, что данный факт может свидетельствовать о более сложной структуре растущего плюс-конца микротрубочки и ГТФ-шапочки в частности.

**Ключевые слова:** Концевой белок, микротрубочка, ГТФ-тубулин.

### ВВЕДЕНИЕ

Клетка является сложной, многокомпонентной биологической системой, способной к гомеостазу. Микротрубочки – полимеры белка тубулина, представляющие собой полярные длинные структуры, сопоставимые по длине с размером клетки. Они обеспечивают такие функции как: внутриклеточный транспорт, формирование веретена деления, сегрегацию хромосом во время деления, а также принимают участие в миграции клеток [1]. Микротрубочки в клетках создают целую сеть, способную перестраиваться и обновляться за счет механизма переключения отдельных микротрубочек от роста (полимеризации) к укорочению (деполимеризации).

При полимеризации микротрубочки к ее концу присоединяются димеры тубулина, ассоциированные с молекулами гуанозинтрифосфата (ГТФ). Через некоторое время после встраивания молекулы ГТФ претерпевают гидролиз, ведущий к изменению конформации тубулина. Таким образом, на конце растущей микротрубочке сосредоточены ГТФ-тубулины, а тело микротрубочки преимущественно состоит из ГДФ-тубулинов. Область микротрубочки, состоящей из ГТФ-тубулинов, принято называть ГТФ-шапочкой. Считается, что стохастическая потеря шапочки, вследствие гидролиза или диссоциации ГТФ-тубулинов, приводит к быстрому переходу от роста микротрубочки к укорочению [2].

Для регулирования динамики микротрубочек в клетках существует множество специальных белков, в число которых входят так называемые концевые белки (end-binding proteins или EB). Группы концевых белков способны автономно присоединяться к растущим концам микротрубочек, модулировать их динамику и способствовать привлечению белков-партнеров, обладающих разнообразными функциями [3]. Показано, что белки семейства EB преимущественно связываются с тубулинами, ассоциированными с молекулой ГТФ [4]. Поэтому EB-белки можно использовать как маркеры растущего плюс-конца микротрубочки.

Считается, что профиль кометы EB должен иметь экспоненциальное распределение вдоль длины микротрубочки [7], однако есть основания полагать, что *in vivo* распределение белков EB может иметь более сложную форму [6]. В рамках данной работы мы поставили своей целью определить параметры распределения белка EB3 на микротрубочке в живой клетке и получить их зависимость от времени. Таким образом, мы оценим поведение динамического плюс-конца микротрубочки с течением времени в высоком разрешении (частота кадров 5 к / 1 сек). В качестве параметров распределения мы будем рассматривать: ширину распределения, интенсивность и скорость кометы EB3.

## МЕТОДЫ

**Подготовка кимограмм.**

В данном исследовании использовались клетки 3Т3 – мышинные фибробласты (эпителиальные клетки мыши). Клетки были трансфицированы геном, экспрессирующим белок EB3-RFP. (End-binding protein – red fluorescence protein). Записывались видео с частотой записи 5 кадров в секунду в режиме TIRF с помощью иммерсионного объектива x100/1,49 (Nikon). На видео можно было наблюдать движение белковых структур, называемых кометами EB3 (рис. 1). По мере роста микротрубочки EB3 присоединяется к ГТФ-шапочке, цикл присоединения и отсоединения занимает доли секунды. Поскольку EB3 узнает только растущий конец, на видео можно пронаблюдать эволюцию «кометы» EB3: инициацию, появление, последующее движение (фаза роста микротрубочки) и угасание, которое в первом приближении свидетельствует о прекращении роста микротрубочки и ее деполимеризации.

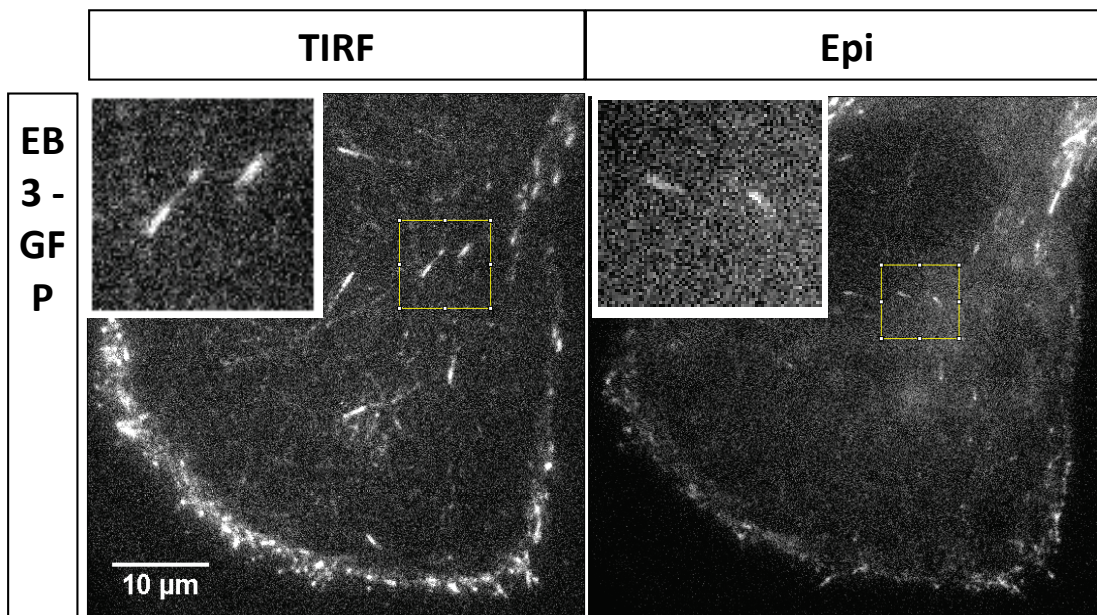
Первичная обработка данных проводилась в программе ImageJ. Она заключается в следующем. Первым шагом просматривается видеозапись с клеткой, и находятся кометы EB3, удовлетворяющие установленным критериям отбора. В ходе исследования были выработаны следующие критерии отбора комет: 1) кометы не должны пересекаться друг с другом, так как пересечение даст вклад в яркость конкретной области в определенное время; 2) должен четко наблюдаться момент появления кометы, что в дальнейшем будет обозначаться как рождение кометы, и момент ее угасания или смерти кометы; 3) кометы не должны уходить на периферию клетки, так как дальше они сливаются в пучки и становятся неразличимыми. На рисунке 1 указан вид приемлемых комет.

После того как все кометы были выделены и отобраны, строится максимальная проекция по времени по всему видео, таким образом, движущиеся яркие объекты (кометы EB3) оставляют след – в нашем случае трек, который можно интерпретировать как исследуемую микротрубочку от момента инициации ее роста до начала деполимеризации. Сопоставляем треки и кометы присваиваем имена и заносим в память.

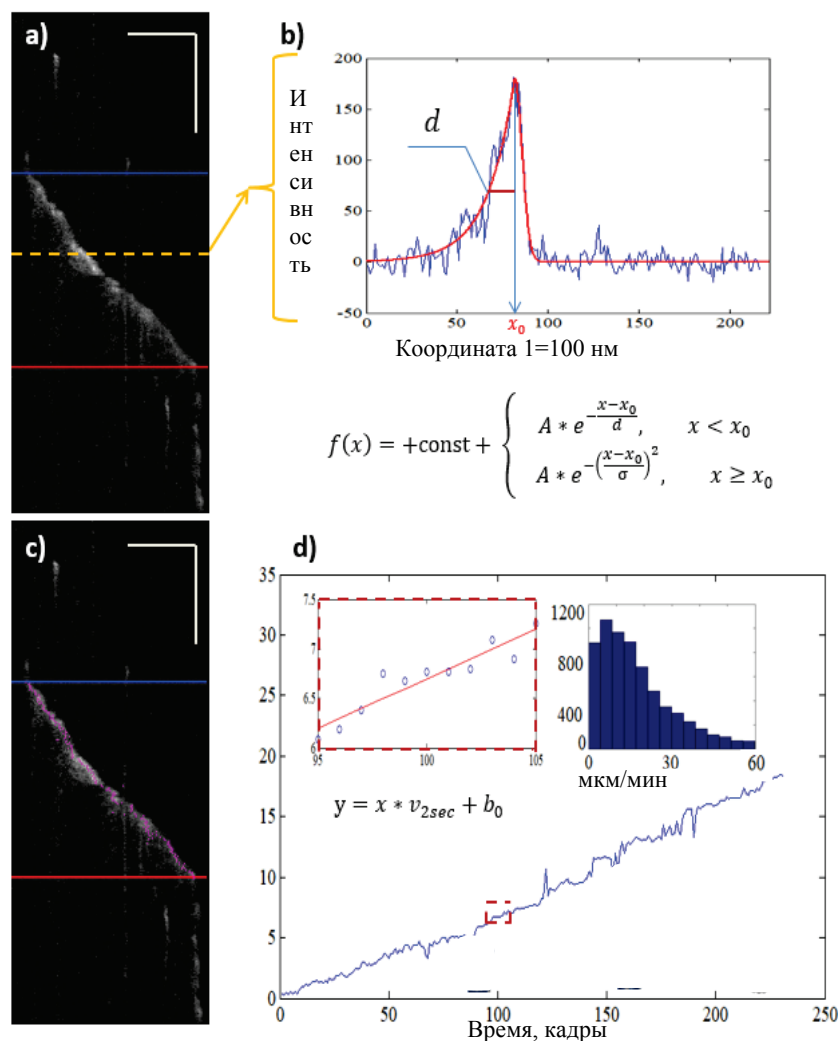
Следующий шаг – построение кимограммы. Кимограмма – особый график, где по оси абсцисс длина ломаной линии, которой выделяется конкретный трек (длина и форма определяется пользователем), по оси ординат – время в кадрах (594 кадра для клеток 3Т3). Благодаря кимограмме можно фиксировать конкретный момент времени в кадрах (~5 кадров соответствуют 1 секунде в реальном времени) и получать профиль интенсивности вдоль ломаной линии – трека кометы. Таким образом, мы получаем профиль распределения интенсивности свечения белка EB3 вдоль микротрубочки. Кимограммы сохраняются в виде таблиц со значениями интенсивности в каждом пикселе (по вертикали ~5 кадров соответствуют 1 секунде видео, по горизонтали – 10 пикселей ~1 мкм). Дальнейшая обработка происходит в программе Matlab.

**Получение профилей кометы.**

Пользователь вручную выделяет участки «жизни кометы на кимограмме». Время жизни кометы определяется так от момента возникновения до полного исчезновения, таким образом, в область жизни кометы входят временные угасания кометы (паузы) (рис. 2а). Каждый кадр представляет собой профиль интенсивности кометы EB3 в определенный момент времени. Для каждой кимограммы есть свой набор профилей, отражающих динамику и форму распределения интенсивности белка EB3.



**Рисунок 1.** Съемка экспериментальных данных в различных режимах. Верхняя панель: клетки 3Т3 (фибробласты мыши) фотографируются в двух режимах: Epi-флуоресценции и режиме TIRF. В отдельном поле показаны кометы EB3 (поле увеличено)



**Рисунок 2.** Процедура обработки кимограммы а) Кимограмма кометы ЕВ (экспериментальные данные). Красные и синие линии показывают моменты появления и вымирания кометы ЕВ. Желтая пунктирная линия показывает фиксированный момент «времени жизни кометы». Горизонтальная шкала составляет 6 мкм, вертикальная шкала - 20 секунд (белые линии). б) Профиль кометы ЕВ в выбранный момент времени (20 секунд с момента возникновения). Красная линия указывает аппроксимацию профиля кусочной функцией  $f(x)$  (см. выше). в) Кимограмма кометы ЕВ (экспериментальные данные). Фиолетовые точки указывают положение центра кометы ( $x_0$ ), определяемое из аппроксимации профилей кусочной функцией. д) Зависимость изменения положения центра кометы во времени. В красном пунктирном треугольнике показан фрагмент графика с точкой, в которой определяется скорость кометы в данный момент времени (20 секунд или 100 кадров). Гистограмма полученных скоростей показана около 73 килограмм

### Функция профиля кометы.

Для получения характеристик кометы (длины кометы, скорости, яркости и т.д.) использовался определенный формализм, основанный на следующих положениях: 1) профиль кометы ЕВ3 стандартно описывается экспоненциальным профилем. [7] 2) кончик микротрубочки может заостряться 3) PSF (Функция Размытия Точки) – для наших данных оставим только диск Эйри, интенсивность которого можно описать функцией Гаусса. Таким образом, мы составили кусочную функцию, чтобы следить не только за длиной кометы, но и за ее передним фронтом, который в первом приближении может отвечать за кончиком микротрубочки (рис. 2б),

$$f(x) = +\text{const} + \begin{cases} A * e^{-\frac{x-x_0}{d}}, & x < x_0 \\ A * e^{-\left(\frac{x-x_0}{\sigma}\right)^2}, & x \geq x_0 \end{cases}$$

где  $A$  – амплитуда;  $d$  – параметр экспоненты  $\Rightarrow$  длина кометы;  $\sigma$  – стандартное отклонение гауссовской функции;  $x_0$  – положение центра кометы,  $\text{const}$  – некая константа, подстраиваемая под общий шум. Теперь аппроксимируем все профили с помощью данной функции, оставив свободными коэффициенты (и обозначив границы подбора)  $A$  (0 800),  $d$  (0 50),  $x_0$  (0 250),  $\sigma$  (0 50),  $\text{const}$  (-50 50). Диапазон для подбора был оставлен

достаточно широкий, однако для уточнения работы программы были использованы стартовые точки, о чем будет идти речь далее.

### Аппроксимация профиля EB3.

Перед аппроксимацией мы подготавливаем сам профиль для корректной работы программы. Прежде всего, необходимо вычесть шум профиля. Для этого мы находим самую правую точку профиля (так как движение кометы всегда идет слева направо), удовлетворяющую данному условию:  $\{\max(\text{profile})-\min(\text{profile})\} * 0.7 = a_0$ . Далее, если  $a_0 + 5$  находится ближе, чем на 5 точек до конца профиля, то в качестве шума берется медиана первых 5 точек профиля, если это условие нарушается, то берется медиана всех точек от  $a_0 + 5$  до конца профиля. Таким образом, шум считается по последним точкам профиля, если комета только родилась, и по первым, если комета уже в конце жизни, так мы точно знаем, что интенсивность кометы не влияет на шум. После вычитания шума профиль готов к аппроксимации.

Чтобы справиться с негауссовским шумом (грязь, образующая стационарные точки, временный вход в область съемки других микротрубочек, образующих дополнительное свечение и т.д.) используется двойная аппроксимация профилей. Для начала все профили аппроксимируются без стартовой точки (она выбирается случайно самой программой Матлаб), далее берутся все рассчитанные  $x_0$  и подвергаются сглаживанию функцией *loess* (рис. 2с). Сглаженные положения центров попадают в стартовую точку для следующей аппроксимации.

Таким образом, программа-обработчик точнее может определить положение центра кометы и другие параметры. Это нужно для того, чтобы функция игнорировала «посторонние» участки интенсивности на профиле, а выдавала исключительно параметры интенсивности самой кометы.

### Получение мгновенной скорости.

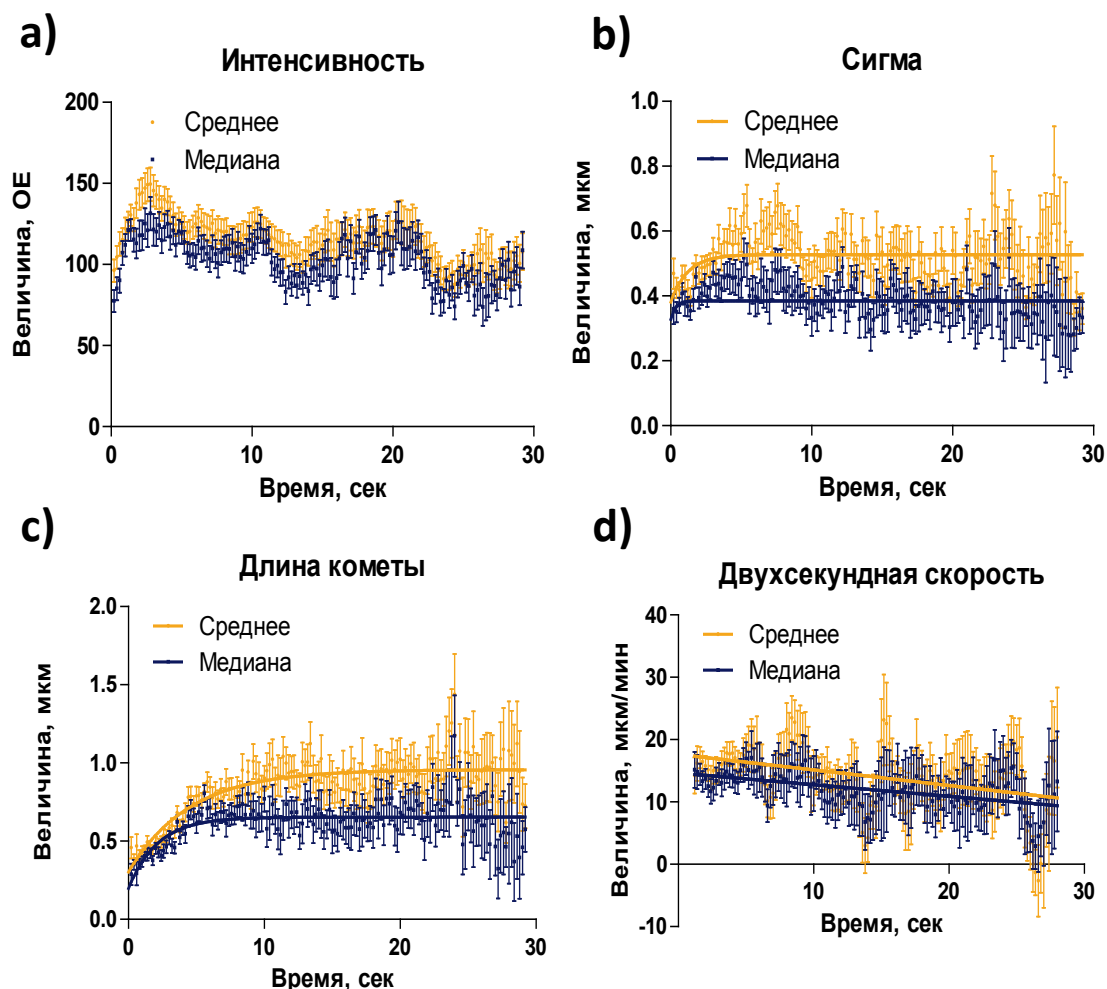
При работе с кимограммами было замечено, что комета не движется с постоянной скоростью, а движется с флуктуациями скорости, что в целом дает некую среднюю скорость, которая может не отражать поведение кометы в отдельные временные промежутки. Так для каждого профиля считается своя «двухсекундная» скорость. Строится график зависимости координаты центра кометы от времени. Для всех центров профилей кроме первых и последних пяти выбираются участки на графике длиной 11 кадров или  $\sim 2$  секунд (11 точек), где 6-я точка – исследуемая. Далее 11 значений аппроксимируются прямой, где коэффициент наклона и будет двухсекундной скоростью данного профиля (рис. 2d). После этого окно смещается на один кадр и аналогичным образом определяется скорость следующего профиля. В результате, для каждого профиля есть свой набор параметров:  $A$  – Амплитуда,  $d$  – длина кометы,  $b$  – длина переднего фронта кометы или длина кончика микротрубочки,  $v_{2sec}$  – скорость кометы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты основаны на статистике, полученной по 73 кимограммам, взятых с фибробластов, снятых в TIRF режиме. Для начального момента времени был выбран момент возникновения кометы (см. методы). Выравнивание проводилось по всем начальным профилям всех данных. Через каждую секунду ( $\sim 5$  кадров) выбирались профили для всех комет, времена жизни которых были больше, чем время конкретного среза. Каждый профиль аппроксимировался описанной выше кусочной функцией и для каждого были получены набор из четырех параметров (амплитуда – интенсивность, сигма, длина кометы, двухсекундная скорость). Для времен больше 30 секунд остается слишком мало профилей с параметрами для усреднения, поэтому отсечка проводилась до тех пор, пока в усреднение входило больше двадцати профилей. На рисунке 3 представлены графики изменения среднего и медианного параметров. Оказалось, что параметры кусочной функции, описывающие длину и сигму кометы EB3-RFP имеют схожую кинетику, характерное время выхода на стационар 3,5 сек. Двухсекундная скорость в среднем также изменяется не сильно и остается относительно постоянной). Средняя и медианная интенсивность также не сильно изменяется, небольшое уменьшение может быть связано с эффектом фотовыгорания. Таким образом, это может свидетельствовать о том, что в среднем на протяжении периода полимеризации микротрубочки структура GTP-шапочки остается неизменной.

### Существенная часть профилей не описывается классическим представлением о распределении белка EB3 на микротрубочке.

Удивительно, но, несмотря на то, что в целом наша функция хорошо подходит для описания среднего профиля интенсивности EB3-RFP отдельные EB3-профили (9 % от общего числа  $R2 < 0,6$  и  $A > 90$ ) имеют дополнительные пики интенсивности EB3-RFP. Такие отклонения могут представлять собой либо дополнительные сложности в связывании EB3 с микротрубочками, либо могут быть вызваны шумом измерения, который, как ожидается, будет более выраженным для тусклых комет с плохим отношением сигнал-шум. Чтобы прояснить этот момент, мы построили зависимость коэффициента детерминации ( $R2$ ) для каждого профиля как функцию амплитуды EB3-кометы. Учитывая четкую корреляцию между плохим коэффициентом детерминации и низкой интенсивностью кометы, мы исключили профили с амплитудами ниже 90 у.е. от рассмотрения. Однако даже среди профилей EB3, чья амплитуда была выше 90 у.е., существенные отклонения от функции модели представляли собой ярко выраженную область (показаны на рисунке 4, красная область).

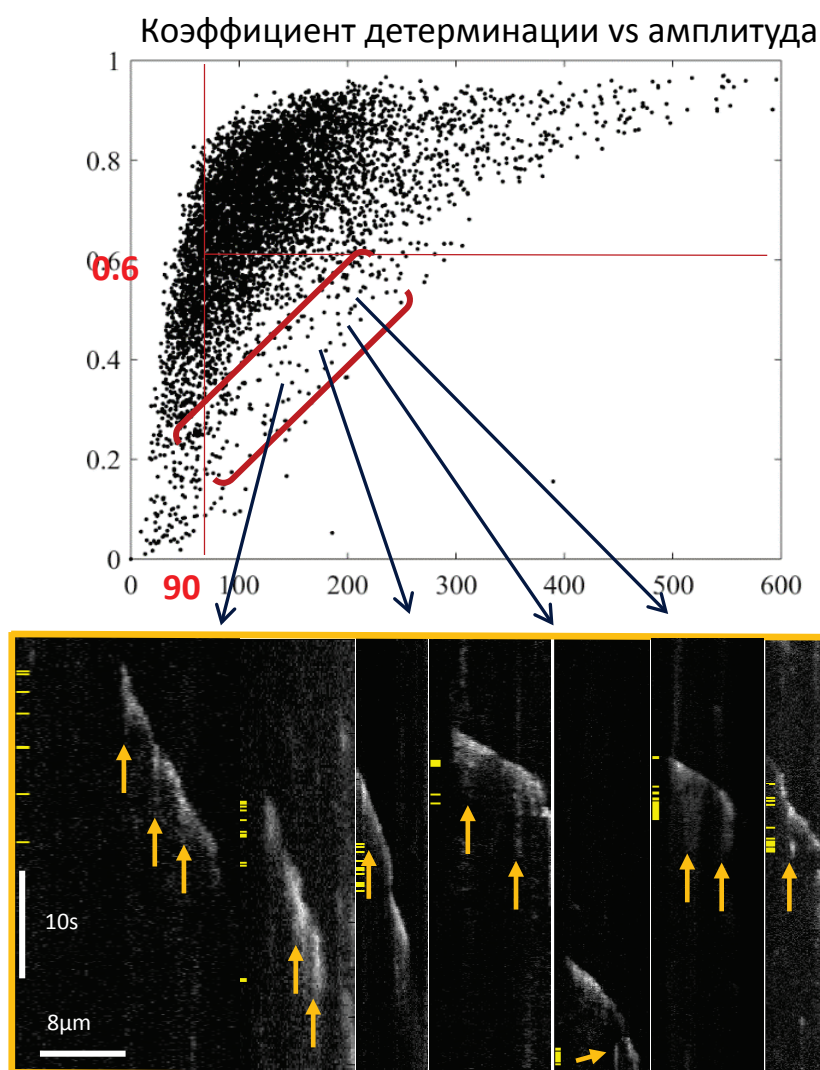


**Рисунок 3.** Средние параметры кометы EB3 остаются постоянными с течением времени а) Интенсивность (пик) кометы, незначительное уменьшение интенсивности связано с эффектом фотовыгорания. б, в) Сигма и длина кометы выходят на стационар после 3,5 секунд с момента рождения кометы. д) Двухсекундная скорость остается относительно постоянной в районе 15 мкм/мин, что соответствует средним скоростям комет *in vivo*

Оказалось, что кимограммы, обогащенные профилями из красной зоны имели стационарные полосы (показаны желтыми стрелками на рис. 4). Сами профили, попадающие в красную зону, на кимограммах обозначены желтыми линиями с левого края кимограммы.

### ОБСУЖДЕНИЕ

По всей видимости, дополнительные зоны связывания EB3 могут свидетельствовать о появлении в теле микротрубочки дополнительных сайтов, содержащих ГТФ-тубулин, встроенный в тело микротрубочки. Причиной появления таких зон могут быть негидролизованные ГТФ в кармане субъединицы тубулина. Так, сайт связывания EB3 остается на месте, но микротрубочка продолжает полимеризацию и комета продолжает движение. Поэтому на кимограмме помимо основного пика появляется стационарная зона, представляющая собой полосу, которая со временем исчезает. В дальнейшем планируется дать количественные оценки этой дополнительной зоны связывания. Однако есть ряд трудностей с описанием дополнительных зон: такие зоны имеют разную интенсивность и могут смешиваться или тонуть в общем шуме, что делает их автоматическое распознавание затруднительным. Так же в дальнейшем планируется проверить существующие модели. Предварительная оценка показывает, что получить такие дополнительные зоны связывания, используя классические представления о полимеризации микротрубочки, невозможно. Это и будут задачи следующего исследования.



**Рисунок 4.** Отдельные профили белка EB3-RFP имеют дополнительную область интенсивности, которые могут являться EB3-островками а) зависимость коэффициента детерминации от амплитуды, ниже показаны кинограммы, для которых характерно появление дополнительной области связывания б) Модифицированная модель VanBuren et al. с добавленным присоединением EB3

Работа была поддержана грантами РФФИ № 16-34-60113, 17-54-33009 и 18-34-00944.

#### Список литературы / References:

1. Bruce A., Bray D., Hopkin K. Essential Cell Biology third edition. Garland science, 2013, vol. 731, p. 577.
2. Desai A., Mitchison T.J. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1997, vol. 13, pp. 83-117.
3. Mustyatsa V.V., Boyakhchyan A.V., Ataulakhyanov F.I., Gudimchuk N.B. Proteins of the EB family: functions and mechanisms of interaction with microtubules. *Biochemistry*, 2017, vol. 82, iss. 7, pp. 1033-1046.
4. Bieling P. [et al.] Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system *in vitro*. *Nature*, 2007, vol. 450, pp. 1102-1104.
5. Duelberg C., Thomas S. [et al.] The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. *eLIFE Research article*.
6. Satoko N., Grigoriev I., Nogi T. Dissecting EB1 and ch-TOG at Microtubule Ends. *PLOS ONE*, 2012, vol. 7 (12), pp. 1-18p.
7. Dominique S., Castele B.T., McIntyre A.J., Odde D.J. Estimating the microtubule GTP Cap Size *in vivo*. *Curr. Biol.*, 2012, vol. 22 (18), pp. 1681-1687.

## FINE STRUCTURE AND DYNAMICS OF EB3 PROFILES ON MICROTUBULES IN FIBROBLAST CELLS

Kostarev A.V.<sup>1</sup>, Mustyatsa V.V.<sup>1,2</sup>, Tvorogova A.V.<sup>1</sup>, Ataulakhanov F.I.<sup>1,2</sup>, Gudimchuk N.B.<sup>1,2</sup>, Vorobiev I.A.<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Moscow State University*Vorobyevy gory St., 2, Moscow, 119234, Russia*<sup>2</sup> Center for Theoretical Problems in Physico-Chemical Pharmacology Russian Academy of Sciences*Kosygina, St., 4, Moscow, 119991, Russia*<sup>3</sup> Nazarbayev University,*Kabanbay batyr Ave., 53, Astana, 010000, Republic of Kazakhstan; e-mail: aleksandrkostarevv@gmail.com*

**Abstract.** In mammals end-binding (EB) proteins family contain three members, EB1/2/3, which associate with the growing tips of microtubules and modulate their dynamics directly and indirectly, by recruiting essential factors to fine-tune microtubules for their many essential roles in cells. Previously EB proteins have been shown to recognize a stabilizing GTP/GDP-pi cap at the growing microtubules in vitro, serving as a marker of instantaneous microtubule stability. However, the fine structure and dynamics of the zone recognized by EB-proteins in live cells have not yet been examined in detail. It has been shown that, on average, EB3-RFP protein profiles on microtubules in murine fibroblasts remain unchanged. However, we found that in some cases the profile has a more complex structure, which differs from the classical representation. By complex form we mean the additional EB3-RFP protein intensity zone on the microtubule, which manifests itself on kymographs as characteristic stationary bands, which in turn can appear both in the microtubule body and near the main peak. We believe that this fact may indicate a more complex structure of the growing plus-end microtubules and GTP caps in particular.

**Key words:** *End-binding protein, microtubule, GTP-tubulin.*