

Примечание. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего. n – количество экспериментальных животных (независимых экспериментов). *Выявлены статистически значимые различия между показателями митохондрий цесарок и аналогичными показателями митохондрий крыс, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что митохондрии печени исследуемых птиц обладают существенно большей резистентностью к действию Ca^{2+} как индуктору ЦсА-чувствительной поры, чем митохондрии печени млекопитающих. Известно, что для эффективной индукции Ca^{2+} -зависимой ЦсА-чувствительной поры необходим транспорт этих ионов в матрикс [2-4]. В связи с этим более высокая резистентность к индукторам ЦсА-чувствительной поры митохондрий печени голубей может быть обусловлена их неспособностью захватывать и удерживать в матриксе Ca^{2+} в необходимом для индукции поры количестве. В отличие от этого митохондрии печени цесарок способны эффективно поглощать и удерживать в матриксе Ca^{2+} в существенно большем количестве, чем митохондрии печени млекопитающих.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00435).

Список литературы / References:

1. Сарис Н.-Е.Л., Карафоли Э. Роль митохондрий в перераспределении внутриклеточного кальция: исторический обзор. *Биохимия*, 2005, т. 70, с. 231-239. [Saris N.E., Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biokhimiya*, 2005, vol. 70, pp. 231-239. (In Russ.)]
2. Lemasters J.J., Theruvath T.P., Zhong Z., Nieminen A.L. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, vol. 1787, pp. 1395-1401.
3. Rasola A., Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell. Calcium*, 2011, vol. 50, pp. 222-233.
4. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. *Мембранная биоэнергетика*. М: Изд. Московского университета, 2010, 368 с. [Skulachev V.P., Bogachev A.V., Kasparinsky F.O. *Membrannaja bioenergetika*. Moscow: Moscow University Press, 2010, 368 p. (In Russ.)]
5. Самарцев В.Н., Дубинин М.В. *Взаимодействие жирных кислот с митохондриями: индукция свободного окисления и кальций-зависимой проницаемости внутренней мембраны*. Йошкар-Ола: изд-во МарГУ, 2016, 176 с. [Samartsev V.N., Dubinin M.V. *Interaction of fatty acids with mitochondria: induction of free oxidation and calcium-dependent permeability of the inner membrane*. Yoshkar-Ola: MarSU Publishing House, 2016, 176 p. (In Russ.)]
6. Varanyuwatana P., Halestrap A.P. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*, 2012, vol. 12, pp. 120-125.
7. Azzolin L., von Stockum S., Basso E., Petronilli V., Forte M.A., Bernardi P. The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett.*, 2010, vol. 584, pp. 2504-2509.
8. Furness L.J., Speakman J.R. Energetics and longevity in birds. *Age (Dordr.)*, 2008, vol. 30, pp. 75-87.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕВЫХ БЕЛКОВ НА МИКРОТРУБОЧКАХ

Костарев А.В., Мустьяца В.В., Творогова А.В., Атауллаханов Ф.И., Гудимчук Н.Б., Воробьев И.А.
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Воробьевы горы, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ
e-mail: aleksandrkostarevv@gmail.com

Аннотация. Микротрубочки – белковые внутриклеточные конструкции, напоминающие трубку, сделанную из протофиламентов – длинных цепочек из белка тубулина. Они динамически нестабильны, что выражается в их постоянном пребывании в фазах роста или укорочения. Микротрубочки участвуют во множестве внутриклеточных процессов, таких как внутриклеточный транспорт, сегрегация хромосом и формирование веретена деления. Эффективный метод исследования динамики микротрубочек основан на особых концевых белках. Концевые белки включают семейство EB-белков (EB1, EB2, EB3), которые распознают только растущий плюс-конец микротрубочки. Считается, что они распознают область, богатую ГТФ-тубулинами и отвечающую за стабильность микротрубочки. В рамках данной работы мы решили проверить эту гипотезу, измерив корреляцию между размером области, распознаваемой белком EB3, скоростью роста микротрубочки и временем роста микротрубочки. Полученные данные, особенно в контексте сравнения с опубликованными ранее результатами *in vitro* экспериментов, позволяют лучше понять характер изменения структуры конца микротрубочек во время роста, а, следовательно - приближают нас к пониманию механизмов динамической нестабильности микротрубочек в живых клетках.

Ключевые слова. Концевой белок, микротрубочка, ГТФ-тубулин, динамическая нестабильность.

STUDY OF THE DISTRIBUTION OF END-BINDING PROTEINS ON MICROTUBULES

Kostarev A.V., Mustyatsa V.V., Tvorogova A.V., Ataullakhanov F.I., Gudimchuk N.B., Vorobjev I.A.

Moscow State University

Vorobyevy gory St., 2, Moscow, 119234, Russia

e-mail: aleksandrkostarevv@gmail.com

Abstract. Microtubules are protein intracellular structures resembling a tube made of protofilaments – long chains of tubulin protein. They are dynamically unstable, which is expressed in their constant presence in the phases of growth or shortening. Microtubules are involved in a variety of intracellular processes such as chromosome segregation and fission spindle formation. An effective method for studying the dynamics of microtubules is based on specific plus-tip-interacting proteins. They include a family of EB proteins (EB1, EB2, EB3) that autonomously recognize the plus-end of the microtubule. It is believed that they recognize the region rich in GTP-tubulins and responsible for the stability of the microtubule. In this paper, we decided to test this hypothesis by measuring the correlation between the size of the region recognized by the EB3 protein, the growth rate of the microtubule, and the growth time of the microtubule. The obtained data, especially in the context of comparison with the previously published in vitro experiments, allow us to better understand the nature of the change in the structure of the end of the microtubules during growth, and hence – bring us closer to understanding the mechanisms of dynamic instability of microtubules in living cells.

Key words. End-binding protein, microtubule, GTP-tubulin, Dynamic instability.

Введение.

Клетка является сложной, многокомпонентной биологической системой, способной к гомеостазу. Еще одно важное свойство клетки как элементарной единицы всего живого – деление. Клеточный цикл состоит из этапов подготовки к делению в интерфазе и этапов самого деления. Процесс удвоения многостадийный, он задействует множество компонентов клетки. Один из этих компонентов – микротрубочки. 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 изменять форму, перестраиваться и обновляться за счет механизма переключения движения 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 в стенке микротрубочки. 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 и диссоциации ГТФ-тубулинов, приводит к быстрому переходу от роста микротрубочки к ее укорочению [2].

Для регулирования динамики микротрубочек в клетках существует множество специальных белков, в число которых входят так называемые плюс-концевые белки (end-binding proteins или EB). Группы концевых белков способны автономно находить и 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 предполагается, что EB-белки можно использовать как маркеры области, отвечающей за стабильность микротрубочки.

Если данные представления верны, то мы должны ожидать, что размер области связывания EB3 должен зависеть от скорости присоединения ГТФ-тубулинов к плюс концу микротрубочки (от скорости роста микротрубочки). С другой стороны – размер стабилизирующей области должен определять время полимеризации микротрубочки. В рамках данной работы мы поставили своей целью определить проверить эти гипотезы, наблюдая за поведением микротрубочек в живых клетках. В качестве объектов исследования использовались живые эпителиальные клетки мыши с флуоресцентным меченым белком EB3-RFP.

В данном исследовании использовались клетки 3T3 – мышинные фибробласты (эпителиальные клетки мыши). Клетки были трансфицированы геном, экспрессирующим белок EB3-RFP. (End-binding protein – red fluorescence protein). Изображения записывались в режиме TIRF с частотой записи 5 кадров в секунду и эквивалентным размером пиксела около 100 нм. На видео можно было наблюдать перемещение белковых структур, называемых кометами EB3 (Рисунок 1.1). 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: инициацию, появление, последующее движение (фаза роста микротрубочки) и угасание, которое в первом приближении свидетельствует о прекращении роста микротрубочки и ее деполимеризации.

Для проверки гипотез нам было необходимо получить три величины для каждой кометы EB3: время жизни (полимеризации микротрубочки, соответствующей комете), длину области связывания EB3 и мгновенную скорость для каждого момента жизни.

Первичная обработка данных проводилась в программе ImageJ. Всего были обработаны более 20 клеток, длительность съемки для каждой была 1 мин. 30 сек. В ходе исследования было отобрано 178 комет. Далее программа, написанная в среде Matlab, позволяет определить длительность существования кометы рисунок 1.6, время задано в кадрах (5 кадров = 1 сек.).

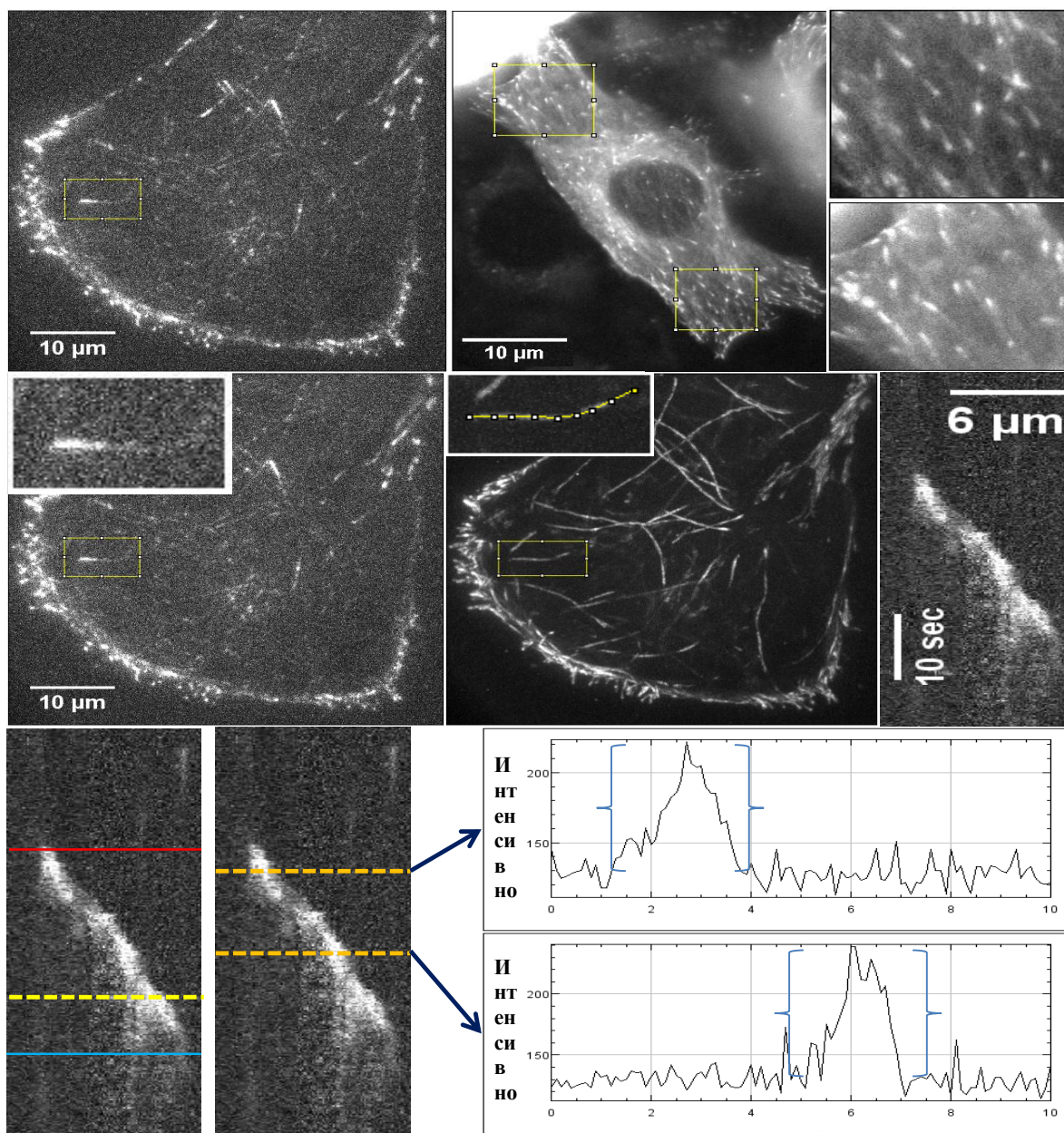


Рисунок 1 – Первичная обработка данных. 1. Представлена клетка 3Т3 (TIRF, 37 °C) 2. Представлена клетка U118 – глиальная человеческая клетка (Epi-флуоресценция 37 °C), видны кометы, движущиеся к периферии клетки. 3. Нахождение кометы на видео (Представлен отдельный кадр). 4. Построение проекции по времени и выделение трека кометы. 5. Создание кимограммы. 6. Красная и голубая линии указывают программно рассчитанные зоны существования кометы, желтая линия показывает кадр с максимальной суммарной интенсивностью кометы. 7. Выделение нужных срезов по времени – получение профилей кометы для конкретных моментов времени. На профилях выделены сами кометы и два фронта кометы: передний и задний соответственно.

Определение длины кометы EB3.

Для каждого момента жизни кометы существует соответствующий профиль распределения белка EB3. Для построения усредненного профиля необходимо провести выравнивание всех профилей. В первом приближении считаем, что профиль можно описать функцией Гаусса

$$F(X) = A * e^{-\left(\frac{(X - X_0)}{\sigma}\right)^2} \tag{1}$$

где A – амплитуда; X_0 – положение центра (вершины); σ – среднеквадратичное отклонение* $\sqrt{2}$.

Проверяем, что в среднем форма профиля оставалась монотонно убывающей почти на всем промежутке времени жизни. Для этого выбираем профили и выравниваем на расчетное положение максимума (см. рис. 2). Мы проследили эволюцию усредненного профиля кометы по абсолютному времени и убедились в сохранении его формы. Теперь перейдем к описанию длины кометы. Профиль, исходя из классических представлений – убывающая от плюс-конца экспонента [5], поэтому найдем длину кометы при помощи аппроксимации экспонентой:

$$F(X) = a \cdot e^{-\left(\frac{X}{b}\right)}, \quad (2)$$

где a – амплитуда экспоненты; b – параметр экспоненты – расстояние, пройдя которое, экспонента уменьшится в $e \sim 2,718$ раз. Будем считать параметр b за длину кометы.

Теперь для каждого профиля можно найти свою длину кометы. Поставим ей в соответствие мгновенную скорость.

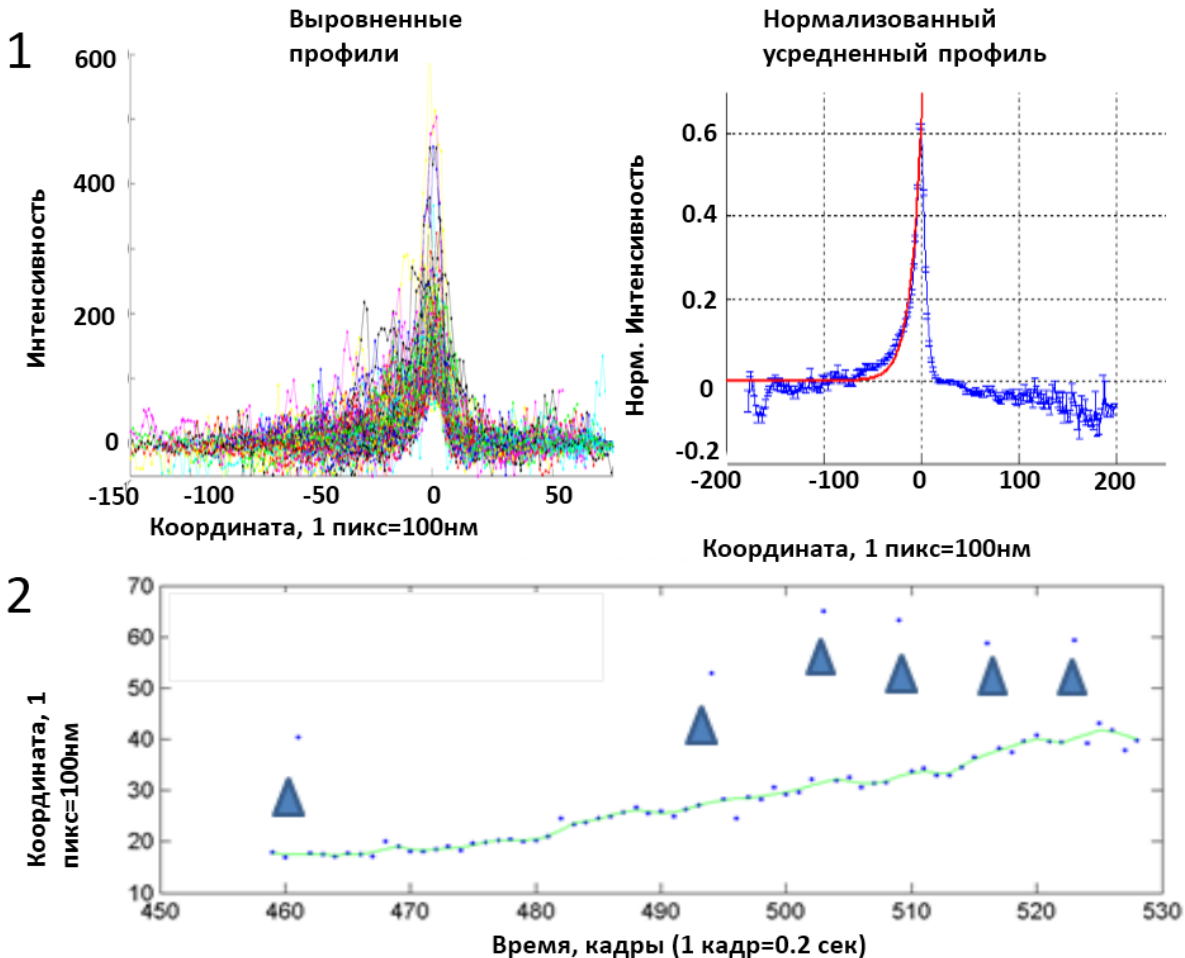


Рисунок 2 – Определение длины кометы и мгновенной скорости. 1. Усредненный профиль интенсивности для момента максимальной яркости кометы; Слева – выровненные 178 профилей комет, справа – нормализованный профиль интенсивности с аппроксимацией убывающей экспонентой. 2. Определение мгновенной скорости: График зависимости положения максимума кометы от времени – синие точки, выпадающие точки выделены треугольниками, зеленая линия – результат сглаживания.

Определение мгновенной скорости.

Для определения мгновенной скорости был построен аналог кимограммы (см. рис. 2.2), где по оси ординат указано положение пика по координате, а по оси абсцисс указан кадр, то есть время жизни кометы ($1c = 5$ кадров). Данный график сглаживался робастным методом Loess, который присваивает веса каждой точке тем меньше, чем дальше они от среднего значения, таким способом данный метод «возвращает» выпавшие точки обратно на график, формируется новый массив положений центров кометы, затем подсчитывается мгновенная скорость. В качестве скорости был взят коэффициент полинома первой степени, которым аппроксимируется 5 точек до выбранной и 5 точек после нее.

Построена следующая зависимость длины кометы от скорости ее роста. Можно интерпретировать этот результат следующим образом: длина зоны связывания ЕВЗ становится тем больше, чем быстрее происходит

процесс полимеризации. Это можно объяснить тем, что ГТФ-тубулин гидролизует с постоянной скоростью, которая не зависит от роста плюс-конца, и, если плюс-конец растет очень быстро, то ГТФ-тубулин не успевает гидролизироваться, поэтому ГТФ-шапочка увеличивается, по этой причине зона связывания EB3 тоже увеличивается, что подтверждается данными, полученными *in vitro*, но в меньшем диапазоне скоростей.

Результаты и обсуждение.

После обработки данных были получены следующие зависимости (см. рис. 3). Нами выявлена положительная корреляция длины кометы EB3 в живых клетках со скоростью роста микротрубочки. Это может объясняться тем, что при больших скоростях полимеризации микротрубочки ГТФ-шапочка сохраняет постоянную скорость гидролиза, поэтому при присоединении новых димеров ГТФ-тубулина «старые» еще не успели гидролизироваться. Соответственно, рост ГТФ-шапочки сопровождается ростом зоны связывания EB3. Это наталкивает на мысль, что с увеличением стабилизирующей зоны трубочка должна дольше полимеризоваться, и должна быть прямой зависимостью времен жизни кометы EB3 от их длины. Однако результат оказался неожиданным: продолжительность роста микротрубочки не зависела от величины кометы. Это можно объяснить двумя предположениями: 1. EB3 узнает не ГТФ зону на микротрубочке, а некую другую, например, ГДФ-фосфатную зону, являющуюся промежуточной между ГДФ- и ГТФ-связанным тубулином; 2. для микротрубочки стабильность не определяется на всем промежутке времени ее роста, а может быть определена для конкретного момента времени и конкретной величины кометы. Так разброс длин комет в пределах одной микротрубочки сильно варьирует в течение времени, что говорит о высокой вероятности правильности данного вывода. Последняя гипотеза согласуется с данными, полученными в группе Тома Серри [6]. Дальнейшая работа будет посвящена проверке эти двух гипотез, с целью пролить свет на механизм динамической нестабильности микротрубочек в живых клетках.

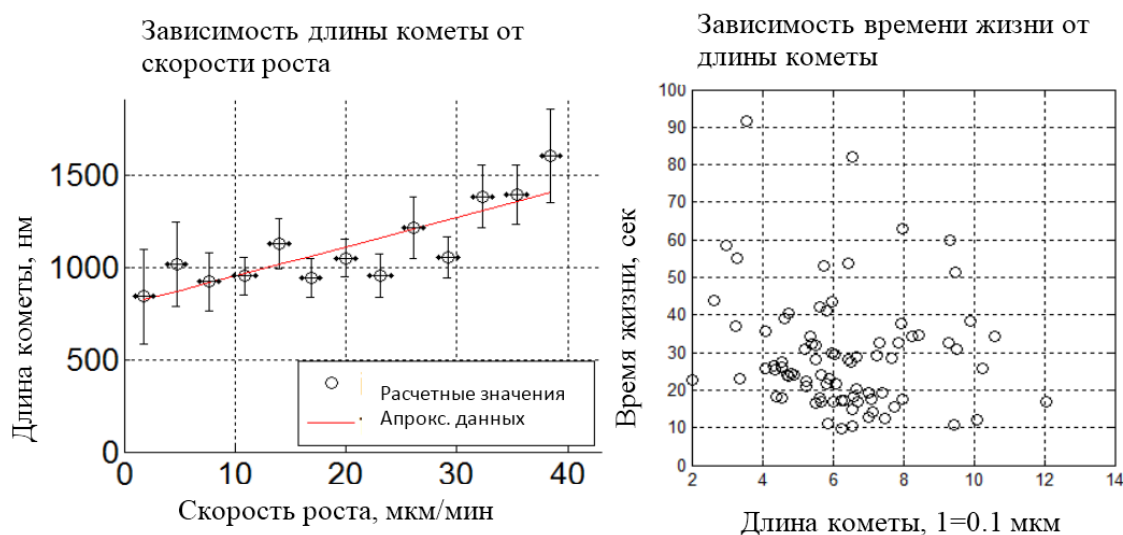


Рисунок 3 – Зависимости измеренных величин. 1. Зависимость длины кометы от скорости роста 2. Зависимость времени жизни от длины кометы: коэффициент корреляции -0.12

Список литературы / References:

1. Alberts B., 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., Boyakhyan A.V, Ataulkhanov F.I., Gudimchuk. EB-familie Proteins and Microtubule Interaction Mechanisms. *Biochemistry*, 2017, vol. 82, pp. 1033-1046.
4. Maurer S.P. [et al.] GTP_γS microtubule mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). *PNAS*, 2011, vol. 108, no. 10, pp. 3988-3993.
5. Bieling P. [et al.] Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system *in vitro*. *Nature*, 2007, vol. 450, pp. 1102-1104.
6. Duelberg Christian, Thomas Surrey [et al.] The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. *eLIFE Research article*, 2011, pp. 845-850.