

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА БИОФИЗИКИ

На правах рукописи

Анисимов Михаил Николаевич

**МЕХАНИЗМЫ ДИНАМИКИ МИКРОТРУБОЧЕК И ЕЁ РЕГУЛЯЦИИ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ИНГИБИТОРАМИ**

Специальность 1.5.2 - Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

д.ф.-м.н. Н.Б. Гудимчук

Москва - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Строение и свойства микротрубочек	14
1.1.1. Общие сведения о микротрубочках	14
1.1.2. Строение микротрубочек	15
1.1.3. Динамика микротрубочек	19
1.2. Регуляция динамики микротрубочек	25
1.2.1. Низкомолекулярные модуляторы.....	25
1.2.2. Модуляторы белковой природы	29
1.3. Методики исследования микротрубочек <i>in vitro</i>	31
1.3.1. Классическая методика визуализации динамики микротрубочек <i>in vitro</i>	31
1.3.2. Методы оптической микроскопии (DIC, TIRF)	34
1.4. Методики скрининга низкомолекулярных модуляторов микротрубочек ...	37
1.4.1. Поиск противоопухолевых препаратов на основе анализа профилей цитотоксичности	37
1.4.2. Методы общего назначения для характеристики взаимодействия «белок-лиганд»	38
1.4.3. Методы специального назначения для характеристики взаимодействия «тубулин-лиганд».....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
2.1. Очистка белков и приготовление стабилизированных микротрубочек.....	43
2.1.1.Белок тубулин	43
2.1.2.Белки EB1 и CLASP	43
2.1.3. Приготовление стабилизированных микротрубочек	45

2.2. Микроскопия микроотрубочек	47
2.2.1 Подготовка покровных стёкол.....	47
2.2.2 Приготовление проточной камеры.....	48
2.2.3. Наблюдение динамики микроотрубочек	48
2.2.4. Наблюдение встраивания ГТФ-тубулина в решетку микроотрубочек ...	49
2.2.5. Предварительная обработка данных для устранения засветки на краях микропедесталов.....	51
2.2.6. Анализ динамики микроотрубочек и включения ГТФ-тубулина в структуру микроотрубочек <i>in vitro</i>	52
2.3. Низкомолекулярные ингибиторы динамики микроотрубочек.....	55
2.3.1. Поиск потенциальных лигандов белка тубулина в базе данных NCI ...	55
2.3.2. Получение веществ для скрининга	56
2.3.3. Изучение эффектов веществ на динамику микроотрубочек <i>in vitro</i>	57
2.3.4. Изучение эффектов веществ на раковые клетки.....	57
2.3.5. Измерения флуоресценции кумарина-30.....	60
2.3.6. Определение констант диссоциации кумарина-30 и других лигандов белка тубулина.....	61
2.3.7. Новый метод скрининга потенциальных лигандов белка тубулина	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	67
3.1. Классическая методика наблюдения динамики микроотрубочек	67
3.1.1.Изучение встраивания ГТФ-тубулина в места дефектов микроотрубочек	67
3.1.2. Изучение спасений микроотрубочек.....	68
3.2. Методика наблюдения микроотрубочек на микропедесталах	71
3.2.1. Вдали от поверхности покровного стекла ГТФ-тубулин реже встраивается в решетку микроотрубочек	71

.2. Оценка чувствительности детектирования ГТФ-островков.....	74
3.2.3. Вдали от поверхности покровного стекла частота спасений ниже, чем у поверхности стекла	78
3.3. Изучение регуляции динамики микротрубочек при использовании двух экспериментальных методик.....	80
3.3.1.Изучение спасений микротрубочек, вызванных белком EB1 и паклитакселом	80
3.3.2.Изучение спасений микротрубочек, вызванных винбластином	82
3.3.3. Изучение спасений микротрубочек, вызванных комбинацией винбластина и паклитаксела	83
3.3.4. Фрагмент белка CLASP2 увеличивает частоту спасений при использовании обеих экспериментальных методик.....	84
3.3.5. Общие данные о спасениях микротрубочек, полученные с использованием двух экспериментальных методик.....	85
3.3.6. Механизм регуляции спасений микротрубочек.....	87
3.4. Поиск новых ингибиторов динамики микротрубочек	90
3.4.1. Кумарин-30 эффективно подавляет динамику микротрубочек <i>in vitro</i> . 90	
3.4.2. Кумарин-30 эффективно подавляет деление раковых клеток.....	92
3.4.3. Кумарин-30 связывается с растворённым белком тубулином и конкурирует с колхицином за сайт связывания.....	93
3.4.4. Новый метод скрининга на основе кумарина-30 и микромасштабного термофореза	94
3.4.5. Проверка нового метода скрининга на известных лигандах белка тубулина	95
3.4.6. Интерпретация сигналов микротермофореза в новом методе скрининга	97

3.4.7. Определение новых лигандов белка тубулина	103
3.4.8. Проверка эффектов отобранных веществ <i>in vitro</i> и на клеточных культурах.....	106
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	108
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	113
ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	113
БЛАГОДАРНОСТИ	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность изучения динамики микротрубочек и её подавления низкомолекулярными ингибиторами обуславливается важной физиологической и биофизической ролью микротрубочек в клеточных процессах и последними достижениями в данной области.

Благодаря своим уникальным свойствам микротрубочки выступают в роли каркасных элементов внутри клетки и ключевого звена её сложной машинерии, обеспечивающей поиск, захват и разнесение хромосом по дочерним клеткам во время деления. Важность микротрубочек в клеточном делении делает их объектом фундаментальных и прикладных исследований.

Фундаментальные вопросы о механизмах поведения микротрубочек в значительной степени сфокусированы на явлении динамической нестабильности. В отличие от других элементов цитоскелета, актиновых и промежуточных филаментов, полимеры белка тубулина могут спонтанно переключаться с фазы сборки на фазу разборки (во время так называемых катастроф) и обратно (во время спасений). Известно, что белок тубулин связывается с гуанозинтрифосфатом (ГТФ) и полимеризуется в его присутствии. В полимеризованном виде белок тубулин способен катализировать гидролиз ГТФ. Считается, что ключевую роль в катастрофах микротрубочек играет преобразование энергии, выделяющейся в результате гидролиза ГТФ и запасующейся в виде упругой деформации молекул белка тубулина в решетке микротрубочки. Преимущественная локализация молекул белка тубулина, связанных с ГТФ, на растущем конце микротрубочки называется ГТФ-шапкой. Наличие ГТФ-шапки может стабилизировать всё тело микротрубочки. В то же время, механизм спасений, то есть спонтанного возобновления микротрубочкой сборки после катастрофы в произвольном месте решетки вдали от ГТФ-шапки, изучен значительно хуже. Современные экспериментальные данные о дефектах регулярной решетки микротрубочки и особенностях её строения позволяют выдвигать гипотезы о роли таких дефектов в динамической нестабильности наряду с ролью ГТФ-шапки. Такой подход оказывается важен для понимания

динамических свойств микротрубочек и взаимодействия микротрубочек с регуляторными молекулами различной природы. Как и на концах микротрубочки, в её решетке могут происходить динамические процессы диссоциации и встраивания молекул белка тубулина. Особенности этих процессов и вызывающие их причины активно изучаются, их роль становится все более очевидной, особенно, в случае спасений микротрубочек.

Регуляторы динамики микротрубочек белковой и низкомолекулярной природы очень разнообразны. Спектр действия этих молекул охватывает влияние на все параметры динамической нестабильности, включая скорость роста и укорочения, частоту катастроф и спасений. Ярким примером могут быть белки семейства EB (англ. End Binding), связывающиеся с растущими концами микротрубочек и увеличивающие частоту катастроф. EB-белки могут вовлекать другие внутриклеточные регуляторы динамики, выступая в роли посредника для их взаимодействия с концами микротрубочки. Например, белки семейства CLASP (англ. Cytoplasmic Linker Associated Protein) наоборот, стабилизируют микротрубочки благодаря способности связываться с их концами через EB-белки или взаимодействуя непосредственно с решеткой микротрубочек; известно также широкое разнообразие других белковых модуляторов динамики микротрубочек. Низкомолекулярные вещества, взаимодействующие с микротрубочками, могут подавлять их динамику. Это активно используется в медицине для борьбы с раковыми клетками, которые характеризуются неограниченным ростом и пролиферацией за счет нарушений механизмов контроля клеточного деления. Однако многие особенности и механизмы действия низкомолекулярных веществ на динамику микротрубочек остаются изученными не до конца, что не позволяет более эффективно задействовать их потенциал в химиотерапии. Например, наиболее широко используемое в химиотерапии вещество паклитаксел, как и его аналоги, подавляет катастрофы микротрубочек, а в присутствии EB-белков вызывает частые спасения. Для этого паклитаксел должен оказаться во внутренней части микротрубочки, так как именно там располагается его сайт связывания с белком тубулином. Поэтому возникают вопросы о роли дефектов в

проникновении паклитаксела внутрь решетки микротрубочек, его эффектов на динамическую нестабильность, в том числе, в комбинации с другими регуляторными молекулами.

Прикладные исследования в рамках диссертационной работы сфокусированы на поиске новых низкомолекулярных ингибиторов динамики микротрубочек. Необходимость этого определяется резистентностью некоторых типов раковых клеток к действию на них ядов. В этой области значительные усилия направлены на разработку новых соединений, которые способны связываться с другими сайтами белка тубулина. Сайт связывания колхицина стал известен первым среди семи открытых на данный момент. Однако до сих пор ни одно вещество, связывающееся с этим сайтом, не вошло в клиническую практику для терапии опухолей. Это обстоятельство стимулирует поиск более подходящих для химиотерапии аналогов колхицина и развитие новых методов скрининга потенциальных лигандов белка тубулина.

Современные структурные данные выявляют ранее не известные особенности строения микротрубочек. Достижения экспериментального изучения микротрубочек в значительной степени основаны на способности той или иной *in vitro* экспериментальной методики контролируемо воспроизвести условия, при которых эти особенности строения начинают играть очевидную роль в динамической нестабильности микротрубочек. Вместе с вычислительным экспериментированием (*in silico*) такой подход уже позволяет сформулировать новые представления о том, какие динамические процессы происходят внутри решетки микротрубочки вдали от её концов, и как эти процессы влияют на динамику всей микротрубочки.

Особенности строения микротрубочек играют важную роль в регуляции поведения микротрубочек, что проявляется в *in vitro* экспериментах с участием низкомолекулярных и белковых модуляторов динамической нестабильности. В плотно заполненной различными молекулами внутриклеточной среде естественные условия функционирования микротрубочек более разнообразны. Вместе с тем, новые или не до конца понятные механизмы регуляции

микротрубочек при фундаментальном подходе к их исследованию и успешному описанию имеют перспективу дать новые возможности в прикладных областях. Например, в медицине необходим постоянный поиск новых эффективных противоопухолевых препаратов. Ингибиторы динамики микротрубочек как один из наиболее успешно зарекомендовавших себя классов химиотерапевтических препаратов требуют постоянной разработки для преодоления резистентности некоторых типов раковых клеток к действию на них подобных ядов. Это требует выяснения механизма действия уже применяемых в химиотерапии ингибиторов динамики микротрубочек и создания методов быстрого и эффективного скрининга для поиска веществ с желаемыми свойствами.

Научная новизна

1. Впервые экспериментально измерены частоты появления дефектов решетки микротрубочек и спасений с применением новой *in vitro* экспериментальной методики, в которой микротрубочки наблюдаются на микропьедесталах над покровным стеклом. Данная экспериментальная методика, в отличие от всех остальных, позволяет изучать динамическую часть микротрубочки вдали от поверхности покровного стекла, которое может вносить артефакты при взаимодействии с ним решетки микротрубочки. Показано, что вдали от поверхности покровного стекла микротрубочки имеют более регулярную решетку и реже испытывают спасения. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что дефекты решетки микротрубочки и динамические процессы в них играют основную роль в механизме спасений.
2. С использованием новой экспериментальной методики впервые показано, что низкомолекулярные ингибиторы динамики микротрубочек, паклитаксел и винбластин, способны оказывать неаддитивные эффекты на динамику микротрубочек. Показано, что паклитаксел вызывает спасения микротрубочек зависимым от их дефектов образом.
3. Для решения прикладной задачи поиска новых препаратов химиотерапии в данной работе разработан новый метод скрининга потенциальных лигандов белка тубулина на основе флуоресцентного вещества кумарин-30 и метода

микромасштабного термофореза (микротермофореза). Впервые показана способность кумарина-30 связываться с колхициновым сайтом белка тубулина и подавлять динамику микротрубочек. Разработанный метод позволяет по конкуренции с кумарином-30 находить лиганды колхицинового сайта белка тубулина и детектировать взаимодействие лигандов с другими сайтами белка тубулина, что отличает этот метод от всех остальных. Данный метод позволил обнаружить новые ингибиторы динамики микротрубочек, связывающиеся с колхициновым сайтом белка тубулина.

Степень разработанности выбранной темы

Исследование динамической нестабильности микротрубочек в течение почти сорока лет с момента обнаружения этого феномена [Mitchison, Kirschner, 1984] сопровождалось значительным прогрессом в разработке и применении новых методов экспериментального и теоретического изучения особенностей динамической нестабильности и её регуляции молекулами различной природы. Однако ряд вопросов остаётся не решённым, а новые экспериментальные данные приводят к новым вопросам. В частности, механизм спасений и то, какую роль в нем играют дефекты решетки микротрубочек. Не до конца понятны пути регуляции динамики микротрубочек низкомолекулярными веществами, используемыми в медицине, и белками, в том числе в комбинации друг с другом. Разработка новых ингибиторов динамики для применения их в медицине основана на новых подходах, в том числе, методах скрининга веществ-кандидатов.

Цель исследования: определить молекулярные механизмы динамической нестабильности микротрубочек, принципы ее регуляции и разработать новые ингибиторы данного процесса.

Задачи исследования:

1. Определить роль структурных дефектов микротрубочки в её переключении от разборки к сборке.
2. Определить механизмы регуляции частоты этих переключений (называемых спасениями) белковыми эффекторами и низкомолекулярными ингибиторами.

3. Разработать и применить подход для поиска новых низкомолекулярных ингибиторов динамики микротрубочек.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются микротрубочки и регуляторы их динамического поведения. Предмет исследования — механизмы динамической нестабильности микротрубочек и её регуляция низкомолекулярными веществами и ассоциированными с микротрубочками белки.

Теоретическая значимость работы заключается в установлении физических механизмов динамического поведения микротрубочек. Конкретнее, данная работа устанавливает механизм спасений микротрубочек на основе экспериментальных данных о структурных особенностях строения решетки микротрубочек.

Практическая значимость работы заключается в уточнении механизмов действия применяемых в медицине ингибиторов динамики микротрубочек и в разработке нового метода для поиска других эффективных ингибиторов белка тубулина.

Методология и методы исследования

Для исследования динамической нестабильности отдельных микротрубочек *in vitro* использовалась оптическая микроскопия: метод дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии (DIC), флуоресцентная микроскопия, в том числе, полного внутреннего отражения TIRF. Для осуществления новой экспериментальной методики с использованием микропедесталов использовался метод фотолитографии. Исследование взаимодействия между белком тубулином и его лигандами проводилось с помощью спектрофотометрии, спектрофлуориметрии и метода микротермофореза. Работа также включала изучение эффектов низкомолекулярных ингибиторов динамики микротрубочек на культуры раковых клеток с помощью оптической микроскопии, проточной цитометрии и анализа полученных данных.

Часть методов, включая новую экспериментальную методику с использованием микропъедесталов и новый метод скрининга лигандов белка тубулина, являются полностью оригинальными и были разработаны автором в ходе выполнения диссертационной работы.

Положения, выносимые на защиту

1. Встраивание ГТФ-тубулина в места структурных дефектов решетки микротрубочек является основной причиной их переключений от разборки к сборке. Структурные дефекты микротрубочек могут индуцироваться неспецифическими контактами с окружающими объектами. Микротрубочки, полимеризованные в изоляции от неспецифических контактов, имеют более регулярную решетку и характеризуются почти на порядок меньшей пространственной частотой встраивания ГТФ-тубулина из раствора в решетку: частота снижена с 0.12 ± 0.02 до 0.020 ± 0.005 мкм⁻¹; частота спасений микротрубочек с регулярной решеткой также значительно снижена с 1.7 ± 0.6 до 0.5 ± 0.2 мин⁻¹.
2. Низкомолекулярные ингибиторы динамики микротрубочек, паклитаксел и винбластин, воздействуя одновременно, могут неаддитивно модулировать частоту спасений микротрубочек. Винбластин усиливает стабилизирующий эффект паклитаксела, увеличивая частоту спасений микротрубочек посредством стимуляции формирования структурных дефектов в их решетке.
3. Использование кумарина-30 в качестве флуоресцентного зонда для белка тубулина позволяет обнаруживать взаимодействие данного белка с низкомолекулярными лигандами и проводить классификацию их по сайту связывания на основе измеряемых параметров микротермофоретических кривых.

Степень достоверности результатов обусловлена проведением всех экспериментов в необходимом количестве независимых повторов, применении статистической обработки данных, верификации результатов несколькими независимыми методами.

Личный вклад автора заключается в анализе научной литературы, разработке новых методик, планировании и проведении экспериментов,

обработке и анализе полученных результатов, представлении результатов на научных мероприятиях и подготовке публикаций в научных журналах.

Публикации

Всего опубликовано 6 статей. По теме диссертации опубликовано 5 статей, из них в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК и индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI — 3 статьи.

Апробация работы

Основные результаты диссертации были представлены и обсуждены на пяти всероссийских и международных конференциях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Строение и свойства микротрубочек

1.1.1. Общие сведения о микротрубочках

Микротрубочки представляют собой внутриклеточные цитоскелетные элементы, состоящие из белка тубулина. Полимеризуясь в присутствии ГТФ, гетеродимеры белка тубулина формируют друг с другом продольные и поперечные контакты. Благодаря этому образуются структуры в виде длинных тяжей вдоль оси микротрубочки — протофиламенты, которые могут за счет поперечных контактов друг с другом замыкаться в полый цилиндр — микротрубочку. В полимеризованном виде белок тубулин катализирует гидролиз ГТФ [David-Pfeuty, Erickson, Pantaloni, 2006], что приводит к дестабилизации всей решетки микротрубочки. Внутри клетки микротрубочки выполняют множество различных функций благодаря своим уникальным свойствам. С одной стороны, за счёт геометрии своего строения в виде полого цилиндра, микротрубочки обладают значительной жесткостью и выполняют функцию каркасных структур внутри клетки. С другой стороны, микротрубочки очень динамичны, они могут спонтанно переключаться между фазами полимеризации и деполимеризации во время так называемых катастроф и спасений [Gudimchuk, McIntosh, 2021]. Скорость сборки и разборки, а также частота переходов между этими фазами (то есть частотой катастроф и спасений) являются основными параметрами так называемой динамической нестабильности, отражающей уникальное поведение микротрубочек.

Изменения частоты катастроф и спасений влияют на распределение длин микротрубочек в клетке и локализацию их динамических концов, которые функционируют как генераторы силы и концентраторы сигнальных и адаптерных белков [Akhmanova, Steinmetz, 2015]. Частоты катастроф и спасений жестко регулируются в клетке, чтобы контролировать динамику микротрубочек на протяжении всего клеточного цикла. Например, частота спасений снижается

примерно в четыре-семь раз, а частота катастроф увеличивается примерно в два-три раза, когда соматические клетки млекопитающих вступают в митоз [Rusan и др., 2002]. Считается, что это изменение в динамике микротрубочек имеет решающее значение для поиска и захвата хромосом [Holy, Leibler, 1994], [Wollman и др., 2005].

Среди основных естественных регуляторов динамики микротрубочек — молекулы белковой природы, так называемые ассоциированные белки. Кроме них, относительно более простые низкомолекулярные вещества тоже способны сильно влиять на параметры динамики, связываясь с белком тубулином в определённых местах, называемых сайтами. Такие вещества принято называть ингибиторами динамики микротрубочек. Ввиду важности микротрубочек в клеточном делении, ингибиторы динамики нашли широкое применение в медицине для лечения опухолей за счет блокирования деления раковых клеток.

1.1.2. Строение микротрубочек

Микротрубочка имеет регулярную решетку из гетеродимеров белка тубулина. Гетеродимеры имеют длину около 8 нм и образуют друг с другом нековалентные связи таким образом, что бета мономер одного димера взаимодействует с альфа мономером другого. С помощью электронной микроскопии установлено, что организация тела микротрубочки на уровне связей между гетеродимерами представлена так называемой В-решеткой [Kikkawa и др., 1994]. Это означает, что в контактах между протофиламентами участвуют одинаковые мономеры гетеродимеров. Вместе с тем, замыкание решетки в полый цилиндр происходит по спирали, у которой один виток по окружности сдвинут вдоль оси микротрубочки на определённое число мономеров белка тубулина. Эта особенность может приводить к наличию между выделенными двумя соседними протофиламентами такого контакта, при котором происходит поперечное взаимодействие между альфа и бета мономерами этих протофиламентов. Этот

контакт называют швом, и до сих пор неизвестно, есть ли у него какая-нибудь функциональная роль [Zakharov и др., 2016]. В клетках эукариот каноническое строение решетки микротрубочки представлено 13 протофиламентами [Amos, Hirose, 2007], шагом спирали в три мономера и диаметром около 25 нм (Рис. 1). В то же время, *in vitro* могут быть получены микротрубочки с количеством протофиламентов больше или меньше 13 [Chrétien, Flyvbjerg, Fuller, 1998; Meurer-Grob, Kasparian, Wade, 2001] и разным шагом спирали. Количество протофиламентов в теле микротрубочки и шаг её спирали могут переключаться в процессе полимеризации. Конфигурации решетки, отличные от канонической, приводят к смещениям протофиламентов, что позволяет сохранить непрерывность поперечных и продольных связей между молекулами белка тубулина (Рис. 1)[Chrétien, Fuller, 2000].

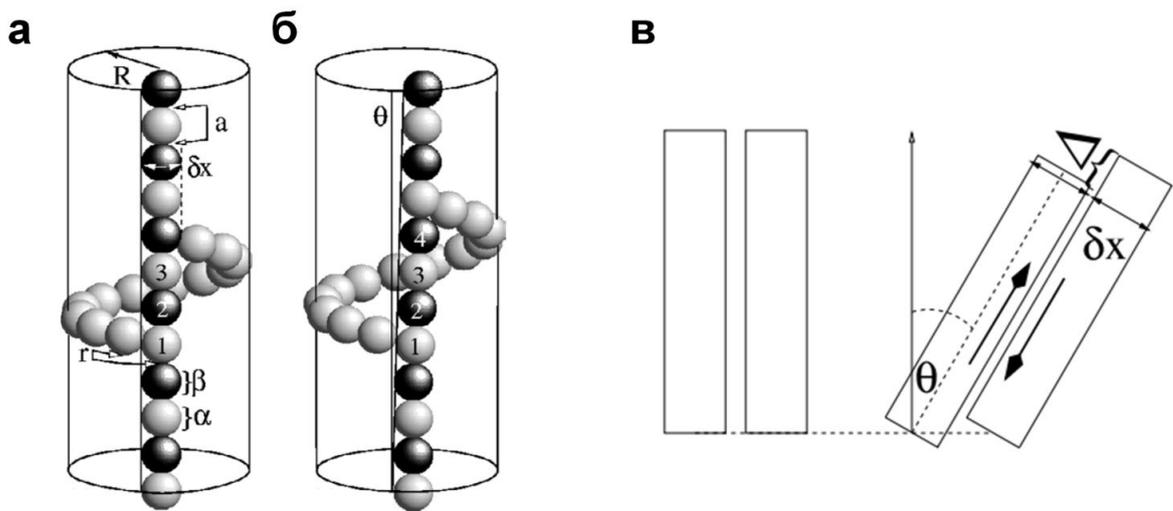


Рис. 1. Строение микротрубочки. а) Схема конфигурации решетки с 13 протофиламентами и заходностью спирали в 3 мономера белка тубулина. δx — расстояние между протофиламентами, a — расстояние между мономерами, r — подъем мономера в витке спирали, а R — эффективный радиус микротрубочки. б) Схематическое изображение неканонической решетки микротрубочки с 14 протофиламентами и заходностью спирали 4 мономера. Угол наклона протофиламентов θ . в) Показано возникновение напряжения сдвига вдоль поперечных контактов вследствие наклона протофиламентов. Когда протофиламенты, имеющие конечную толщину dx , наклоняются на угол θ , соседние боковые контакты смещаются на расстояние Δ . [Hunyadi, Chrétien, János, 2005].

Такие смещения связаны с деформациями решетки, способными запасать значительную упругую энергию, сопоставимую с величиной свободной энергии гидролиза ГТФ. Поэтому есть основания полагать, что не только гидролиз ГТФ в составе микротрубочки может определять её динамическое поведение, но также и особенности самого строения решетки [Hunyadi, Chrétien, Jánosi, 2005].

Переключения конфигурации решетки микротрубочки, а также различные внешние воздействия (неспецифическое взаимодействие с другими объектами, излучением или специальными белками) могут приводить к дефектам регулярной решетки микротрубочки. Основные типы дефектов показаны на Рис. 2. Среди них можно выделить два вида дефектов, одни из которых способны полностью восстанавливаться за счет встраивания в них свободного ГТФ-тубулина из раствора («пропуск») и те, которые не могут быть полностью восстановлены таким образом из-за смены конфигурации самой решетки.



Рис. 2. Типы дефектов решетки микротрубочки [Théry, Blanchoin, 2021].

Экспериментальное изучение особенностей строения микротрубочек с помощью криоэлектронной и оптической микроскопии показывает значительную степень неоднородности их решетки *in vitro*. Доказательства структурных нарушений в микротрубочках весьма многочисленны и были задокументированы в литературе ([Aumeier и др., 2016], [Schaedel и др., 2015], [Schaedel и др., 2019], [Debs и др., 2020], [Guyomar и др., 2022]). Так, на Рис. 3 показан пример трёхмерной визуализации дефектов с помощью криоэлектронной томографии. В данном эксперименте использовались микротрубочки, полимеризованные в

присутствии медленногидролизуемого аналога ГТФ, GMPCPP. Можно видеть, что положения дефектов совпадают с местами переключения количества протофиламентов микротрубочки (с 14 на 16 и обратно). В плотно заполненной различными компонентами внутриклеточной среде наличие дефектов микротрубочек тоже подтверждается экспериментально. Как следствие пересечения микротрубочек друг с другом, другими элементами цитоскелета и органеллами ([Dimitrov и др., 2008], [Aumeier и др., 2016], [Schaedel и др., 2021]), дефекты решетки могут быть вызваны естественными причинами. Поэтому важным является понимание того, как дефекты микротрубочек влияют на их свойства и функции.

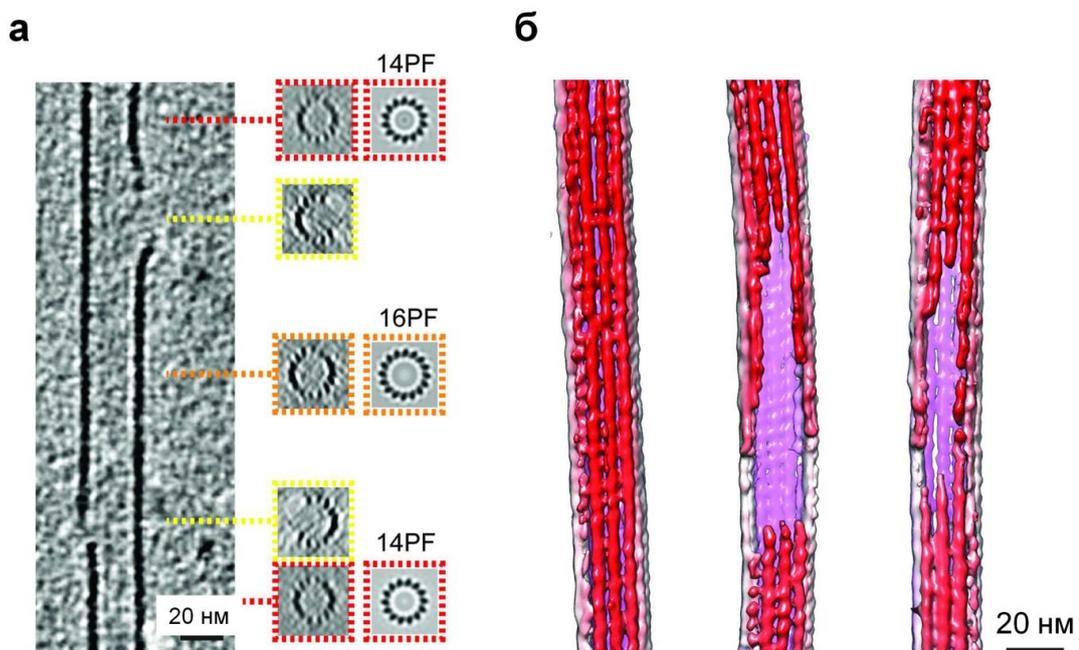


Рис. 3. Криоэлектронная томография микротрубочек, полимеризованных в присутствии GMPCPP, выявляет дефекты решетки. а) Продольный разрез с помощью трехмерной томографической реконструкции, на котором видны два различных дефекта решетки. Вставки — поперечные сечения, проходящие через одну микротрубочку, с указанием положения сечения относительно полимера и среднего значения их поворота, обозначенного цветом. На вставках показаны несоответствия количества протофиламентов в местах дефектов. б) Трехмерное изображение микротрубочек с окрашенной в красный цвет ближней поверхностью и более удалённой, окрашенной в розовый цвет; слева — микротрубочка без дефекта; в середине и справа — разные участки с дефектами решетки. [Atherton и др., 2018]

1.1.3. Динамика микротрубочек

В растворе бета мономер белка тубулина может взаимодействовать с ГТФ через так называемый Е-сайт. В полимеризованном виде ГТФ-азная активность белка тубулина резко возрастает и ГТФ может гидролизаться, находясь в Е-сайте [David-Pfeuty, Erickson, Pantaloni, 2006], Рис.4. Получившаяся в результате гидролиза молекула гуанозиндифосфата (ГДФ) остается связанной с бета мономером, пока тот находится в решетке микротрубочки. Во время

деполимеризации отсоединившийся от микротрубочки бета мономер может обменять в своем составе молекулу ГДФ на ГТФ и снова принять участие в полимеризации. Альфа мономер также присоединяет ГТФ (N-сайт), но в данном случае ГТФ не может гидролизаться и обмениваться на другой нуклеотид во время полимеризации микротрубочки [Spiegelman, Penningroth, Kirschner, 1977]. Конец микротрубочки, представленный бета мономерами, принято называть плюс-концом, а другой, представленный альфа мономерами — минус-концом. Плюс- и минус-концы микротрубочек обладают разной динамикой. Показано, что скорость полимеризации плюс-конца больше, а скорость деполимеризации меньше (по абсолютному значению), чем минус-конца. [Horio, Notani, 1986; Mitchiso.TJ, 1993; Walker и др., 1988]. В клетке минус-концы обычно закреплены в центрах организации микротрубочек, в то время как плюс-концы направлены к периферии клетки и способны за счет своей динамичности приводить к

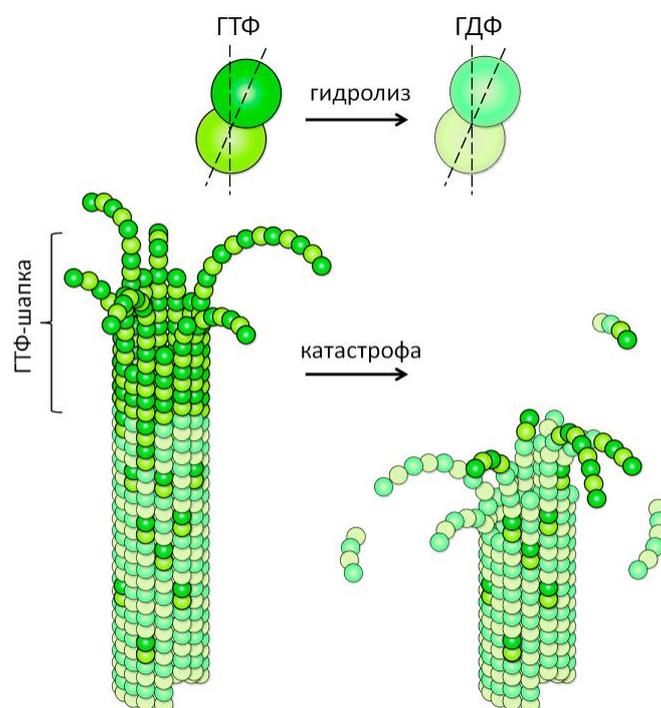


Рис. 4. Современные представления о ГТФ-шапке микротрубочки и её роли в механизме динамической нестабильности.

перестройке тубулинового цитоскелета в ответ на внутренние и внешние воздействия, осуществлять поиск и захват хромосом.

Современные представления о механизме динамической нестабильности микротрубочек основываются на термодинамически неравновесных процессах, в которые вовлечены преобразования энергии при гидролизе ГТФ. Считается, что гидролиз ГТФ влияет на механические свойства димера белка тубулина (за счет так называемого механо-химического сопряжения), которые обеспечивают его конформационные переключения. В растворе свободный димер белка тубулина находится в так называемой «изогнутой» конформации, которая должна переключиться на «прямую» при встраивании димера в решетку микротрубочки. Из-за гидролиза ГТФ нахождение белка тубулина в полимеризованном состоянии становится менее выгодным с термодинамической точки зрения [Gudimchuk и др.,]. Этот факт отражен на Рис. 4 в виде разных оттенков для димеров белка тубулина, связанных с ГТФ и ГДФ. Если концевой участок микротрубочек — ГТФ-шапка — нарушается за счет различных многостадийных факторов, среди которых гидролиз ГТФ играет ключевую роль, микротрубочка испытывает катастрофу (Рис. 4).

Механизм обратных переключений микротрубочек с разборки на сборку во время спасений изучен значительно хуже. Как и катастрофы, спасения наблюдаются *in vitro* и внутри клеток. Предполагается, что для их возникновения в произвольном месте решетки микротрубочки должны быть участки, способные замедлить разборку и обеспечить условия для возобновления сборки. Вместе с тем, сейчас становится все более очевидным, что решетка микротрубочек не является идеальной и статичной, она может иметь множество дефектов. В результате встраивания свободного ГТФ-тубулина из раствора дефекты могут частично или полностью устраняться, что сопровождается появлением так называемых ГТФ-островков. Таким образом, динамические процессы присоединения и отсоединения димеров белка тубулина могут происходить не только на плюс- и минус-концах микротрубочки, но и в её решетке. В рамках

данной теории о динамичной решетке предполагается, что механизм спасений может зависеть от внешних факторов, которые способны приводить к дефектам решетки микротрубочки [Dimitrov и др., 2008], [Schaedel и др., 2019], [Aumeier и др., 2016], [Forges de и др., 2016], [Schaedel и др., 2015], [Vemu и др., 2018]. В нескольких исследованиях по моделированию было изучено влияние ГТФ-островков на решетку микротрубочек, и авторы этих работ предполагают, что ГТФ-островки должны служить важным фактором, способствующим спасениям [Schaedel и др., 2019], [Bollinger и др., 2020], [Michaels и др., 2020], [Fees, Moore, 2019]. Однако остается неясным, играют ли ГТФ-островки основную роль в механизме спасений или спасения могут произойти без включения белка тубулина в решетку микротрубочки.

Вместе с тем, роль дефектов решетки микротрубочки в её динамике может не ограничиваться стабилизирующим эффектом ГТФ-островков. В работе [Hunyadi, Chrétien, János, 2005] произведены количественные оценки энергии деформации, появляющейся в результате приобретения конфигурации решетки микротрубочки, отличной от канонической (то есть 13-ти протофиламентной с заходностью спирали 3 мономера белка тубулина). В этом исследовании изучался вопрос, будет ли достаточно избыточной энергии, накопленной в этих конфигурациях, чтобы дестабилизировать ГТФ-шапку микротрубочки. Для этого авторы проанализировали криоэлектронные данные на предмет частотного распределения микротрубочек, собранных *in vitro* из очищенного белка тубулина, и смоделировали различные механические напряжения, которые могут быть накоплены в наблюдаемых типах решеток. В этом исследовании длина обрабатываемого участка микротрубочки, число протофиламентов N и размер димера $2a$ позволяют тривиально оценить общее количество гетеродимеров белка тубулина $n_{N,S}$ в данной конфигурации N_S (S – заходность спирали) при одинаковых условия окружающей среды. Авторы предположили, что относительная частота данного типа микротрубочек по отношению к основной решетке 13_3 не зависит от концентрации белка тубулина, хотя абсолютные

частоты могут изменяться в зависимости от этого параметра и, в частности, от скорости роста микротрубочек. На основе этого может быть записано соотношение, в котором энергетическое состояние решетки определяет среднюю частоту её встречаемости:

$$\frac{n_{N_S}}{n_{total}} \sim K_{N_S} \sim \exp\left(-\frac{G_{N_S}}{k_B T}\right) \quad (1.1.1)$$

где K_{N_S} — константа равновесия сборки/разборки микротрубочки, G_{N_S} — полное изменение свободной энергии гетеродимера при его встраивании в решетку N_S , k_B - постоянная Больцмана, а T — абсолютная температура. Ввиду того, что коэффициенты пропорциональности и энергии связей неизвестны, частоту встречаемости димеров можно соотнести с её значением для равновесной конфигурацией 13_3 и получить разность энергий связи в расчете на один димер белка тубулина:

$$-k_B T \ln\left(\frac{n_{N_S}}{n_{13_3}}\right) = G_{N_S} - G_{13_3} = \Delta G_{N_S} \quad (1.1.2)$$

Разница энергий в уравнении (1.1.2) должна быть связана с упругими деформациями равновесной решетки в предположении, что гетеродимеры и связи между ними идентичны в различных конфигурациях. В простейшем приближении предполагается, что силы линейно пропорциональны растяжениям или сжатиям. В этом приближении энергетические различия между различными структурами решетки должны быть вызваны деформациями сдвига, кручения и изгиба. Можно показать, что продольное сжатие, удлинение, кручение и сдвиг вдоль боковых контактов пропорциональны углу наклона θ (Рис. 1), поэтому упругая энергия в гармоническом приближении должна содержать член:

$$E_\theta = \frac{1}{2} \nu \theta^2 \quad (1.1.3)$$

где коэффициент ν имеет размерность энергии в расчете на один димер. Сжатие и растяжение также должны наблюдаться в поперечном направлении, в первую очередь, из-за неблагоприятных углов соединения в поперечном направлении,

когда диаметр микротрубочки R изменяется в зависимости от количества протофиламентов:

$$E_R = \frac{1}{2} \mu_R (R - R_{13_3})^2 \quad (1.1.4)$$

где μ_R имеет размерность энергии в расчете на длину в квадрате и на димер. Измененный (неоптимальный) подъем субъединицы r должен быть связан с увеличением энергии сдвига вдоль боковых поверхностей, что в простейшем приближении может быть учтено следующим образом:

$$E_r = \frac{1}{2} \mu_r (r - r_{13_3})^2 \quad (1.1.5)$$

где μ_r имеет размерность энергии в расчете на длину.

Покомпонентный анализ вкладов в общую энергию деформаций представлен на Рис. 5, где показаны корреляции между разностью свободной энергии ΔG и углом наклона θ , а также радиусом R для конфигураций с почти постоянным подъёмом субъединицы r (Рис. 5а). Авторы получили, что представление избыточной свободной энергии в виде комбинации упругих деформаций:

$$\Delta G' = E_\theta + E_R + E_r \quad (1.1.6)$$

даёт лучшее соответствие между экспериментальными (ΔG) и теоретическими ($\Delta G'$) оценками избыточной энергии. График корреляции между их значениями показан на Рис. 5б. Числовые значения установленных параметров составляют: $\nu = 2.5 \pm 0.25$, $\mu_R = 1.98 \pm 0.17$, $\mu_r = 281.3 \pm 34.6$. На этой основе авторы делают вывод, что трех параметров, по-видимому, достаточно, чтобы учесть большинство напряжений, накопленных в решетке микротрубочек при адаптации к различным конфигурациям N_S .

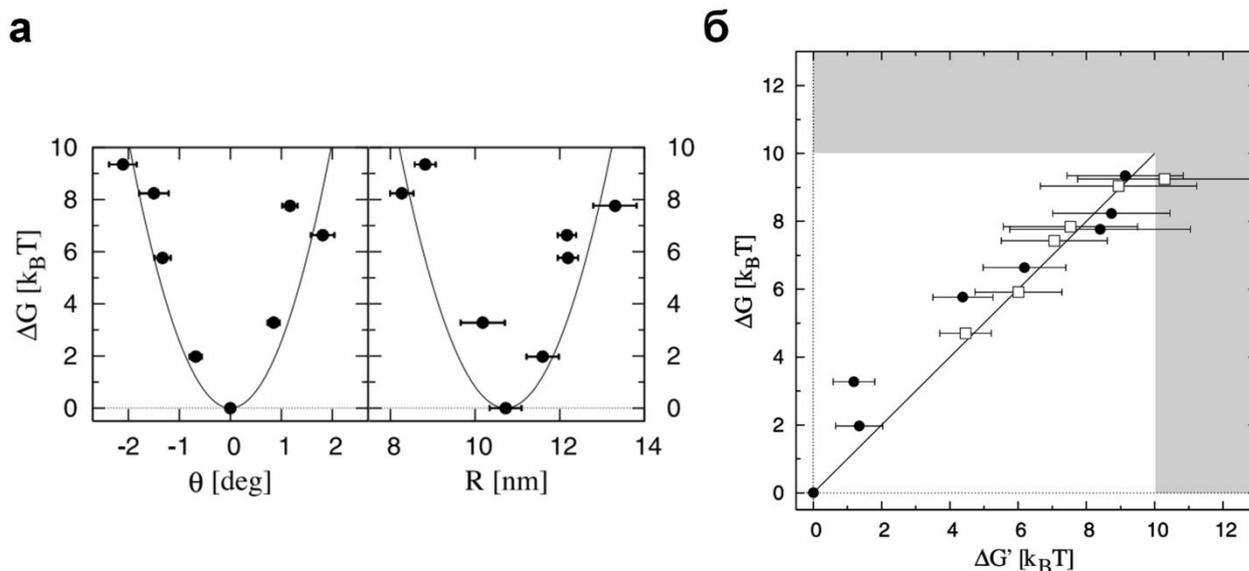


Рис. 5. а) Зависимость избыточной свободной энергии ΔG от угла наклона θ (слева) и эффективного радиуса R (справа) для восьми конфигураций решетки, для которых подъем субъединицы r является оптимальным. Непрерывные линии представляют собой квадратичные функции. б) Оценка разности свободной энергии ΔG по частотным данным (уравнение (1.1.2)) как функция прогнозируемой свободной энергии $\Delta G'$ (уравнение (1.1.6)) для известных типов решеток микротрубочек. Закрашенные круги и выколотые квадраты — конфигурации с оптимальным и неоптимальным подъемом субъединицы r , соответственно. [Hunyadi, Chrétien, Jánosi, 2005]

Таким образом, было обнаружено, что максимальная избыточная энергия, которую может накапливать решетка микротрубочек, составляет порядка 11 кТ в расчете на димер белка тубулина. Эта оценка по порядку величины совпадает с энергией гидролиза ГТФ в составе димера белка тубулина. Поэтому можно сделать вывод, что переключения микротрубочек в энергетически неблагоприятные конфигурации во время сборки и образование дефектов решетки способны влиять на её стабильность и определять её динамические свойства.

1.2. Регуляция динамики микротрубочек

1.2.1. Низкомолекулярные модуляторы

К настоящему моменту известно, что белок тубулин имеет, по крайней мере, 7 различных сайтов связывания с низкомолекулярными веществами (Рис. 6, показаны 6 сайтов). Такие вещества могут сильно влиять на полимеризацию белка тубулина и на параметры динамики всей микротрубочки. Иногда для этого достаточно нахождения в

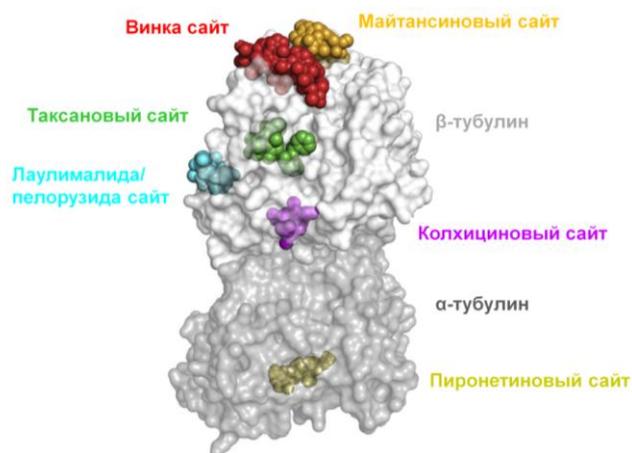


Рис. 6. Известные сайты связывания белка тубулина и низкомолекулярных ингибиторов динамики микротрубочек.

микротрубочке всего одной молекулы в составе димера белка тубулина [Doodhi и др., 2016]. Среди таких веществ многие встречаются в природе как токсичные соединения, которые вырабатываются большим количеством растений и животных — от водорослей до морских зайцев — предположительно, для самозащиты [Jordan, Wilson, 2004]. Известно, что все они подавляют динамику микротрубочек одним из двух способов: стабилизируют или дестабилизируют микротрубочки. Этим обуславливается их цитотоксическое действие, за счет чего они могут препятствовать пролиферации быстро делящихся раковых клеток [Dumontet, Jordan, 2010].

Стабилизаторы динамики микротрубочек, таксаны, и дестабилизаторы, алкалоиды барвинка, одобрены и успешно используются в качестве химиотерапевтических средств против рака уже в течение нескольких десятилетий [Noble, 1990], [Yang, Horwitz, 2017]. В субмикромольных концентрациях таксаны (например, паклитексел) подавляют катастрофы микротрубочек и увеличивают массу микротрубочек внутри клеток, в то время как алкалоид барвинка винбластин в основном подавляет скорость сборки и

разборки микротрубочек. В обоих случаях подавление динамики микротрубочек предотвращает переход делящихся раковых клеток из метафазы в анафазу, и клетки в конечном итоге погибают в результате апоптоза [Jordan, Wilson, 2004].

Несмотря на успешное применение ингибиторов динамики микротрубочек в терапии опухолей, механизмы действия большинства из них остаются изученными плохо. Например, известно, что паклитаксел не взаимодействует с растворённым белком тубулином, а его сайт связывания появляется, когда димеры белка тубулина находятся в полимеризованном состоянии [Alushin и др., 2014]. Однако неясно, как он проникает в просвет микротрубочки, чтобы связаться с ней. Предыдущие исследования показали, что его доступа через торцы микротрубочки недостаточно для объяснения наблюдаемой кинетики быстрого связывания *in vitro* [Díaz, Barasoain, Andreu, 2003]. В некоторых исследованиях также была выдвинута гипотеза, что паклитаксел и даже более крупные молекулы, такие как белки, могут проникать в просвет микротрубочек путем временного открытия боковых связей между димерами белка тубулина [Howes и др., 2014]. Важное недавнее исследование *in vitro* позволило непосредственно визуализировать закономерности связывания и кинетику взаимодействий между микротрубочками и флуоресцентными таксанами [Rai и др., 2020]. Авторы обнаружили, что флуоресцентные аналоги паклитаксела неоднородно декорируют решетку микротрубочек и демонстрируют сложную и, по-видимому, кооперативную кинетику присоединения-отсоединения. Включение флуоресцентных таксанов наблюдалось преимущественно в участках, которые возникали вблизи концов микротрубочек, рост которых был нарушен, и характеризовалось временем нахождения в решетке порядка нескольких минут. Одновременное присутствие в растворе винбластина или деполимеразы микротрубочек белка МСАК (англ. Mitotic Centromere Associated Kinesin) дополнительно нарушало рост микротрубочек, увеличивая количество видимых дефектов в решетке и облегчая связывание паклитаксела с ней.

Факторы, приводящие к нарушениям роста микротрубочек и неоднородностям включения паклитаксела в их решетку, в настоящее время остаются малоизученными. Это оправдывает поиск инструментов и способов анализа, с помощью которых можно лучше контролировать сборку микротрубочек и повреждение её решетки. Поэтому современные исследования в данной области демонстрируют, зачастую, неожиданные результаты. Так, в работе [Rai и др., 2021] использовались паклитаксел и его флуоресцентные аналоги для манипулирования количеством протофиламентов в микротрубочках и создания стабильных дефектов их решеток, которые можно визуализировать с помощью флуоресцентной микроскопии (Рис. 7).

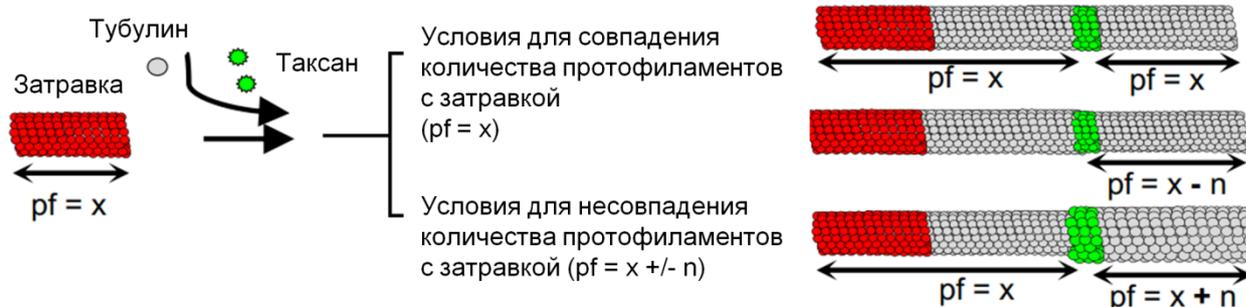


Рис. 7. Схема эксперимента по проверке эффектов дефектов решетки микротрубочек на её динамику в присутствии флуоресцентных аналогов паклитаксела. В присутствии разных таксанов возможно полимеризовать микротрубочки с разным числом протофиламентов, что используется на этапе создания коротких микротрубочек (затравок) для полимеризации от них решетки микротрубочки с таким же или изменённым числом протофиламентов, что сопровождается образованием дефекта [Rai и др., 2021].

Наличие таких стабильных дефектов как результат переключения структуры решетки подтверждается данными криоэлектронной микроскопии. Вместе с тем, с помощью флуоресцентной микроскопии авторы наблюдали места локализации флуоресцентных таксанов в решетке микротрубочек, что можно интерпретировать как места дефектов. В этих местах авторы наблюдали спасения микротрубочек в присутствии ГТФ-тубулина, которые могли происходить повторно. Кроме того, на расстояниях порядка нескольких микрометров от наблюдаемого дефекта регистрировались частые катастрофы микротрубочки. Это

говорит о том, что структурные дефекты решетки микротрубочки могут оказывать далекодействующее влияние на динамику её концов и обеспечивают регуляторную функцию таксанов.

К настоящему моменту идентифицированы вещества, которые связываются с пятью другими сайтами белка тубулина, помимо сайта таксанов и алкалоида барвинка [Steinmetz, Prota, 2018], [Matthew и др., 2021] [Mühlethaler и др., 2021]. Эти вещества ещё не прошли клинические испытания, однако в настоящее время ведутся значительные работы по их разработке. Основное внимание уделено колхициновому сайту, который расположен на границе раздела внутридимерных мономеров белка тубулина, с которым могут связываться относительно химически простые структуры, такие как давно известная молекула колхицина и различные другие лиганды (Рис. 6) [McLoughlin, O'Boyle, 2020].

Колхицин способен эффективно подавлять динамику микротрубочек в субмикромольных концентрациях, замедляя скорость роста. Считается, что молекулярный механизм такого действия основан на способности колхицина препятствовать конформационным изменениям димера белка тубулина, которые играют важную роль в динамике микротрубочек (Рис. 4). За счет того, что колхицин связывается с димером белка тубулина между альфа- и бета-мономерами, он способен препятствовать относительным движениям мономеров, блокируя тем самым конформационные изменения [Ravelli и др., 2004]. Эффективность этого механизма действия обеспечивается нахождением колхицина на концевых участках микротрубочки, то есть там, где димеры белка тубулина обладают «изогнутой» конформацией [Gudimchuk, McIntosh, 2021]. Потенциальные преимущества лигандов колхицинового сайта по сравнению с таксанами и алкалоидами барвинка могут включать в себя преодоление множественной лекарственной устойчивости, антиангиогенные эффекты и структурную простоту как таковую, что может обеспечить более осуществимые пути химического синтеза [Gracheva и др., 2020].

1.2.2. Модуляторы белковой природы

Внутри клетки микротрубочки находятся в окружении большого числа ассоциированных с ними белков. Эти модуляторы сами по себе демонстрируют очень широкий спектр эффектов на параметры динамической нестабильности. Механизмы действия многих из них, как и механизмы действия простых веществ-ингибиторов динамической нестабильности, изучены плохо. Ещё меньше изучены эффекты, к которым приводит совместное или даже синергетическое воздействие модуляторов белковой природы и низкомолекулярных ингибиторов динамики микротрубочек внутри клеток.

Среди белков-модуляторов можно выделить два основных семейства по их способности влиять на частоты катастроф и спасений микротрубочек. Белки семейства EB (от англ. End Binding) распознают растущие концы микротрубочек, содержащие ГТФ. Это, как считается, позволяет им прямо или косвенно модулировать частоту катастроф микротрубочек, а так же привлекать другие модуляторы [Akhmanova, Steinmetz, 2008]. Среди этих модуляторов белки, ассоциированные с цитоплазматическими линкерами, CLASP (англ. Cytoplasmic Linker Associated Proteins), связываются с концами микротрубочек с помощью EB-белков, а также способны автономно взаимодействовать с решеткой микротрубочек и их концами. Основной эффект CLASP белков на динамику микротрубочек заключается в уменьшении частоты катастроф и увеличении частоты спасений [Lawrence, Zanic, 2019].

В работе [Mohan и др., 2013] обнаружено, что совместное воздействие белков семейства EB и низкомолекулярных ингибиторов динамики микротрубочек может влиять на параметры динамической нестабильности синергично. Авторы использовали белок EB3, который сам по себе увеличивает частоту катастроф и скорость роста микротрубочек, в комбинации с различными низкомолекулярными стабилизаторами (например, паклитаксел) и

дестабилизаторами (например, винбластин или колхицин) динамики микротрубочек. Оказалось, что комбинация EB3 и паклитаксела увеличивает не только частоту спасений микротрубочек, но и частоту катастроф (Рис. 8).

Поэтому создание контролируемых условий, при которых изучается

динамика микротрубочек, оказывается особенно важным при исследовании эффектов комбинированного воздействия регуляторов динамики.

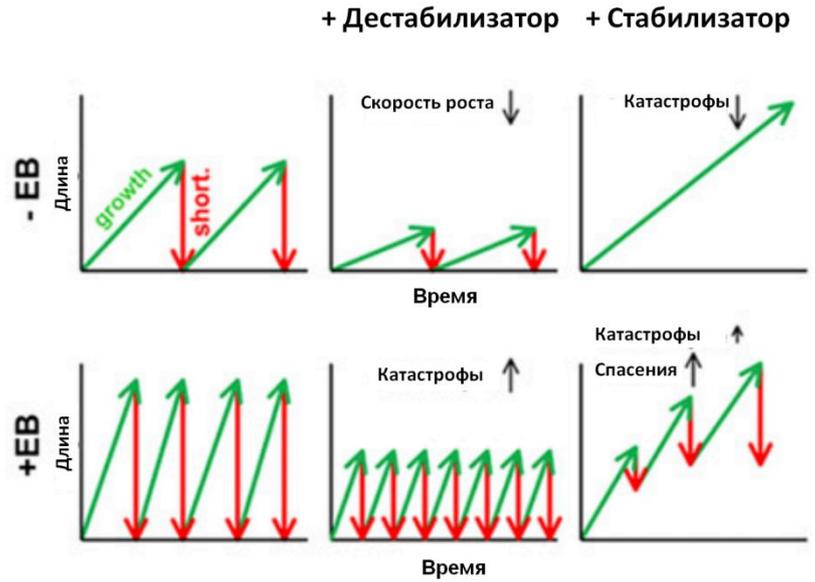


Рис. 8. Влияние низкомолекулярных ингибиторов динамики микротрубочек в отсутствие и в присутствии белка GFP-EB3 [Mohan и др., 2013].

1.3. Методики исследования микротрубочек *in vitro*

1.3.1. Классическая методика визуализации динамики микротрубочек *in vitro*

Большинство *in vitro* исследований динамики микротрубочек производится с помощью световой микроскопии и

экспериментальной методики, схема которой изображена на Рис. 9. Она включает прикрепление через

антитела к гидрофобной поверхности покровного стекла коротких стабилизированных микротрубочек (так называемые затравки, черного цвета на рисунке), полимеризованных предварительно, например, в присутствии медленногидролизуемого аналога ГТФ GMPCPP. Затем поверхность покровного стекла блокируется (обычно с использованием полимера Pluronic-F127 и высокой концентрации бычьего сывороточного альбумина и/или казеина), чтобы исключить неспецифическое налипание на него исследуемых молекул из раствора. В присутствии свободного белка тубулина и ГТФ затравки могут удлиняться. Визуализация динамики микротрубочек возможна с помощью различных методов контрастирования в микроскопии проходящего света или флуоресцентной микроскопии.

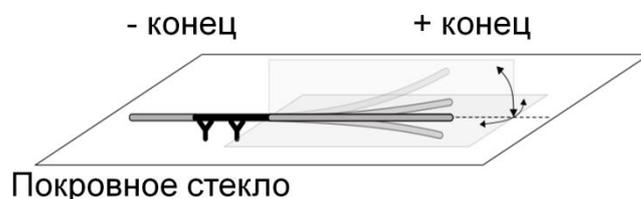


Рис. 9. Схема классической экспериментальной методики для исследования динамики микротрубочек *in vitro*.

Данная экспериментальная методика широко используется с незначительными модификациями способов закрепления затравок и методов блокирования поверхности покровного стекла. Ввиду своей распространённости, она стала в некотором смысле классической в области исследования динамики микротрубочек как таковых, а также её модулирования низкомолекулярными ингибиторами и белками. Применение проточных камер специальной конструкции [Volkov, Zaytsev, Grishchuk, 2014] позволяет обеспечивать смену

растворов, омывающих исследуемые микротрубочки, и изучать параметры динамической неустойчивости в максимально контролируемых условиях.

Тем не менее, классическая экспериментальная методика неизбежно подразумевает близость поверхности покровного стекла к динамической решетке микротрубочки. Несмотря на применяемые различные способы блокирования этой поверхности, нельзя полностью исключить взаимодействия с ней

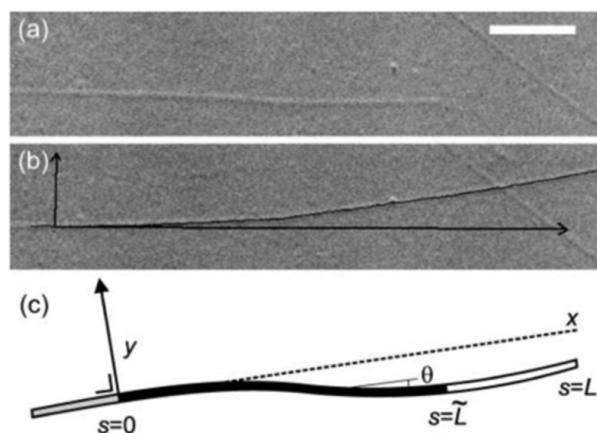


Рис. 10. Изучение термических флуктуаций микротрубочек с использованием классической экспериментальной методики [Janson, Dogterom, 2004].

молекул из раствора и самих отрастающих микротрубочек (Рис. 10). За счет специфического прикрепления затравок они, как и растущие от них микротрубочки, располагаются на некотором небольшом удалении от поверхности покровного стекла, которое можно оценить усредненными размерами молекул антител (или других молекул, используемых для иммобилизации затравок). Вместе с этим, большая жесткость микротрубочек обеспечивает их высокую устойчивость к внешним воздействиям и изгибающим моментам. Измеренные значения персистентной длины микротрубочек порядка нескольких миллиметров намного превышают типичные длины микротрубочек в *in vitro* экспериментах и внутри клеток [Janson, Dogterom, 2004]. Несмотря на это, в стационарных условиях без потоков раствора и при постоянной температуре основной причиной, способной приводить к взаимодействию между удлиняющимися микротрубочками и поверхностью покровного стекла, являются спонтанные изгибы микротрубочек за счет термических флуктуаций. Анализ параметров таких колебаний в плоскости покровного стекла с количественной оценкой проведены, например, в работе [Janson, Dogterom, 2004].

В ней рассматривается микротрубочка, которая закреплена с одного конца и не меняет своей общей длины (L) в течение времени наблюдения (Рис. 10). В результате теплового движения касательный угол $\theta(s)$ вдоль микротрубочки отклоняется от значения $\theta^0(s)$, которое описывает расслабленную форму микротрубочки, то есть прямую линию, за исключением возможной небольшой внутренней кривизны. Жесткость при изгибе κ ($\text{Н} \cdot \text{м}^2$) микротрубочки зависит от ее трехмерной персистентной длины, $L_p = \kappa/k_B T$, k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура. В общем случае угол $\theta(s)$ мал, поскольку ожидается, что L_p намного больше, чем L . Следовательно, $\theta \approx dy/ds$ и баланс между упругими восстанавливающими силами внутри микротрубочки и гидродинамическим сопротивлением, испытываемым движущейся микротрубочкой ([Wiggins и др., 1998]), можно записать в виде:

$$\kappa \frac{d^4 y}{ds^4} = -\gamma \frac{dy}{dt} \quad (1.3.1)$$

$\gamma \left[\frac{\text{кг}}{\text{м} \cdot \text{с}} \right]$ — коэффициент перпендикулярного сопротивления для микротрубочки.

Решения уравнения (1.3.1) имеют следующий вид:

$$y_n(s, t) = e^{-t/\tau_n} W_n \left(\frac{s}{L} \right), n = 1, 2, 3.. \quad (1.3.2)$$

Пространственная часть решения, $W_n(s/L)$, удовлетворяющая граничным условиям для закреплённого и свободного концов микротрубочки:

$$y(0) = 0, y'(0) = 0, y''(L) = 0, y'''(L) = 0 \quad (1.3.3)$$

имеет вид:

$$W_n(\alpha) = \frac{-\cosh q_n - \cos q_n}{\sin q_n + \sinh q_n} (\sin q_n \alpha - \sinh q_n \alpha) + \cos q_n \alpha - \cosh q_n \alpha \quad (1.3.4)$$

Здесь $\alpha = s/L$ и параметры q_n задаются последующими решениями уравнения:

$$\cos q_n \cosh q_n = -1 \quad (1.3.5)$$

Решениями уравнения (1.3.5) являются $q_1 = 1.875$, $q_2 = 4.695$, $q_3 = 7.855$ и $q_n \approx (n - 1/2)\pi$ для $n > 3$. Первые три собственные функции, $W_{n=1..3}$, показаны на Рис. 11.

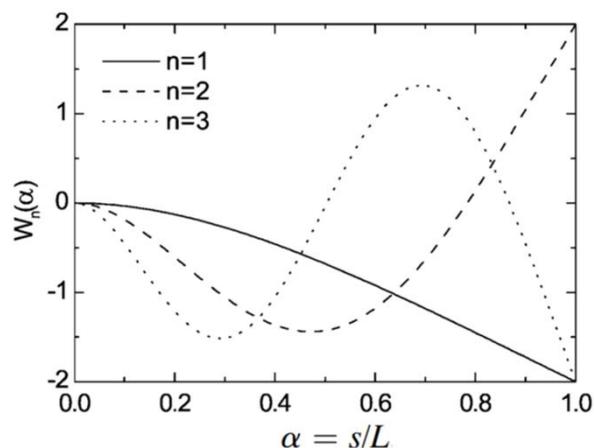


Рис. 11. Показаны первые три моды термических колебаний микротрубочки, закреплённой с одного конца [Janson, Dogterom, 2004].

1.3.2. Методы оптической микроскопии (DIC, TIRF)

Микротрубочки можно визуализировать множеством оптических методов, включая светлопольную, поляризационную, флуоресцентную и другие виды микроскопий. Среди них долгое время используются метод тёмного поля, дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия (англ. DIC), интерференционная микроскопия отраженного света (англ. IRM) и микроскопия полного внутреннего отражения (англ. TIRF). Помимо этого, новые методы световой микроскопии микротрубочек без использования флуоресцентных меток включают ROCS (от англ. Rotating Coherent-Scattering Microscopy) и iSCAT (от англ. Interferometric Scattering Microscopy), [Jünger, Olshausen, Rohrbach, 2016], [Ortega-Arroyo, Kukura, 2012]. Тем не менее, по соотношению доступности, совместимости, простоты реализации, качества получаемых изображений и целей исследования два метода, DIC и TIRF, занимают особое место и, в некоторой

степени, дополняют друг друга (Рис. 12). DIC микроскопия позволяет наблюдать микротрубочки без использования флуоресцентных меток, что является её главным преимуществом [Walker и др., 1988]. Этот вид микроскопии основан на детектировании интерференционной составляющей результирующего сигнала, получаемого после взаимодействия света с образцом.

Реализация метода DIC микроскопии включает использование двух линейно поляризованных в ортогональных направлениях лучей, опорного и вспомогательного, пространственно сдвинутых друг относительно друга на небольшое расстояние, обычно несколько меньшее, чем радиус диска Эйри. Для этого используются специальные призмы (Волластона, Номарского), которые, как показано на Рис. 12а, располагаются в оптической схеме после поляризатора и перед анализатором. Отсутствие необходимости использования флуоресцентных меток в DIC микроскопии позволяет делать съёмку микротрубочек на протяжении длительного времени (порядка нескольких часов).

Метод TIRF-микроскопии (Рис. 12б) позволяет изучать флуоресцентные образцы в тонком слое (порядка 200 нм) вблизи поверхности покровного стекла. Для возбуждения флуоресценции образца свет должен пройти через границу между покровным стеклом и образцом. Обычно показатель преломления образца или среды, в которой он находится, меньше показателя преломления стекла. В таком случае складываются условия для возникновения явления полного внутреннего отражения, приводящие к тому, что луч, падающий на стекло под углами большими, чем угол полного внутреннего отражения, не проходит в среду с образцом. Тем не менее, экспоненциально затухающее электромагнитное поле обнаруживается в среде с образцом, причем его частота такая же, как у падающей волны. Применительно к микротрубочкам это позволяет изучать их в присутствии свободного флуоресцентно меченного белка тубулина и других молекул вблизи поверхности покровного стекла с высоким контрастом из-за отсутствия фона от толщи раствора [Zwetsloot, Tut, Straube, 2018].

Оба метода хорошо совместимы друг с другом, могут использоваться вместе, в том числе, для изучения динамики микротрубочек. Однако TIRF микроскопия, как и любые другие методы на основе флуоресценции, требуют применения специальных белковых антиокислительных комплексов для уменьшения эффектов фоторазрушения образца. Тем не менее, именно TIRF микроскопия позволяет изучать не только динамику концов микротрубочки, но и процессы в самой её решетке. Для этого можно использовать флуоресцентно меченый белок тубулин, который способен встраиваться в места дефектов решетки микротрубочек (Рис. 12б). При этом сама решетка может не обладать флуоресцентными свойствами (при комбинации TIRF с DIC), или обладать другими параметрами флуоресценции.

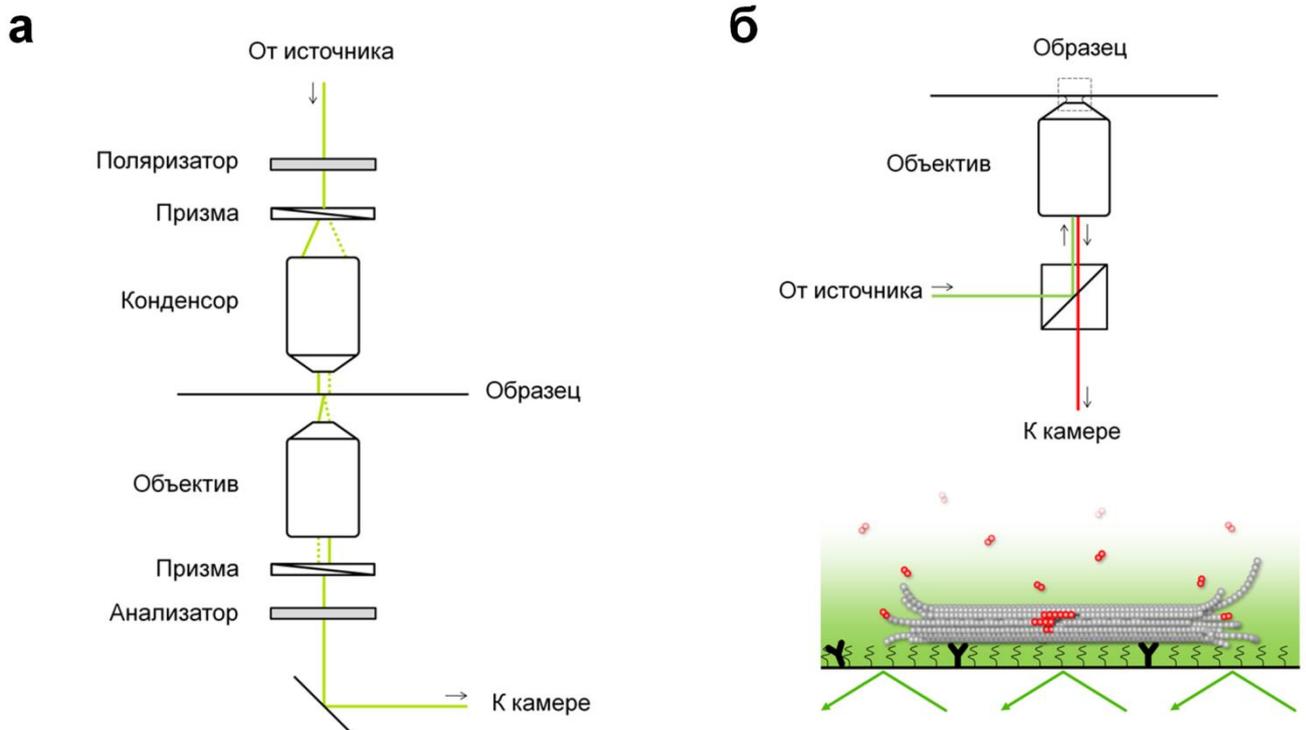


Рис. 12. а) Оптические схемы DIC, б) TIRF микроскопии.

1.4. Методики скрининга низкомолекулярных модуляторов микротрубочек

1.4.1. Поиск противоопухолевых препаратов на основе анализа профилей цитотоксичности

Один из наиболее значимых проектов по поиску новых противоопухолевых препаратов был запущен 34 года назад Национальным институтом рака США, NCI (англ. National Cancer Institute). Среди основных целей проекта, в том числе, «повторное открытие» «старых» веществ с ингибирующей рост раковых клеток активностью и/или цитотоксичностью в отношении определенных гистологических типов рака. В этом скрининге используются 60 линий опухолевых клеток человека, сгруппированных в 8 подгрупп заболеваний (немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак толстой кишки, почки, яичника, меланомы, рак головного мозга и лейкемия). Ежемесячно проводится скрининг примерно 1000 соединений, включающих синтетические и экстракты натуральных веществ [Boyd, Paull, Rubinstein, 1992]. Дифференциация на цитостатические и цитотоксические эффекты исследуемых веществ производится на основе измерения плотности или массы клеток оптическим способом. С этим связано одно из основных ограничений данного метода скрининга, заключающееся в его неспособности установить конкретный механизм действия вещества на клетки (при его наличии).

Тем не менее, компьютерный анализ этой базы данных с использованием алгоритма COMPARE позволяет выявлять некоторые закономерности [Paull и др., 1989]. Так называемое «пробное» соединение с известным механизмом действия может быть определено с помощью регистрационного номера соединения в NCI (номер NSC). Алгоритм COMPARE позволяет ранжировать всю базу данных в порядке сходства реакций 60 (или более) клеточных линий на соединения, содержащиеся в базе данных, с реакциями клеточных линий на «пробное» вещество. Сходство профиля реакций с «пробным» выражается количественно в виде коэффициента корреляции Пирсона. Интересно, что такие группы

соединений часто имеют очень похожие структуры и/или механизмы действия, например: ингибиторы полимеризации белка тубулина, алкилирующие агенты, ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы топоизомеразы II, РНК и ДНК-антиметаболиты и ДНК-антиметаболиты. Аналогичным образом, COMPARE анализ может помочь в идентификации веществ, которые дают профили клеточной реакции, отличные от профилей известных соединений. Постоянно растущее количество веществ, попадающих в базу данных NCI, является богатым источником потенциальных кандидатов противоопухолевых препаратов, в том числе, ингибиторов динамики микротрубочек. Результаты, полученные с помощью алгоритма COMPARE, указывают на то, что соединения, занимающие высокие позиции в этом рейтинге, могут обладать механизмом действия, аналогичным механизму действия исходного соединения. Так, например, были идентифицированы аналоги алкалоида барвинка и другие новые лиганды белка тубулина [Paull и др., 1992], [Vai и др., 1991].

1.4.2. Методы общего назначения для характеристики взаимодействия «белок-лиганд»

Для подтверждения взаимодействия изучаемого вещества с белком тубулином могут быть применены стандартные методы, такие как поверхностный плазмонный резонанс [Olaru и др., 2015], калориметрическое исследование [Weber, Saleme, 2003], микромасштабный термофорез (микротермофорез) [Jerabek-Willemsen и др., 2011], методы, на основе масс-спектрометрии [Deng, Sanyal, 2006].

В методе плазмонного резонанса распространяющиеся электромагнитные возбуждения на границе раздела металл-диэлектрик в виде колебаний плотности заряда очень чувствительны к изменениям показателя преломления измеряемой среды (диэлектрика). Это изменение модифицирует условия резонанса между поверхностными плазмонами и взаимодействующей оптической волной. Когда

происходит биомолекулярное взаимодействие на поверхности раздела (например, специфическое связывание анализируемых веществ), показатель преломления вблизи поверхности изменяется. Это изменение показателя преломления может быть обнаружено датчиком, и, тем самым, регистрируется сигнал взаимодействия между молекулами [Wijaya и др., 2011]. Калориметрические исследования основаны на детектировании изменений термодинамических параметров при взаимодействии молекул друг с другом, включающих энтальпийную и энтропийную составляющие свободной энергии [Weber, Salemmе, 2003]. Масс-спектрометрия, как один из наиболее универсальных методов детектирования взаимодействия между молекулами, основана исключительно на детектировании соотношения массы и заряда молекулы после проведения процедуры ионизации [Weber, Salemmе, 2003].

Универсальность данных методов сопровождается определенными недостатками, которые часто создают проблемы при практическом их использовании для скрининга лигандов белка тубулина. Калориметрические методы требуют довольно больших объемов высококонцентрированных образцов белков и лигандов, это дорого и не всегда достижимо на практике; поверхностный плазмонный резонанс требует разработки схем иммобилизации белков или лигандов, и его интерпретация может затрудняться артефактами поверхностной иммобилизации; анализы на основе масс-спектрометрии часто являются трудоемкими и требуют много времени.

Среди методов общего назначения метод микротермофореза можно считать одним из наиболее быстрых и экономичных, с простым протоколом пробоподготовки и анализа образцов. Экономичность метода микротермофореза основана на малом расходе пробы и низких концентрациях исследуемого белка-мишени, что удобно для проведения скрининга большого числа исследуемых лигандов. Будучи полностью оптическим методом, он сводит к минимуму загрязнение образца за счет различного рода контактов с ним. Вместе с тем, микротермофорез позволяет обнаружить какие-либо изменения в свойствах

поверхности частиц, влияющих на их термическую диффузию, с возможностью получения информации о различных физических параметрах молекул, которые влияют на этот процесс. Определение характеристик межмолекулярных взаимодействий в микротермофорезе основано на измерении изменения флуоресценции при локальном нагревании раствора, содержащего флуоресцентные белки-мишени или флуоресцентные исследуемые вещества-лиганды. Данный метод может быть основан на естественных флуоресцентных свойствах белков и исследуемых веществ или на применении флуоресцентного мечения молекул.

Однако метод микротермофореза, как правило, обладает относительно низкой чувствительностью в случаях, если лиганд и белок-мишень не имеют собственной выраженной флуоресценции. Тем не менее, использование флуоресцентных меток повышает чувствительность данного метода. Однако создание флуоресцентно-меченных лигандов является дорогостоящим и трудоемким процессом и на практике не масштабируется на большое количество лигандов. Кроме того, даже в случае успешного синтеза флуоресцентных модификаций лигандов, такого рода модификации способны сами по себе менять характер взаимодействия между молекулами. Внесение флуоресцентной метки для белка мишени в определенной степени повышает чувствительность измерений, однако чувствительность такого подхода все равно остается ограниченной, а результаты измерений зависят от типа, количества и положения меток. Даже в случае успешного детектирования связывания лиганда с белком-мишенью данным методом информация о месте связывания остаётся недоступной.

1.4.3. Методы специального назначения для характеристики взаимодействия «тубулин-лиганд»

Чаще всего такие методы основаны на флуоресцентном (или радиоактивном) мечении некоторого известного вещества (создание зонда), связывающегося с белком тубулином, которое затем может быть использовано в конкурентном анализе с другими исследуемыми лигандами. Процедура скрининга заключается в добавлении тестируемых нефлуоресцентных веществ к раствору, содержащему белок тубулин и флуоресцентный зонд. Параметры флуоресценции зондов сильно зависят от того, связаны ли они с белком тубулином или находятся в свободном состоянии. Например, зонд, связанный с мишенью, обладает гораздо большей анизотропией флуоресценции, чем свободный зонд. Поэтому с помощью детектора поляризованного излучения можно измерять снижение анизотропии флуоресценции зонда и делать вывод о связывании тестируемого вещества с определённым сайтом белка тубулина.

Например, сайт связывания паклитаксела образуется, когда белок тубулин находится в полимеризованном виде. В работе [Barasoain, Díaz, Andreu, 2010] представлена тест-система, основанная на использовании флуоресцентного аналога паклитексела как зонда и собранных микротрубочек как мишени. Флуоресцентные зонды Flutax-2 (7-O-[N-(2,7-дифтор-4'-флуоресцинкарбонил)-L-аланил]паклитаксел) или Flutax-1 (7-O-[N-(2,7-дифтор-4'-флуоресцинкарбонил)-L-аланил]паклитаксел) специфически связываются с микротрубочками. Мишени-микротрубочки, в свою очередь, собираются заранее *in vitro* и стабилизируются с помощью химического сшивания. Альтернативно измерению анизотропии флуоресценции, за счет наличия в составе микротрубочки множества сайтов связывания с паклитакселом, с помощью резонансного переноса энергии возможно детектировать вытеснение флуоресцентного зонда (донора или акцептора энергии) другим нефлуоресцентным лигандом. В случае конкуренции (донора или акцептора энергии) с изучаемым лигандом излучение акцептора, вызванное возбуждением донора и переносом от него энергии, подавляется.

Кроме того, возможно использование Flutax-1 для детектирования его вытеснения изучаемым лигандом из сайта паклитаксела за счет изменения его интенсивности флуоресценции.

Для детектирования взаимодействия аналогов алкалоида барвинка с неполимеризованным белком тубулином синтезированы флуоресцентно меченные аналоги винбластина, майтансина и эрибулина [Chatterjee и др., 2002], [Menchon и др., 2018], [Doodhi и др., 2016]. Методы детектирования взаимодействия белка тубулина с лигандами колхицинового сайта основываются на флуоресцентных аналогах колхицина, таких как: 2-метокси-5-(2,3,4-триметоксифенил)-2,4,6-циклогептатриен-1-он (МТС) или соединения [транс-1 - (2,5-диметоксифенил)-3- [4-(диметиламино)фенил]-2-метил-2-пропен 1-он] (MDL 27048) [Andreu и др.,], [Bane и др., 1984]. Детектирование связывания изучаемых соединений с колхициновым сайтом белка тубулина в основном осуществляется с помощью измерения интенсивности флуоресценции зонда.

Основанные на, преимущественно, измерении анизотропии флуоресценции соответствующего зонда, все перечисленные методы не позволяют судить о том, связывается ли исследуемый лиганд с другими сайтами белка тубулина или не связывается с ним вообще. Кроме того, вещество МТС, как и остальные флуоресцентные зонды определённых сайтов белка тубулина нельзя считать коммерчески легкодоступными.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Очистка белков и приготовление стабилизированных микротрубочек

2.1.1. Белок тубулин

Белок тубулин выделен из коровьего мозга в соответствии с протоколом, описанным в работе [Castoldi, Popov, 2003], включающим три цикла полимеризации и деполимеризации в буфере с большой ионной силой. Мечение белка тубулина активированными эфирами Alexa-488-SE (Invitrogen), тетраметилродамин-5-SE (TAMRA-5-SE, Lumiprobe) и дигосигенин-SE (Invitrogen) осуществлялось химической пришивкой по аминокетильным группам белка тубулина [Human и др., 1991]. Полученный белок делили на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C перед использованием.

2.1.2. Белки EB1 и CLASP

Выделение белка EB1-GFP проводилось м.н.с. лаборатории биофизики цитоскелета ЦТП ФХФ РАН, Бояхчан А.В.

EB1-GFP, меченный шестью гистидинами на С-конце, был получен, как описано ранее [Anisimov и др., 2023]. Экспрессия гена EB1-GFP-6His индуцирована при 18°C в течение ~ 22 ч, 0.8 мМ IPTG в клетках *E. coli Rosetta* (DE3). Бактериальные клетки осаждались и повторно ресуспендировались в лизирующем растворе на основе неионного детергента (B-PER, Thermo Scientific) с добавлением 0.5 мг/мл лизоцима, 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF, Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) и смеси «Полный коктейль ингибиторов протеаз» (Roche, Базель, Швейцария). Смесь выдерживали в течение 15 минут при комнатной температуре на качалке. Все последующие этапы проводили при температуре 4°C . К бактериальному раствору добавляли 10 мл

очищающего буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 300 мМ NaCl, 1 мМ β-меркаптоэтанола, 10% глицерина) с 10 мМ имидазола. Затем смесь центрифугировали при 17 000 g в течение 20 мин на настольной центрифуге (Eppendorf). После этого надосадочную жидкость смешивали с 4 мл агарозы Ni-NTA (Invitrogen) и инкубировали в течение 1 ч, а затем помещали в проточную колонку. Колонку промывали 20 мл очищающего буфера с добавлением дополнительного 30 мМ имидазола для удаления неспецифически связанных белков. Затем белок EB1-GFP элюировали на фракции объемом 1 мл путем промывки колонки 5 мл очищающего буфера с добавлением 200 мМ имидазола. Две пиковые фракции EB1-GFP объединяли и загружали в обессоливающую колонку PD-10 (Sigma Aldrich), предварительно промытую буфером BRB80 с 10%-ным содержанием глицерина. Полученный белковый раствор фильтровали через ультрафильтрационную установку с предельной молекулярной массой 200 кДа (Advantec USY-20) для удаления возможных агрегатов, делили на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C перед использованием.

Выделение белка GFP-L-TOG2-S проводилось с.т.н. лаборатории биофизики цитоскелета ЦТП ФХФ РАН, Коршуновой А.В.

Плазмида GFP-L-TOG2-S, описанная ранее [Aher и др., 2018], была подарена лабораторией Е. Грищук. Плазмиду трансформировали в клетки *E. coli* Arctic Express (DE3) (Agilent, Калифорния, США). Клоны выращивали в 2-кратном триптоновом бульоне с дрожжевым экстрактом (16 г/л бакто-триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, BD Difco, США; 5 г/л NaCl, SigmaAldrich, США). Экспрессию гена, кодирующего белок 6His-GFP-L-TOG2-S, проводили, как описано в [Luo и др., 2023]. Пеллеты клеток ресуспендировали и лизировали в реактиве B-PER с добавлением лизоцима (10 мкг/мл), 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF, Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) и «Полного коктейля ингибиторов протеазы» (Roche, Базель, Швейцария). После лизиса клеток добавляли два объема буфера для лизиса (50 мМ Tris, 400

мМ KCl, 10 мМ имидазола, 10% глицерина, 10 мМ β -меркаптоэтанола, 1 мМ PMSF и «Полный коктейль ингибиторов протеаз»). Неочищенный лизат центрифугировали при 22000 об/мин в течение 20 мин (Sigma Laborzentrifugen, Германия, ротор 12500-H). К супернатанту добавляли агарозу Ni-NTA, уравновешенную лизирующим буфером (Qiagen, Германия). После инкубации в течение 1 ч при температуре 4°C (orbital shaker, Biosan, Латвия) связанный с Ni-NTA-агарозой белок GFP-L-TOG2-S помещали в пластиковую колонку объемом 10 мл (Qiagen, Германия). Колонку промывали 20 объемами буфера для лизиса, содержащего 10 мМ имидазола, затем таким же объемом буфера для лизиса, содержащего 30 мМ имидазола, и, наконец, 10 объемами буфера для лизиса, содержащего 50 мМ имидазола. Затем белок элюировали лизирующим буфером, содержащим 300 мМ имидазола. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и загружали в обессоливающую колонну Sephadex G-25 в PD-10 (GE Healthcare, Иллинойс, США), уравновешенную обессоливающим буфером (25 мМ Tris, 400 мМ KCl, 10% глицерина и 10 мМ β -меркаптоэтанола). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и аликвотили, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C. Концентрацию белка, меченого GFP, в белковом растворе определяли путем измерения поглощения при длине волны 488 нм на спектрофотометре (Shimadzu, Япония).

2.1.3. Приготовление стабилизированных микроотрубочек

Стабилизированные затравки микроотрубочек получали путем смешивания 60 мкМ немеченого белка тубулина, 5 мкМ белка тубулина, меченого TAMRA-5-SE (1,6 молекулы красителя на димер белка тубулина) или Alexa-488 (1 молекула красителя на димер белка тубулина) и 16 мкМ белка тубулина, меченого дигоксигенином, с добавлением 1 мМ гуанилил-(α,β)-метилендифосфоната (GMPCPP, приобретен в Jenna Biosciences) или 1 мМ ГТФ и инкубирования смеси при температуре 36 °C в течение 20 минут. Неполимеризованную фракцию белка

тубулина затем отделяли центрифугированием при 25 000 g при 36 °C в течение 15 мин и выбрасывали. Стабилизированные затравки разводили в растворе BRB80 буфер (80 mM K-PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 6.8) с добавлением 0.1 mM GMPCPP или 10 мкМ паклитаксела и хранили при температуре 37 °C не более 3 дней.

2.2. Микроскопия микротрубочек

2.2.1 Подготовка покровных стёкол

Немодифицированные покровные стёкла готовились по протоколу из работы [Volkov, Zaytsev, Grishchuk, 2014]. Модифицированные покровные стекла (выполненные на заказ с.н.с. физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова В.В. Поповым) представляли собой несиланизированные покровные стёкла, на которые наносились периодические структуры в виде пьедесталов высотой 3 мкм, шириной 3 мкм и с расстоянием 20 мкм между ними с помощью фотолитографии. Для этого оптическая маска изготавливалась путем экспонирования на электронно-лучевом литографе ZBA-20 (Carl Zeiss Jena, Germany) стандартной фотошаблонной заготовки из стекла с маскирующим слоем хрома толщиной 100-120 нм и нанесенным слоем позитивного электронорезиста. После экспонирования и проявления резиста травление хрома проводилось в жидкостном травителе. Полученная таким образом маска использовалась в качестве фотошаблона при оптическом экспонировании образцов. Образцы рельефных структур изготавливались из резиста SU-8 3005 (Microsem Corp, USA), нанесенного с помощью спин-коатера на подложке из покровного стекла толщиной 180 мкм. Нанесение проводилось на скорости 4000 об/мин с дальнейшей сушкой на горячей плите при 95 °С в течение 5-10 мин. Толщина резиста подбиралась экспериментально путем разведения циклопентаном (SU-8 2000 Thinner, Microchem Corp.). Экспонирование осуществлялось на установке контактного экспонирования ЭМ-583 (СССР). После экспонирования производилось нагревание в течение 2-3 мин. на горячей плите при 95 °С. Затем осуществлялась проявка в метоксипропилацетате (1-Methoxy-2-propyl acetate) 20-30 сек и споласкивание в изопропанолe с дополнительной сушкой при 100 °С 10 мин.

2.2.2 Приготовление проточной камеры

Во всех экспериментах проточная камера готовилась с использованием покровного стекла (немодифицированного или модифицированного) путем его приклеивания через два слоя двустороннего скотча к базе с последующей герметизацией по методу в статье [Volkov, Zaytsev, Grishchuk, 2014].

2.2.3. Наблюдение динамики микротрубочек

Наблюдения за динамикой микротрубочек в анализах с использованием обычных силанизированных покровных стекол или покровных стекол с нанесённым на них микрорельефом проводились в соответствии с протоколами, описанными в работе [Volkov, Zaytsev, Grishchuk, 2014], с дополнительными оптимизациями. Проточная камера устанавливалась на микроскоп Nikon Eclipse Ti, оснащенный камерой Andor iXon3 EMCCD и объективом 1.49NA TIRF 100x. Заданная температура в 32°C поддерживалась постоянной с помощью нагревательного кольца (Bioptechs). Антитела к дигоксигенину (Roche Applied Science, 11093274910), разведенные в десять раз в BRB-80 буфере (80 mM K-PIPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH = 6.8), добавлялись в проточную камеру с помощью шприцевого насоса и инкубировались в течение 15 минут. Затем камеру промывали буфером BRB-80 и добавляли 1%-ный раствор Pluronic F-127 с последующей инкубацией в течение 7 минут, чтобы блокировать неспецифические взаимодействия с покровным стеклом. После этого камеру снова промывали буфером BRB-80, а затем для иммобилизации затравок микротрубочек на поверхности покровного стекла добавляли раствор, содержащий стабилизированные затравки GMPCPP-тубулина, меченные дигоксигенином. После достижения желаемой плотности затравок на стекле проточную камеру промывали буфером для визуализации со скоростью потока 150 мкл/мин с целью удаления из камеры незакрепленных затравок. Буфер для визуализации (буфер BRB-80, дополненный 1 mM GTP, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA,

5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0.08 мг/мл каталазы, 0.1 мг/мл глюкозы оксидазы, 12 мг/мл глюкозы, 1 мМ дитиотриэтола, 0.5 % β -меркаптоэтанола) центрифугировали в течение 15 мин при 25 000 g при 4°C перед внесением в камеру. Затем в камеру вводили раствор 17 мкМ немеченого белка тубулина, разведённого в буфере для визуализации, и наблюдали динамику микротрубочек с помощью DIC-микроскопии.

С использованием моторизованного XY-столика выбирались 9-15 полей зрения, которые затем фотографировались циклически в течение 30 минут с интервалом в 10-15 секунд и экспозицией в 100 миллисекунд. При анализе с использованием модифицированных покровных стёкол экспериментальная процедура была такой же, за исключением использования дополнительного 1.5-кратного увеличения для улучшения качества визуализации микротрубочек.

В экспериментах по изучению модуляции динамики микротрубочек низкомолекулярными веществами и ассоциированными белками использовался протокол, описанный выше, с той лишь разницей, что в раствор белка тубулина в буфере для визуализации добавлялись исследуемые модуляторы. Низкомолекулярные вещества-ингибиторы динамики микротрубочек хранились в виде концентрированных растворов в ДМСО при -20 °C как отдельные аликвоты, каждая из которых размораживалась непосредственно перед экспериментом.

2.2.4. Наблюдение встраивания ГТФ-тубулина в решетку микротрубочек

Эксперименты проводились с использованием проточных камер, собранных, как описано выше. Меченные Alexa-488 (1 краситель на 10 димеров белка тубулина) GMPCPP-затравки были подготовлены и иммобилизованы с использованием тех же протоколов. Предварительно выбирались 70-80 полей зрения и получали изображения с помощью DIC-микроскопии. Затем в камеру на 7-8 минут добавляли раствор немеченого белка тубулина в концентрации 17 мкМ

в буфере для визуализации. Затем раствор, содержащий 10 мкМ белка тубулина Alexa-488 (1 молекула красителя на 3 димера белка тубулина) в том же буфере с 2 мМ GMPCPP вместо ГТФ вводили в камеру на 5-6 минут для образования стабилизирующих GMPCPP концевых участков микротрубочек. После этого проточную камеру промывали буфером для визуализации. Затем в проточную камеру вводили раствор белка тубулина, меченного TAMRA, в концентрации 17 мкМ (1 молекула красителя на 1 димер белка тубулина) в буфере для визуализации с ГТФ, после чего проводили инкубацию в течение 18-20 минут, чтобы обеспечить включение свободных ГТФ-тубулинов в состав микротрубочек. Затем проточную камеру снова промывали с помощью буфера для визуализации. Добавление раствора меченого белка тубулина (Alexa-488, TAMRA), а также промывки буфером для визуализации в этом эксперименте на всех этапах производились со скоростью 10 мкл/мин, чтобы обеспечить минимальную деформацию полимеризованных микротрубочек потоком. Поля зрения, предварительно выбранные в начале эксперимента, последовательно и циклически снимались в канале DIC для контроля всего процесса, а на заключительном этапе эксперимента все поля снимались в DIC и двух флуоресцентных каналах: зеленом (Alexa-488) и красном (TAMRA). Зеленый канал использовался во время анализа для определения границ решетки микротрубочек. Канал DIC использовался для проверки того, что помеченные Alexa488 GMPCPP-затравки и GMPCPP концевые участки микротрубочек были правильно интерпретированы во время анализа как части одной и той же микротрубочки. Красный канал использовался для визуализации включения ГТФ-тубулина в решетку микротрубочек. В экспериментах на поверхности модифицированных покровных стекол процедура была та же, за исключением получения дополнительных изображений вдоль по вертикали выше и ниже положения фокуса (± 0.3 мкм), чтобы повысить чувствительность эксперимента и для компенсации колебаний концов микротрубочек в этом направлении.

2.2.5. Предварительная обработка данных для устранения засветки на краях микропьедесталов

Необработанные изображения микротрубочек в случае использования модифицированных покровных стёкол имеют сильную засветку по краям микропьедесталов в каналах DIC и флуоресценции, что затрудняет четкую визуализацию микротрубочек. Сильная засветка в случае DIC связана с тем, что на краю микроструктуры высота резко меняется на 3 мкм в плоскости XY, а сигнал DIC, в свою очередь, определяется производной оптической плотности по направлению в той же плоскости. В каналах флуоресценции засветка связана с тем, что фоторезист SU-8 сам по себе обладает флуоресцентными свойствами. В рамках данной работы был разработан специальный автоматический алгоритм для выравнивания контраста вокруг микропьедесталов в виде набора макросов в программе ImageJ. Процедура начинается с коррекции затенения, за которой следует небольшой поворот каждого поля зрения в стеке, чтобы строго сориентировать края микропьедесталов вертикально (Рис. 13, шаг I). Затем, в случае DIC, копируется каждый стек, одна из копий сдвигается на 3 пикселя по вертикали (вдоль микропьедесталов); другая копия не подвергается дополнительным преобразованиям. Затем сдвинутая копия стека кадр за кадром вычитается из ее нетрансформированной копии (Рис. 13, шаг II). В случае флуоресценции для каждого кадра в одном стеке усредняются значения интенсивности всех пикселей в вертикальном направлении (вдоль микропьедесталов) для получения единого профиля интенсивности по всей видимой длине микропьедесталов. Затем это усредненное значение профиля интенсивности вычитается из каждой горизонтальной линии пикселей в соответствующем кадре. На последнем шаге копия каждого кадра подвергается размытию по Гауссу (сигма = 2) и вычитается из неотфильтрованной копии (Рис. 13, шаг III) для коррекции затенения.

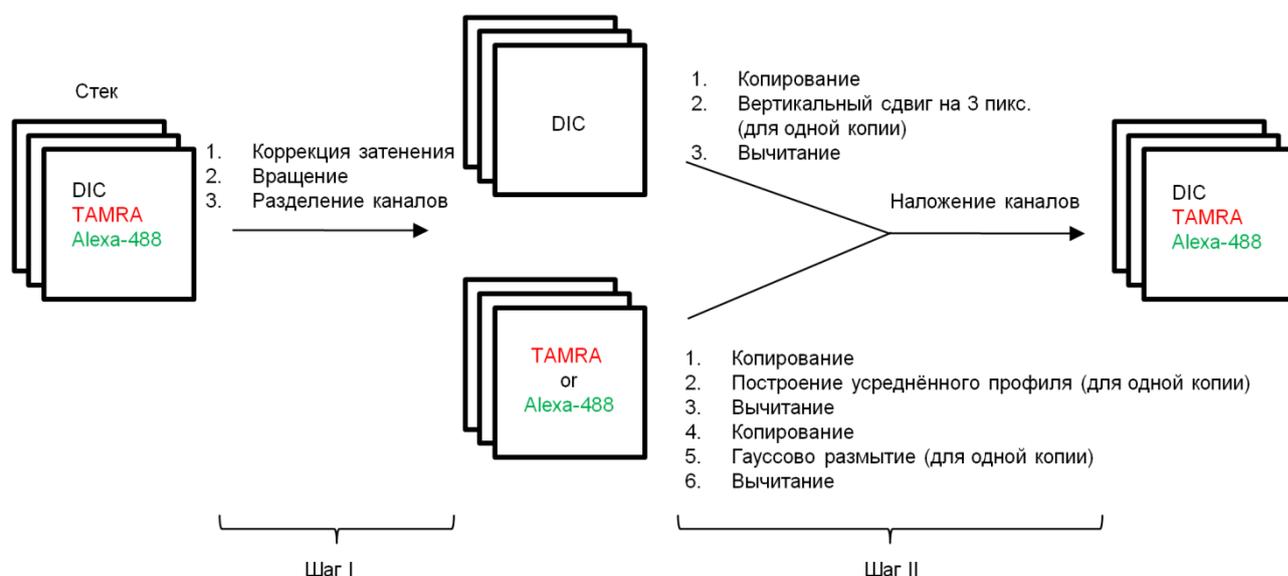


Рис. 13. Алгоритм коррекции засветки на краях микропьедасталов для каналов DIC, красного (TAMRA) и зелёного (Alexa-488).

2.2.6. Анализ динамики микротрубочек и включения ГТФ-тубулина в структуру микротрубочек *in vitro*

Предварительно обработанные стеки снимков дополнительно анализировались с помощью программы ImageJ для количественной оценки динамики микротрубочек или включения ГТФ-тубулина в решетку микротрубочек. Сначала, используя DIC-канал, отбирались микротрубочки, которые не пересекались друг с другом и с другими препятствиями. Среди этих микротрубочек отбирались для дальнейшего анализа те, которые не проявляли каких-либо признаков неспецифического прилипания к покровному стеклу, о чем можно было судить по наличию флуктуаций микротрубочек в плоскости изображения или вертикальном направлении. В случае, когда в течение всего эксперимента в проточную камеру вводилось несколько растворов, отдельное внимание было уделено тому, чтобы избежать анализа микротрубочек, которые подверглись значительному изгибу потоком. Также не обрабатывались те микротрубочки, которые, по-видимому, контактировали (более 3 кадров подряд) с

любыми фрагментами микротрубочек, спонтанно образовавшимися в момент нахождения GMPCPP в растворе.

Чтобы количественно оценить динамику микротрубочек в канале D1C, использовался пользовательский скрипт, написанный на языке Java, для построения кимограмм каждой микротрубочки, соответствующей вышеуказанным критериям. Кимограммы использовались для определения параметров динамической нестабильности микротрубочек: скорости сборки/разборки, положения и частоты спасений, длины микротрубочек и частоты катастроф (параграфы 3.1.1., 3.1.2.). Плюс-концы микротрубочек определялись по их большей скорости роста по сравнению с минус-концами. Для каждой кимограммы обрабатывались только те циклы сборки и разборки, которые можно было однозначно интерпретировать, а время наблюдения было соответствующим образом скорректировано. Скорость роста (или разборки) микротрубочек определялась по соответствующему наклону кимограммы для каждого четко видимого цикла сборки-разборки. Спасения и катастрофы были определены как переходы в динамике микротрубочек, за которыми следовало удлинение или укорочение, по меньшей мере, на 0.5 мкм (3-4 пикселя, в зависимости от увеличения), соответственно. Количественная оценка спасений, которые происходили в пределах 0.5 мкм от затравок, не проводилась. Тем не менее, надо отметить, что устранение таких событий не было причиной неэкспоненциального распределения спасений, поскольку пик спасений оказался расположен значительно дальше, чем 3-4 пикселях от затравки. Частота спасений определялась как отношение общего числа спасений к общему времени наблюдаемой деполимеризации. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Prism GraphPad 8.

Анализ повторных спасений был выполнен с помощью пользовательского скрипта Matlab. Два спасения были определены как «повторяющиеся», когда они располагались на расстоянии не более 0.5 мкм (т.е. 3-4 пикселя, в зависимости от

увеличения) друг от друга и между этими двумя спасениями не было случаев деполимеризации микротрубочек за пределы этой области.

Количественная оценка включения ГТФ-тубулина в решетку микротрубочки была проведена с использованием набора пользовательских скриптов в Matlab. Вектор, определяющий положение микротрубочки, был задан вручную на изображении из зеленого флуоресцентного канала (для анализа на микропъедесталах использовалась максимальная проекция z-стека, содержащего изображения затравок и стабилизирующих концевых GMPCPP-участков микротрубочек, меченных Alexa-488). Этот вектор был получен вручную выделением положения затравки микротрубочки и GMPCPP-участка, оба помеченных Alexa-488. Профиль интенсивности по одной линии, проходящие вдоль этого вектора в красном канале (для детекции сигнала тетраметилродамина, TAMRA), был нанесен на график в каждой из трех плоскостей z-стека и сглажен с помощью функции `imgaussfilt` (сигма = 2 для анализа на микропъедесталах и сигма = 1.5 для анализа на обычном покровном стекле). Затем пиковая интенсивность аппроксимировалась кривой Гаусса, а её высота и ширина на полувысоте указывались как характеристики включенных островков ГТФ-тубулина, меченного TAMRA. Профиль интенсивности в красном канале TAMRA считался ГТФ-тубулиновым островком, если его высота превышала 3 стандартных отклонения шума изображения и его ширина составляли не менее 0.5 мкм.

2.3. Низкомолекулярные ингибиторы динамики микротрубочек

2.3.1. Поиск потенциальных лигандов белка тубулина в базе данных NCI

Эта часть работы проводилась с.н.с. ФИЦ ХФ РАН имени Н.Н.Семенова, Романовым А.Н.

Поиск осуществлялся с помощью автономной реализации ранее разработанного алгоритма COMPARE [Paull и др., 1992]. Профили противоопухолевой активности определялись как относительные показатели цитотоксичности лекарственных средств в отношении более чем 60 клеточных линий рака. В топ-200 соединений, профиль противоопухолевой активности которых наилучшим образом коррелирует с колхицином, вошли соединения с коэффициентом корреляции Пирсона в диапазоне от 0.927 до 0.612. Из этих 200 соединений 106 оказались близкими структурными аналогами хорошо известных лигандов колхицинового сайта, колхицина и подофиллотоксина. Из оставшихся 94 соединений 70 оказались известными ингибиторами полимеризации белка тубулина, связывающимися с колхициновым сайтом или альтернативными сайтами. Механизм действия остальных 24 структур охарактеризован недостаточно. Среди этих соединений хорошо известный лазерный краситель кумарин-30 (70-е место в списке 200 лучших) сочетает высокий коэффициент корреляции Пирсона ($r = 0.723$), высокий средний логарифм $GI_{50} = 6.375$ и хорошо охарактеризованные флуоресцентные свойства.

Метод спектральной кластеризации использовался в качестве дополнительного вычислительного инструмента для проверки того, что кумарин-30 может быть новым ингибитором полимеризации белка тубулина. Спектральная кластеризация основана на вычислении и диагонализации матрицы, состоящей из коэффициентов корреляции между векторами профилей активности для набора веществ с известными и различными механизмами противоопухолевого действия. Чтобы убедиться, что этот подход позволяет точно сгруппировать соединения библиотеки NCI в соответствии с их механизмом действия, он был применен к

эталонному набору из 127 хорошо аннотированных противоопухолевых средств из базы данных NCI. Результат кластеризации подтвердил, что алгоритм может правильно поместить каждое из аннотированных соединений в один из шести кластеров по их известному способу действия: (i) ингибиторы полимеризации белка тубулина, (ii) алкилирующие агенты, (iii) ингибиторы топоизомеразы I, (iv) ингибиторы топоизомеразы II, (v) РНК и ДНК антиметаболиты и (vi) антиметаболиты ДНК.

Спектральная кластеризация была применена для независимого изучения механизмов действия соединений, идентифицированных путем корреляции с колхицином. С этой целью каждое из 200 лучших соединений, коррелирующих с колхицином, было последовательно объединено со списком из 127 аннотированных лекарственных средств базы данных NCI и сгруппировано с ними так, что оно либо попадало в одну из шести групп с установленным механизмом действия, либо попадало в седьмую группу с альтернативным механизмом противоопухолевой активности. 97% соединений, идентифицированных путем корреляции с колхицином, были отнесены к группе «ингибиторов полимеризации белка тубулина». Таким образом, метод спектральной кластеризации подтвердил результаты сравнительного поиска, а также отфильтровал некоторые потенциально ложноположительные результаты, предоставив набор из 18 прогнозируемых новых ингибиторов полимеризации тубулина, включая кумарин-30.

2.3.2. Получение веществ для скрининга

Кумарин-30 (ChemDiv Inc), нокодазол (Sigma-Aldrich Inc), колхицин (Sigma-Aldrich Inc), винбластин (Sigma-Aldrich Inc), пиронетин (Apollo Scientific), ансамитоцин P3 (MedKoo Biosciences Inc), ELR510444 (MedKoo Biosciences) растворяли в ДМСО в концентрации 10 мМ. Соединения cc-1 – cc-3, gc-1, gc-2 получены из библиотеки NCI. Соединения 1a-p, 2a-d, 3a-c, cc-4 и его аналоги 4a-e

синтезированы и очищены (>95 % степень чистоты, подтверждённая ЯМР) в группе в.н.с. химического факультета МГУ, Ольги Александровны Ивановой. Вещества хранились в виде концентрированных растворов в ДМСО при -20 °С как отдельные аликвоты, каждая из которых размораживалась непосредственно перед экспериментом. ГДФ (Sigma-Aldrich) был разведен в MilliQ до концентрации 100 мМ, разаликвочен и хранился при -20 °С.

2.3.3. Изучение эффектов веществ на динамику микротрубочек *in vitro*

Для изучения эффектов новых лигандов белка тубулина на динамику микротрубочек использовался протокол, описанный в параграфе 2.2.3, включающий добавление изучаемых веществ в раствор белка тубулина в буфере для визуализации в указанных концентрациях. Смена растворов изучаемых лигандов в проточной камере происходила с помощью промывания буфером BRB-80 и буфером для визуализации. В случае проверки эффектов от более чем одного лиганда схема эксперимента включала использование двух контрольных условий (с 1 % ДМСО) в начале и в конце эксперимента с целью удостовериться в том, что за время эксперимента динамика микротрубочек не меняет своих свойств.

2.3.4. Изучение эффектов веществ на раковые клетки

Эта часть работы проводилась в лаборатории проф. И.А. Воробьёва (Назарбаев Университет, г. Астана, Казахстан). Обработка экспериментальных данных частично выполнена автором.

Культура клеток. Три клеточные линии (HeLa, A549 и MCF-7) были выведены в соответствии с рекомендациями ATCC в DMEM (Thermo Fisher, кат. # # 11965092) или DMEM/F-12 (Термо-Фишер Кат. # 21331020) с добавлением 10%

FBS (Thermo Fisher, кат. № 10100147), с добавлением 5 мМ L-глутамин (Sigma, кат. № G7513) и антибиотиков пенициллин-стрептомицин (Sigma-Aldrich, кат. № P4333). Для анализа накопление клеток в митозе, как описано ранее [Kato, Haskins, 2023], клетки помещали в 24-луночный планшет и через 24-48 часов добавляли изучаемые вещества в различных концентрациях с последующей инкубацией 12-24 часов. После инкубации клетки фиксировали 4%-ным раствором формалина в буфере PBS и окрашивали Hoechst 33342 или гематоксилином. Митотический индекс рассчитывался на нескольких полях зрения по данным микроскопии для, по меньшей мере, 300 клеток.

Микроскопия живых клеток и проточная цитометрия для количественной оценки прогрессирования клеточного цикла. Микроскопия и анализ с помощью проточной цитометрии проводились с использованием ранее разработанных протоколов с небольшими изменениями [Suleimenov и др.,]. Клетки высевали в 24-луночные планшеты для культивирования клеток, затем через 24-48 ч. культуральную среду заменяли на среду, не зависящую от CO₂ (ThermoFisher, кат. № 18045088) с 10% FBS и 5 мМ L-глутамин (Sigma, кат. № G7513), добавляли изучаемые лиганды белка тубулина, и клетки далее инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C в нагревательной камере инкубатора, установленного на микроскопе Zeiss Cell Observer (Carl Zeiss GmbH). Для контрольных клеток вместо ингибиторов добавляли эквивалентное количество ДМСО. Во время инкубации с помощью камеры ORCAFlash4.0 V2 (Hamamatsu Photonics, Хамамацу, Япония) и объектива Plan-Apochromat 20×/0.4 с программным обеспечением ZEN были получены изображения фазово-контрастной микроскопии в четырех полях зрения на лунку культурального планшета. Продолжительность записи составила 48 часов с 10-минутным интервалом между кадрами. Покадровые серии были проанализированы с помощью программного обеспечения FiJi. Истории жизни отдельных клеток были собраны и проанализированы, как описано в [Suleimenov и др.,].

Анализ клеточного цикла. Клетки высевали в 6-луночные планшеты. После 24-часового выращивания добавляли изучаемые вещества и далее инкубировали клетки в течение 48 часов. В контрольные лунки добавляли ДМСО в соответствующих концентрациях. После инкубации плавающие и прилипшие клетки собирали и концентрировали центрифугированием. Затем осадок клеток фиксировали 70%-ным этанолом, охлаждённым на льду, дважды промывали в PBS, окрашивали 30 мкг/мл йодида пропидия (PI) и измеряли содержание ДНК с помощью проточного цитометра Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) при длине волны 488 нм (Ex./Em. 550-630 нм). Полученные результаты были проанализированы с помощью программного обеспечения FlowJo (BD, Ashland, OR). Все измерения проводились, по крайней мере, в трех повторах. В каждой пробирке было проанализировано более 30 000 событий.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток для визуализации воздействия лигандов белка тубулина на цитоскелет микротрубочек. Для прямой визуализации микротрубочек в культивируемых раковых клетках клетки A549, помещенные на покровные стекла, инкубировали в течение 24 часов в присутствии ингибиторов динамики микротрубочек или эквивалентной концентрации ДМСО в качестве отрицательного контроля, фиксировали путем добавления 2.5% глutarового альдегида в питательную среду и инкубировали в течение 10 минут. После фиксации образцы инкубировали в буфере PBS-Triton (1.0%) в течение 60 минут, затем 10 мин в 1.0% растворе NaBH_4 и затем 60 мин в окрашивающем буфере (PBS с добавлением 1% Tween-20 и 10 мг/мл BSA). Затем образцы дважды промывали PBS, инкубировали в течение 3 ч в окрашивающем буфере, содержащем 1 мкг/мл антител Alexa Fluor® 594 против альфа-тубулина (Abcam, кат. № ab202272), промывали 3 раза окрашивающим буфером, инкубировали в течение 20 минут в окрашивающем буфере с добавлением с 0.7 мкг/мл Hoechst и снова промыли 3 раза окрашивающим буфером. В конце образцы помещались в Fluoromount™ водную среду. Изображения образцов были получены в DAPI и родаминовом флуоресцентных каналах с помощью

микроскопа LSM 780 Zeiss Axio observer с объективом EC Plan-Neofluar 100x/1.3 в программном обеспечении ZEN. Изображения клеток обрабатывались с использованием программного обеспечения Fiji.

Расчет полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}). Значения IC_{50} были рассчитаны на основе их влияния на накопление клеток A549 в митозе. Для этого данные проточной цитометрии были обработаны для определения процентного содержания митотических клеток в зависимости от концентрации изучаемых ингибиторов. Из-за резкой ступенчатой зависимости доли митотических клеток от концентрации ингибитора простая гиперболическая кривая плохо аппроксимировала данные, поэтому они были аппроксимированы уравнением Хилла:

$$Y = \frac{(Y_{max} - Y_0)X^w}{X^w + IC_{50}^w} + Y_0 \quad (2.3.1)$$

где Y_{max} , Y_0 , w , IC_{50} — параметры аппроксимации.

2.3.5. Измерения флуоресценции кумарина-30

Спектры возбуждения кумарина-30 были измерены с помощью спектрофотометра UV-1900 (Shimadzu). Спектры излучения флуоресценции были получены с помощью флуоресцентного спектрометра Cary Eclipse (Agilent Technologies) при длине волны возбуждения 420 нм. Измерения интенсивности флуоресценции кумарина-30 в присутствии белка тубулина и изучаемых веществ проводились с помощью прибора Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Мюнхен, Германия). Для измерения сродства тубулин-кумарин-30 смешивались растворы 1.5 мкМ кумарина-30 с растворами, содержащими белок тубулин в концентрациях от 4 нМ до 100 мкМ, в буфере BRB-80-T (80 мМ K-PIPES, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA, 0.005% Tween-20, pH 6.8), в соотношении 1:1.

2.3.6. Определение констант диссоциации кумарина-30 и других лигандов белка тубулина

Равновесная константа диссоциации кумарина-30 была рассчитана путем анализа усиления флуоресценции кумарина-30 при связывании с белком тубулином. Для этого используется простая обратимая реакция:



где C , T и CT — кумарин-30, белок тубулин и комплекс кумарин-30+тубулин, соответственно. Закон действующих масс и законы сохранения для этой реакции использовались для её численного моделирования в программе COPASI [Hoops и др., 2006], на основе чего проводилась аппроксимация экспериментальных данных. Для этого предполагалось, что общий флуоресцентный сигнал I пропорционален сумме концентрации свободного кумарина-30 с коэффициентом A и концентрации комплекса кумарин-30+тубулин с коэффициентом B :

$$I = A[C] + B[CT]. \quad (2.3.3)$$

В квадратных скобках здесь и ниже указаны концентрации реагентов. Таким образом, соотношение B/A характеризовало усиление флуоресценции кумарина-30 при связывании с белком тубулином. Оценка параметров в COPASI проводилась методом средних квадратов и реализовывалась с помощью эволюционного программирования для трех параметров: A , B и константы связывания кумарина-30 с белком тубулином, k_1 , в стационарном состоянии, в то время как для простоты скорость диссоциации, k_2 , была принята за единицу. Равновесная константа диссоциации K_D рассчитывалась как k_2/k_1 .

Равновесные константы диссоциации, K_D , для лигандов колхицинового сайта были определены на основе их конкуренции с кумарином-30 за связывание с белком тубулином (Рис. 36б). В этих случаях использовался следующий набор обратимых реакций:



Здесь L — лиганд колхицинового сайта, а LT — комплекс этой молекулы с белком тубулином. Реакции были описаны с помощью следующей системы дифференциальных уравнений:

$$\frac{d[CT]}{dt} = k_1^1[C][T] - k_2^1[CT], \quad (2.3.6)$$

$$\frac{d[LT]}{dt} = k_1^2[L][T] - k_2^2[LT], \quad (2.3.7)$$

$$[T]_0 = [T] + [CT], \quad (2.3.8)$$

$$[C]_0 = [C] + [CT], \quad (2.3.9)$$

$$[L]_0 = [L] + [LT], \quad (2.3.10)$$

где k_1^1 , k_2^1 , k_1^2 , k_2^2 — кинетические постоянные, индекс 0 обозначает начальные концентрации. Было предположено, что k_1^1 и k_2^1 равны k_1 и k_2 , соответственно, и могут быть взяты из предыдущего результата оценки параметров взаимодействия кумарин-30 с белком тубулином. Интенсивность флуоресценции моделировалась, как описано выше, и оценка параметров включала определение A , B , k_1^2 и k_2^2 . Для простоты константа k_2^2 была принята за единицу, а равновесная константа диссоциации K_D рассчитывалась как k_2^2/k_1^2 .

2.3.7. Новый метод скрининга потенциальных лигандов белка тубулина

Ниже представлен подробный пошаговый протокол по проведению скрининга с использованием кумарина-30 и микротермофореа на приборе Monolith NT. 115 (NanoTemper Technologies, Munich, Germany) и анализу получаемых результатов:

1. На льду: разморозить 1 аликвоту белка тубулина (около 10 мг/мл), перемешать пипетированием, быстро осадить на настольной центрифуге.
2. На льду: развести белок тубулин в буфере BRB-T (80 мМ K-PIPES, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA, 0.005% Tween-20, pH 6.8) до конечной концентрации 800 нМ и открутить разбавленный белок тубулин при 4°C, 13000 g в течение 10 мин. Собрать надосадочную жидкость и хранить ее на льду, пока готовятся растворы исследуемых веществ (этапы 3-8).
3. Разморозить свежие аликвоты 10 мМ кумарина-30 (раствор в ДМСО) и четырех тестируемых соединений. Быстро осадить их на настольной центрифуге.
4. Развести кумарин-30 в ДМСО до концентрации 100 мкМ.
5. Смешать $6 \times 96.5 = 579$ мкл BRB-T и 9 мкл кумарина-30 (100 мкМ исходного раствора в ДМСО) в пробирке для микроцентрифуги, перемешать раствор взбалтыванием/пипетированием.
6. Распределить раствор, содержащий кумарин-30, по пяти пробиркам в количестве 98 мкл в пробирку.
7. Добавить по 2 мкл каждого из исследуемых соединений (10 мМ исходный раствор в ДМСО) или 2 мкл чистого ДМСО (в случае контроля) в пять пробирок с кумарином-30. Хорошо перемешать каждый из растворов с помощью взбалтывания/пипетирования и быстро осадить на настольной центрифуге.
8. Поместить по 10 мкл каждого из пяти растворов, полученных на предыдущем этапе, в три микроцентрифужные пробирки, чтобы подготовить три технических повтора для каждого исследуемого вещества (всего $3 \times 5 = 15$ пробирок).

9. Добавить по 10 мкл раствора белка тубулина (с шага 2) в каждую из 15 пробирок, приготовленных на шаге 8. Перемешать пипетированием.
10. Инкубировать 15 пробирок при комнатной температуре в течение 1 часа, защищая от яркого света (например, завернув в фольгу).
11. Центрифугировать пробирки при температуре 4°C, 13 000 g в течение 10 минут.
12. После центрифугирования перенести растворы в капилляры, обработанные для устранения неспецифической адсорбции (NanoTemper Technologies, #MO-K025), путем погружения кончика капилляра в пробирку. Каждый капилляр после заполнения поместить в планшет и выполнить измерения микротермофореза с помощью прибора Monolith NT.115.

Настройки прибора Monolith NT.115:

- Контроль температуры включен, 25 °C
 - Время начала работы в холодной области: -1.0 с.
 - Время окончания работы в холодной области: 0.0 с.
 - Время начала работы в горячей области: 19.0 с.
 - Время окончания работы в горячей области: 20.0 с.
 - Флуоресцентный канал: “синий”.
 - Мощность микротермофореза: “средняя”.
 - Мощность лазера возбуждения: 100%
13. Экспериментальная процедура, описанная выше, позволяет получить начальные уровни флуоресценции кумарина-30 (т.е. уровень флуоресценции перед нагреванием) и нормированные временные треки микротермофореза (зависимость “ F_{norm} ” от времени).

14. Для каждого независимого эксперимента (четыре разных исследуемых вещества и один контрольный образец с ДМСО, каждое представленное 3 техническими повторами, все измерены в одном капиллярном планшете):
- Вычислить средний начальный уровень флуоресценции по трем техническим повторам, относящимся к контрольному образцу с ДМСО;
 - Вычислить средний начальный уровень флуоресценции по трём техническим повторам, относящимся к каждому из четырех исследуемых веществ на том же капиллярном планшете;
15. Если среднее значение начальной флуоресценции в присутствии изучаемого соединения сильно отличается от контрольного значения с ДМСО (в данном случае более чем на 20%), микротермофоретические треки соответствующих тестируемых соединений в обработку не берут, поскольку они не могут быть однозначно интерпретированы без дополнительного анализа [Jerabek-Willemsen и др., 2011]. В противном случае переходят к шагу 16.
16. По нормированным микротермофоретическим трекам сигнал микротермофореза вычисляется как флуоресценция капилляров во временном интервале “Горячая область” (от 19 до 20 с).
17. Для каждого независимого эксперимента (5 исследуемых веществ с учетом контрольного измерения, каждое из которых представлено 3 техническими повторами, все измеренные на одном капиллярном планшете):
- Вычисляется средний сигнал микротермофореза по трём техническим повторам, соответствующим контролю с ДМСО;
 - Вычисляется средний сигнал микротермофореза по трём техническим повторам, соответствующих каждому из четырех исследуемых веществ на том же капиллярном планшете;

- Нормируется каждое из средних значений сигналов микротермофореза для тестируемых соединений на среднее значение сигнала микротермофореза для контроля с ДМСО с того же капиллярного планшета, чтобы получить «нормированный ответ микротермофореза», или сигнал «R».
18. Проводятся, по меньшей мере, 3 независимых эксперимента для каждого исследуемого вещества. Объединяются нормированные сигналы микротермофореза (R) из независимых экспериментов для каждого из исследуемых веществ.
 19. Используется непарный Z-тест для одной выборки для сравнения нормированных сигналов микротермофореза для разных исследуемых веществ с единицей.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Классическая методика наблюдения динамики микротрубочек

3.1.1. Изучение встраивания ГТФ-тубулина в места дефектов микротрубочек

Чтобы изучить, как близость покровного стекла влияет на процессы повреждения и восстановления решетки микротрубочки производилось наблюдение за встраиванием ГТФ-тубулина в места её дефектов (Рис. 14). Для этого использовались затравки микротрубочек, меченные Alexa-488, от которых сначала полимеризовались микротрубочки в присутствии немеченого ГТФ-тубулина, затем микротрубочки были стабилизированы за счет добавления Alexa-488 тубулина в присутствии GMPCPP. После этого стабилизированные микротрубочки промывались буфером, содержащим ГТФ-тубулин, меченный тетраметилродамином (TAMRA), и инкубировались в течение 18-20 мин для обеспечения условий его встраивания в решетку микротрубочек. Затем проточная камера промывалась буфером, не содержащим белок тубулин, и получались изображения в каналах DIC и двух флуоресцентных каналах для визуализации затравки микротрубочки, её решетки, концевого стабилизирующего участка и любых включений TAMRA-тубулина в её решетку. Пример встраивания ГТФ-тубулина в решетку микротрубочки показан на Рис. 14 внизу, где три канала (черно-белый DIC, красный TAMRA и зелёный Alexa-488) наложены друг на друга. Измерение параметров встраивания ГТФ-тубулина в решетку микротрубочек показывает, что в подавляющем большинстве случаев

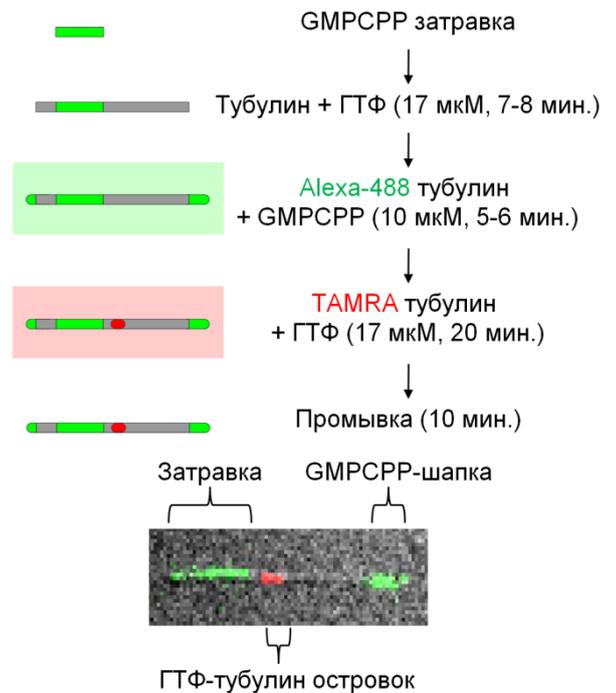


Рис. 14. Схема эксперимента по визуализации встраивания ГТФ-тубулина в решетку микротрубочек.

наблюдается либо один ГТФ-островок, удовлетворяющий критериям, описанным в параграфе 2.2.6., либо островков не наблюдалось. Характерная длина ГТФ-островков оказалась ограниченной снизу отсечкой в 0.5 мкм по разрешающей способности микроскопа, наибольшая длина равна порядка 6 мкм. Пространственная частота появления ГТФ-островков в расчёте на единицу длины микротрубочек оказалась равной $0.12 \pm 0.02 \text{ мкм}^{-1}$ при обработке 782 мкм общей длины микротрубочек. Полученные данные находятся в соответствии с опубликованными ранее в работах [Schaedel и др., 2015], [Aumeier и др., 2016], [Schaedel и др., 2019].

3.1.2. Изучение спасений микротрубочек

Наличие ГТФ-островков в решетке микротрубочек считается одним из основных механизмов спасений. Если предположить, что образующийся в решетке ГТФ-островок может приводить к спасению микротрубочки, а появление таких островков равновероятно по всей длине микротрубочки, то стоит ожидать экспоненциального распределения спасений в зависимости от глубины деполимеризации микротрубочки (то есть длины, на которую происходит разборка микротрубочки между катастрофой и спасением). Для проверки того, какое получается распределение мест спасений микротрубочек при использовании классической экспериментальной методики, была изучена динамика отдельных микротрубочек на поверхности покровного стекла, как описано в параграфе 2.2.3.

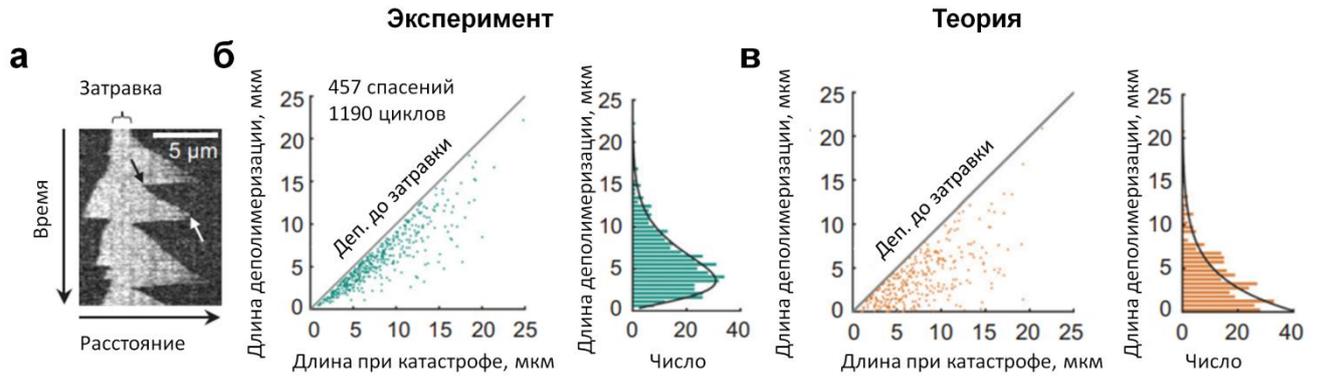


Рис. 15. Ожидаемое и экспериментально полученное распределение мест спасений микротрубочек. а) Пример экспериментально полученной кимограммы микротрубочки, отмечены события спасения (черная стрелка) и катастрофы (белая стрелка). Экспериментальные, б), и теоретические, в), данные о положении мест спасений.

Динамика микротрубочек была визуализирована с помощью DIC микроскопии. При обработке особое внимание уделялось отбору для анализа только тех микротрубочек, которые не пересекались с другими микротрубочками или с какими-либо другими видимыми препятствиями в поле зрения. Кроме того, в обработку не брались микротрубочки, которые проявляли даже кратковременное неспецифическое прилипание к пассивированному покровному стеклу, о чем можно было судить по изменению амплитуды их тепловых колебаний. В общей сложности наблюдалось 457 спасений на 384 микротрубочках, которые соответствовали вышеуказанным критериям. На Рис. 15а показан пример кимограммы отдельной микротрубочки, отражающей её динамику одновременно в пространственной и временной координатах. На кимограмме чёрной стрелкой отмечен момент спасения микротрубочки, а белой — момент катастрофы. Средняя частота спасений составила 1.7 мин^{-1} , что находится в широком диапазоне ранее сообщенных значений [Walker и др., 1988], [Chrétien, Fuller, Karsenti, 1995], [Vemu и др., 2018], [Fees, Moore, 2019], [Vitre и др., 2008], [Gardner и др., 2011]. Оказалось, что при использовании данной *in vitro* методики спасения чаще всего происходят ближе к заправке, что не совпадает с теоретическими ожиданиями для их положений при возникновении на случайно

расположенных ГТФ-островках (Рис. 15б, в). Таким образом, распределение глубин деполимеризации микротрубочек не является экспоненциальным, поэтому положение мест спасений не является случайным. Недавно также сообщалось о подобном распределении позиций спасений, но дальнейшее изучение этого феномена не проводилось [Fees, Moore, 2019].

3.2. Методика наблюдения микроотрбочек на микропьедасталах

3.2.1. Вдали от поверхности покровного стекла ГТФ-тубулин реже встраивается в решетку микроотрбочек

Есть основания полагать, что пик в распределении спасений и его смещение в сторону затравки, от которой растёт микроотрбочка (Рис. 15б), может быть объяснен неспецифическими контактами микроотрбочек с поверхностью покровного стекла. Этот вывод можно сделать на основе рассмотренной в параграфе 1.3.1. теории тепловых колебаний микроотрбочки и гипотезы о том, что ГТФ-островки в решетке микроотрбочек являются основным механизмом спасений. Существование пика в распределении спасений, как таковое, свидетельствует о существовании наиболее вероятного места спасения микроотрбочки (вблизи конца затравки, но на некотором удалении от него). В то же время, тепловые колебания микроотрбочек в случае использования классической экспериментальной методики могут приводить к преимущественным контактам её решетки с поверхностью покровного стекла в соответствии с основными модами колебаний (Рис. 11) на некотором расстоянии от закреплённого конца, то есть затравки. Эти контакты могут быть причиной образования дефектов, встраиванию в них ГТФ-тубулина из раствора и формированию ГТФ-островков, способных вызвать спасения. Несмотря на предпринимаемые попытки исключить такие контакты (как на этапе проведения самого эксперимента, так и за счет выбора подходящих микроотрбочек при обработке), нельзя исключать, что такие кратковременные контакты могут возникать. Вместе с этим, само по себе временное прилипание микроотрбочки к покровному стеклу могло бы удерживать протофиламенты и препятствовать деполимеризации микроотрбочки. Чтобы исключить эти возможности, в данной работе разработана новая *in vitro* экспериментальная методика, позволяющая изолировать микроотрбочки от любого взаимодействия с покровным стеклом. Для этого из фоторезиста SU-8 на покровном стекле методом фотолитографии были изготовлены периодические структуры в виде пьедасталов размером 3×3 мкм

(Рис. 16). Микропъедесталы отделены друг от друга промежутками в 20 мкм, поэтому динамические части микротрубочек, растущие от прикрепленных

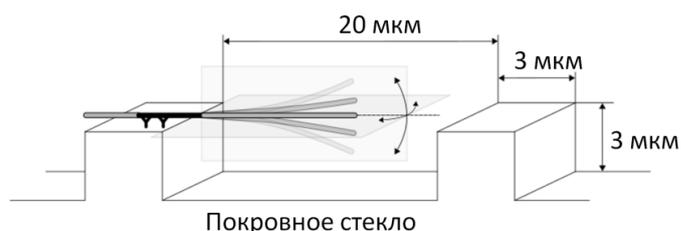


Рис. 16. Схема новой экспериментальной методики.

к микропъедесталам GMPCPP-затравок, хорошо отделены от соседних микротрубочек, микропъедесталов и поверхности покровного стекла. Для проверки гипотезы о встраивании ГТФ-тубулина в места дефектов решетки микротрубочки, которые могут образовываться в результате её взаимодействия с поверхностью покровного стекла в случае новой экспериментальной методики, применен аналогичный протокол наблюдения ГТФ-островков (Рис. 14). Значительная высота микропъедесталов и флуоресцентные свойства материала SU-8, из которого они сделаны, приводят к тому, что их края и область вблизи них оказывается сильно засвеченными при использовании таких же параметров съёмки, как в случае классической экспериментальной методики, Рис. 17.

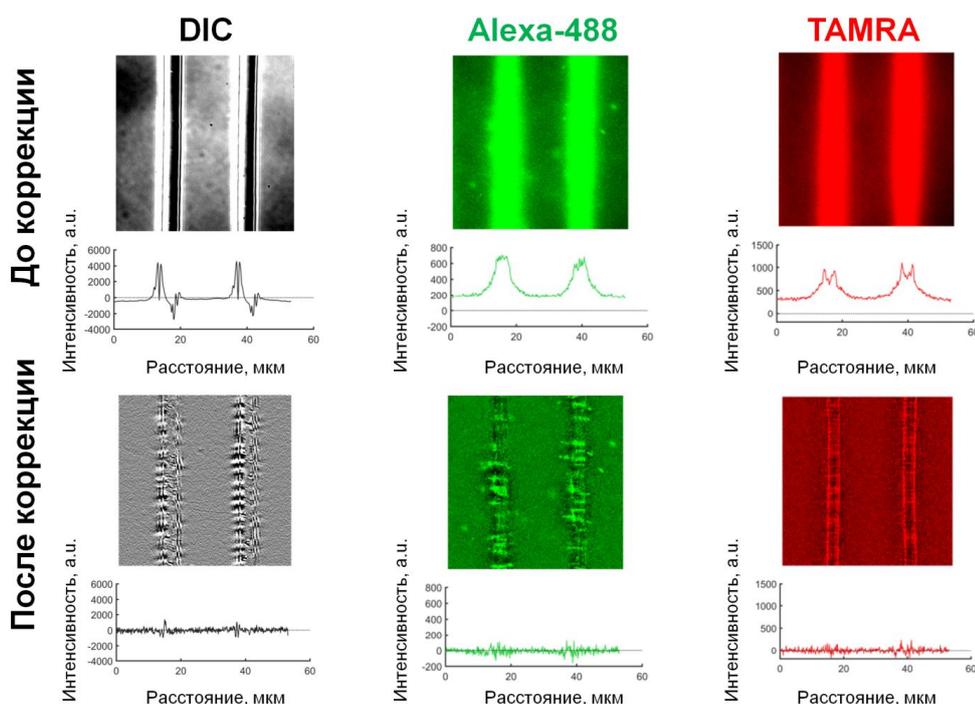


Рис. 17. Пример одного поля зрения до и после применения алгоритма коррекции засветки на краях микропъедесталов в трёх каналах (DIC, Alexa-488 и TAMRA).

Для того, чтобы можно было сопоставить данные по встраиванию ГТФ-тубулина в решетку микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик в данной работе был разработан и применён специальный алгоритм коррекции засветки (параграф 2.2.5., Рис. 13). Данный алгоритм использовался каждый раз перед обработкой изображений микротрубочек (Рис. 17). Оказалось, что TAMRA-тубулин реже встраивается в решетку микротрубочек по сравнению со случаем классической экспериментальной методики (Рис. 18). Это означает, что неспецифическое взаимодействие микротрубочки с поверхностью покровного стекла может быть основной причиной возникновения в нём дефектов и встраивания в них ГТФ-тубулина из раствора.

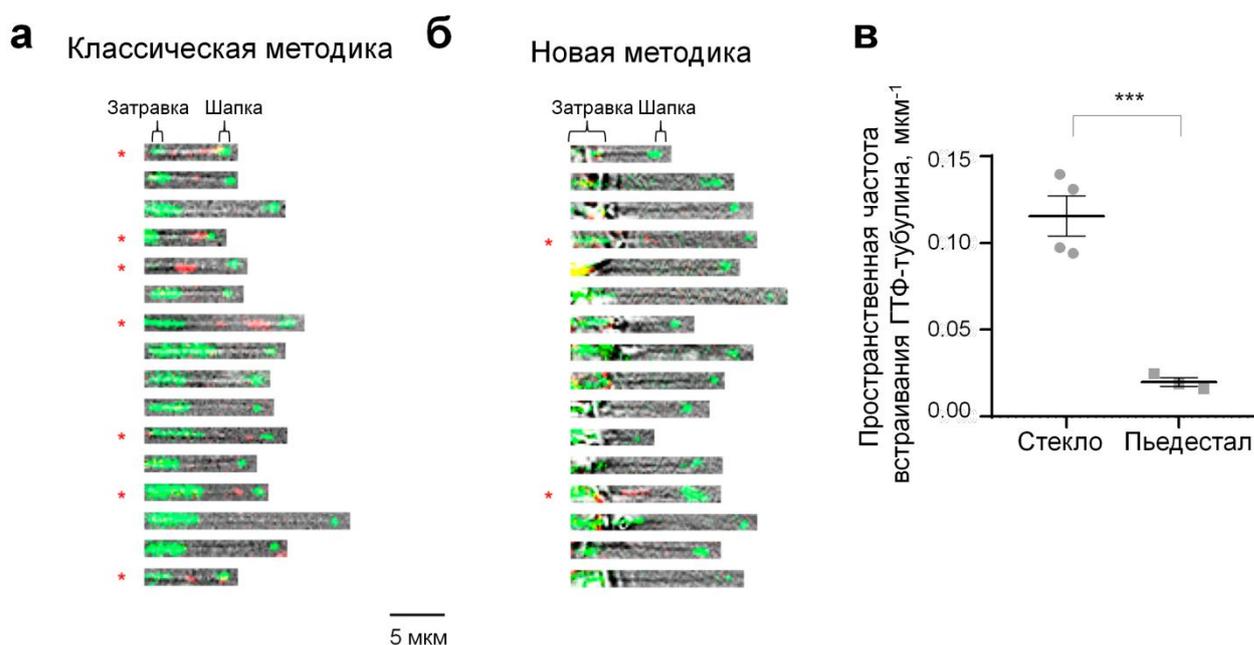


Рис. 18. Сравнение встраивания ГТФ-тубулина в решетку микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик. Статистический анализ представлен двусторонним непарным t-тестом: ns, отсутствие статистической значимости; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

2. Оценка чувствительности детектирования ГТФ-островков

Дополнительно были проведёны контрольные эксперименты, в которых проверено, что полученное различие в частоте возникновения ГТФ-островков в решетке микротрубочек не может быть объяснено незначительной разницей в чувствительности флуоресцентного детектирования при использовании классической и новой экспериментальных методик. Идея этого эксперимента состояла в том, чтобы искусственно создать в решетке микротрубочек структуры, аналогичные TAMRA-меченным ГТФ-островкам, с известными и воспроизводимыми параметрами флуоресценции. Для этого создавались условия, при которых на концах микротрубочек образуются TAMRA-меченные GMPCPP-шапки. Такой подход позволяет, с одной стороны, получить решетку микротрубочки, стабилизированную GMPCPP-шапкой, что важно для успешного наблюдения решетки микротрубочки при использовании классической и новой экспериментальных методик при аналогичных условиях визуализации ГТФ-тубулиновых островков. С другой стороны, TAMRA-мечение GMPCPP-шапки и возможность контролировать её длину и степень мечения за счет использования разных концентраций белка тубулина и разной пропорции смешения TAMRA-тубулина с немеченым белком тубулином, позволяет воспроизвести основные параметры ГТФ-островков. В этом эксперименте при использовании классической и новой экспериментальных методик микротрубочки были полимеризованы из GMPCPP-затравок и стабилизированы в присутствии GMPCPP и TAMRA-меченного тубулина с различной степенью мечения (20, 30 и 50%). Полученные изображения микротрубочек обрабатывались так же, как описано в параграфах 2.2.5, 2.2.6. для количественной оценки интенсивности флуоресценции TAMRA-меченных GMPCPP-шапок и их длин, Рис.19.

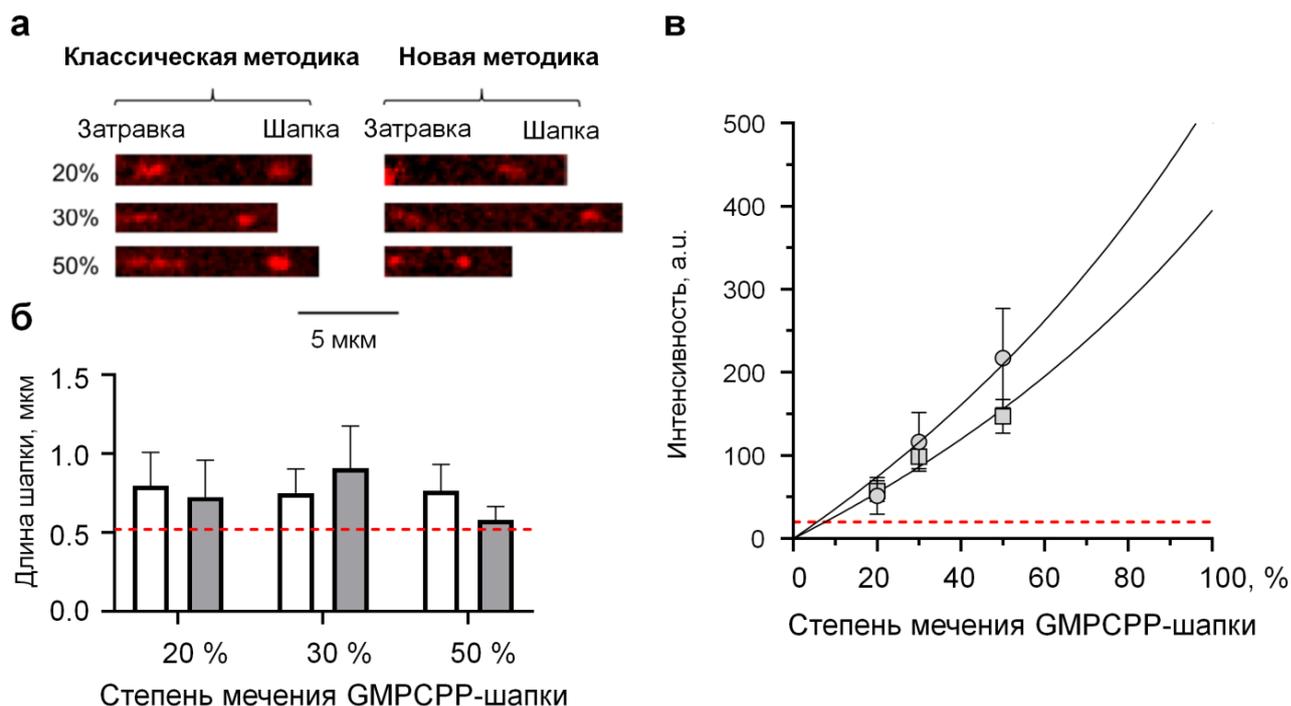


Рис. 19. Сравнение чувствительности детектирования ГТФ-островков в решетке микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик. а) Изображения затравок и GMPCPP-шапок микротрубочек, меченных TAMRA. б) Длины GMPCPP-шапок. в) Зависимость флуоресценции GMPCPP-шапок, меченных TAMRA, от степени мечения.

Как показано на Рис. 19б, в, интенсивность сигналов, соответствующих TAMRA-меченым GMPCPP-шапкам, оказалась сопоставима в обоих анализах. Аппроксимация зависимости флуоресценции TAMRA-меченных GMPCPP-шапок от степени их мечения показана сплошной линией на Рис. 19в и задана следующей формулой:

$$I = A \frac{x k_{on}^{TAMRA}}{x(k_{on}^{TAMRA} - k_{on}^{unlabeled}) + \alpha k_{on}^{unlabeled}} \quad (3.2.1)$$

здесь x — степень мечения шапки; α — степень мечения TAMRA-тубулина, который при проведении эксперимента смешивается с немеченым белком тубулином для изменения плотности мечения GMPCPP-шапки; k_{on}^{TAMRA} — константа скорости присоединения для TAMRA-тубулина к концу микротрубочки, $k_{on}^{unlabeled}$ — константа скорости присоединения к концу

микротрубочки для немеченого белка тубулина, A — коэффициент, который определяется настройками визуализации.

В формуле (3.2.1) учтено, что константы присоединения TAMRA-тубулина и немеченого белка тубулина к концу микротрубочки могут различаться из-за возможных эффектов, связанных с наличием молекулы флуорофора на белке тубулине. Это, в свою очередь, могло бы повлиять на результирующую степень мечения GMPCPP-шапки, сделав её отличной от степени мечения белка тубулина в растворе. Если принять, что суммарная концентрация белка тубулина в растворе C , концентрация TAMRA-тубулина в растворе $C^{TAMRA} = xC/\alpha$, концентрация немеченого белка тубулина в растворе $C^{unlabel ed} = (\alpha - x)C/\alpha$, то можно записать вероятности для встраивания TAMRA-тубулина и немеченого белка тубулина в GMPCPP-шапку микротрубочки в единицу времени:

$$P^{TAMRA} = k_{on}^{TAMRA} C^{TAMRA} - k_{off}^{TAMRA} \approx k_{on}^{TAMRA} C^{TAMRA} = k_{on}^{TAMRA} \frac{x C}{\alpha} \quad (3.2.2)$$

$$P^{unlabeled} = k_{on}^{unlabeled} C^{unlabeled} - k_{off}^{unlabeled} k_{on}^{unlabeled} C^{unlabeled} = k_{on}^{unlabeled} \frac{(\alpha - x) C}{\alpha} \quad (3.2.3)$$

Здесь учтено, что в присутствии GMPCPP отсоединение белка тубулина от микротрубочки почти не происходит, то есть k_{off}^{TAMRA} и $k_{off}^{unlabeled}$ равны нулю. Интенсивность свечения шапки, I , пропорциональна линейной плотности расположения TAMRA-тубулина в решетке микротрубочки в составе GMPCPP-шапки, ρ^{TAMRA} :

$$I = A \rho^{TAMRA} \quad (3.2.4)$$

Для приращения длины микротрубочки имеем:

$$\begin{cases} dL(\text{приращение длины микротрубочки}) \sim (P^{TAMRA} + P^{unlabeled}) dt \\ dN^{TAMRA}(\text{приращение через TAMRA тубулин}) \sim P^{TAMRA} dt \end{cases} \rightarrow$$

$$\rightarrow \rho^{TAMRA} = \frac{dN^{TAMRA}}{dL} \sim \frac{p^{TAMRA}}{p^{TAMRA} + p^{unlabeled}} \quad (3.2.5)$$

Из (3.2.4) с учетом (3.2.5), (3.2.3), (3.2.2) получаем формулу (3.2.1):

$$I(x) = A\rho^{TAMRA} = A \frac{p^{TAMRA}}{p^{TAMRA} + p^{unlabeled}} = A \frac{k_{on}^{TAMRA} \frac{xC}{\alpha}}{k_{on}^{TAMRA} \frac{\alpha C}{\alpha} + k_{on}^{unlabeled} \frac{(\alpha-x)C}{\alpha}} =$$

$$A \frac{x k_{on}^{TAMRA}}{x(k_{on}^{TAMRA} - k_{on}^{unlabeled}) + \alpha k_{on}^{unlabeled}}$$

Оценка значений для констант присоединения TAMRA-тубулина и немеченого белка тубулина даёт значения ~ 35 и $\sim 79 \text{ M}^{-1}$, соответственно. На Рис. 19в можно видеть, что различие в константах присоединения меченого и немеченого белка тубулина приводит к нелинейности зависимости I от x . Тем не менее, при малых значениях степени мечения зависимость близка к линейной. В свою очередь, чувствительность обнаружения сигнала, определенная как интенсивность, равная стандартному отклонению фонового шума, соответствует плотности мечения GMPCPP-шапки TAMRA-тубулином в 5% в обоих случаях, то есть в классической и новой экспериментальных методиках. Как видно на Рис. 19б, длины GMPCPP-шапок, меченных TAMRA, в этих контрольных экспериментах были сопоставимы с длинами островков из TAMRA-меченного ГТФ-тубулина в решетке микротрубочек (параграф 3.1.1.). На этом основании можно считать, что чувствительности измерений интенсивности флуоресценции при использовании классической и новой экспериментальных методик достаточно для того, чтобы можно было обнаружить островки из TAMRA-меченного ГТФ-тубулина, имеющие длины, сравнимые с размерами TAMRA-меченных GMPCPP-шапок микротрубочек, описанных выше.

3.2.3. Вдали от поверхности покровного стекла частота спасений ниже, чем у поверхности стекла

Чтобы подтвердить гипотезу о том, что спасения микроотростков вызваны наличием в их решетке ГТФ-островков, динамика микроотростков была визуализирована с помощью DIC микроскопии в случае новой экспериментальной методики. Как и в случае визуализации ГТФ-островков, перед анализом динамики микроотростков с применением этой методики использовался специальный алгоритм коррекции засветки на краях микропъедесталов в канале DIC (параграф 2.2.5., Рис. 13). Пример применения алгоритма для этого канала показан на Рис. 17. Благодаря использованию алгоритма коррекции засветки удалось получить кимограммы отдельных микроотростков, аналогично случаю классической экспериментальной методики (Рис. 20).

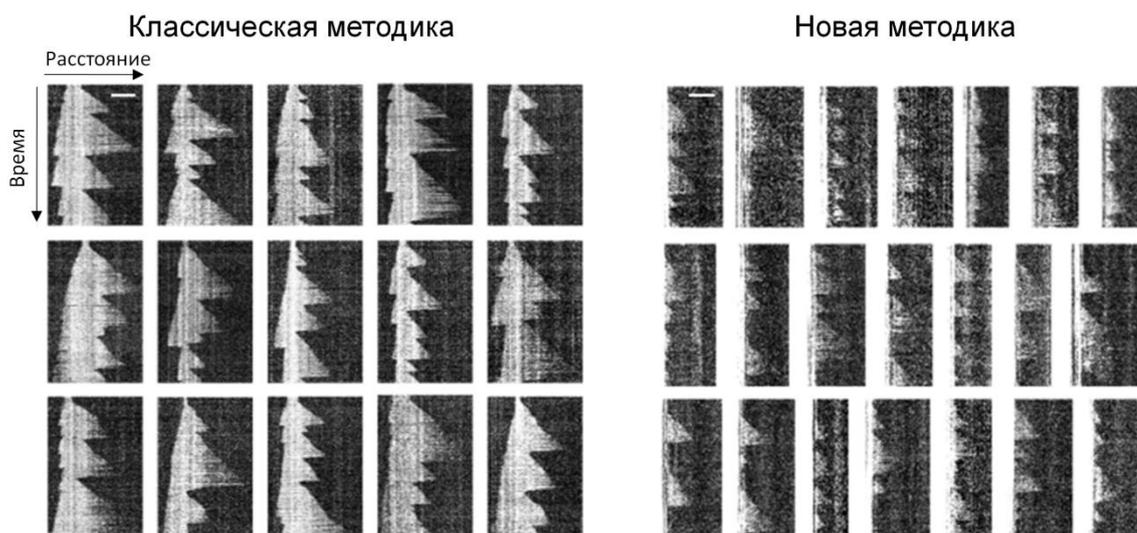


Рис. 20. Примеры кимограмм микроотростков при использовании классической и новой экспериментальных методик. Мерный отрезок соответствует 5 мкм.

Несмотря на более низкое качество кимограмм, полученных при использовании новой экспериментальной методики, их обработка и анализ проведён так же, как и в случае классической экспериментальной методики. Для этого в обоих случаях на каждой кимограмме выбирались репрезентативные циклы полимеризации-деполимеризации (подробнее в параграфе 2.2.6.).

Сравнение динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик не выявило различий в скоростях роста микротрубочек или частотах катастроф. Однако частота спасений микротрубочек при использовании новой экспериментальной методики оказалась значительно ниже, чем в классической (Рис. 21). В тех редких случаях, когда две микротрубочки все же случайно пересекались, можно было наблюдать спасения в местах их пересечения, что позволяет предположить, что качество изображения в новой экспериментальной методике было достаточным для обнаружения спасений в тех случаях, когда они ожидалось. Подобных случаев было не так много (и они были исключены из анализа), поскольку эксперимент специально проводился таким образом, чтобы избежать пересечения микротрубочек друг с другом и с другими препятствиями.

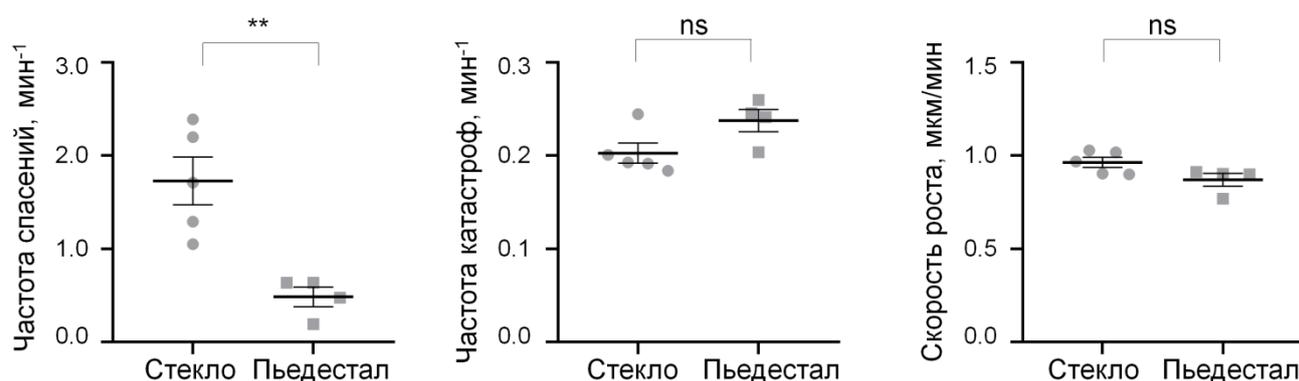


Рис. 21. Сравнение параметров динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик. Статистический анализ представлен двусторонним непарным t-тестом: ns, отсутствие статистической значимости; ** $P < 0.01$.

3.3. Изучение регуляции динамики микротрубочек при использовании двух экспериментальных методик

3.3.1. Изучение спасений микротрубочек, вызванных белком EB1 и паклитакселом

Чтобы дополнительно убедиться в том, что значительное снижение частоты спасений в случае новой экспериментальной методики не является следствием ограничений визуализации микротрубочек вблизи краёв микропьедесталов при использовании DIC микроскопии, проведено наблюдение за динамикой микротрубочек в присутствии регуляторного белка EB1 и препарата, стабилизирующего микротрубочки, паклитаксела. Эти условия были выбраны для увеличения частоты спасений микротрубочек и, таким образом, для большего смещения позиций спасений от края микропьедесталов для лучшей визуализации динамики концов микротрубочек. Как и ожидалось из опубликованной работы [Mohan и др., 2013] (Рис. 8), комбинация белка EB1 и паклитаксела повышала частоту катастроф и спасений при использовании классической экспериментальной методики (Рис. 22).

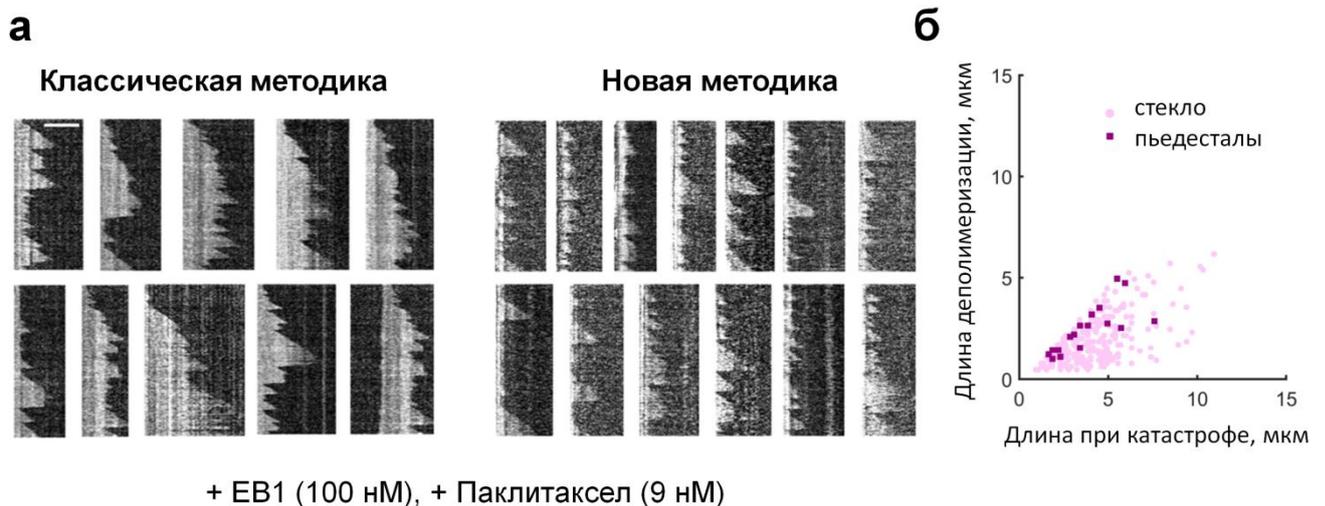


Рис. 22. Спасения микротрубочек при добавлении белка EB1 (100 нМ) и паклитаксела (9 нМ) при использовании классической и новой экспериментальных методик. а) Примеры кимограмм. Мерный отрезок соответствует 5 мкм. б) Данные о положении мест спасений.

Распределение длин микротрубочек между катастрофами и соответствующими спасениями (то есть глубин деполимеризаций), сместилось в сторону от затравки микротрубочки и стало близким к экспоненциальному, что позволяет предположить, что места спасений в присутствии белка EB1 и паклитаксела расположены случайным образом (Рис. 22б).

Однако в случае новой экспериментальной методики по-прежнему наблюдалось очень мало спасений, как можно видеть на Рис. 22, 23. Отсутствие спасений микротрубочек при добавлении белка EB1 и паклитаксела в случае использования новой экспериментальной методики можно считать неожиданным. Тем не менее, это наблюдение согласуется с предположением о том, что паклитаксел способен аккумулироваться в местах повреждений решетки микротрубочек и преобразовывать их в участки, на которых могут происходить спасения, когда микротрубочки собираются вблизи покровного стекла [Rai и др., 2020)]. В соответствии с этим предположением и результатами, описанными в параграфе 3.2.1., в новой экспериментальной методике паклитаксел не способен так же эффективно индуцировать спасения микротрубочек, как в случае классической экспериментальной методики, из-за меньшего количества повреждений решетки микротрубочек в случае новой экспериментальной методики по сравнению с классической.

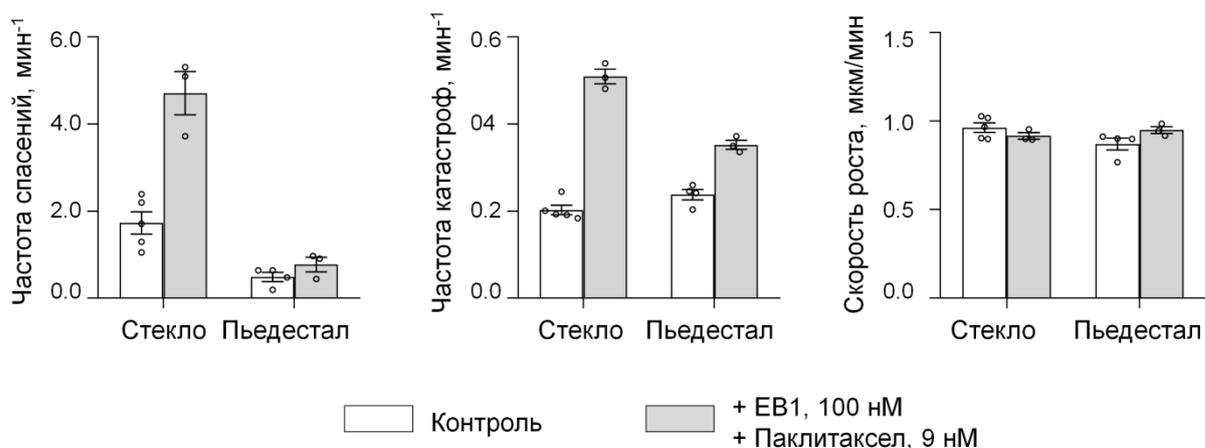


Рис. 23. Сравнение параметров динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик в присутствии белка EB1 (100 нМ) и паклитаксела (9 нМ).

3.3.2.Изучение спасений микротрубочек, вызванных винбластином

Кратковременные контакты микротрубочки с поверхностью покровного стекла могут нарушить рост микротрубочек, что приводит к повреждению решетки. Это, в свою очередь должно способствовать связыванию паклитаксела с микротрубочками либо за счет усиления его проникновения в полимер и доступа к просветной стороне молекул белка тубулина, либо за счет изменения сродства субъединиц белка тубулина в решетке к паклитакселу, как было предположено в работе [Raі и др., 2020]. Ранее, с помощью криоэлектронной томографии продемонстрировано, что присутствие вещества винбластин в растворе во время сборки микротрубочек может способствовать повреждению их решетки ([Raі и др., 2020], [Berg van den и др., 2023]). Более того, одновременное присутствие паклитаксела и винбластина в буфере при сборке микротрубочек приводит к нарушению роста микротрубочек и усиленному включению флуоресцентных таксанов в участки, которые начинаются вблизи растущих концов и затем сохраняются в решетке ([Raі и др., 2020]).

В данной работе проверялось, будет ли присутствие винбластина достаточным для возникновения спасений при использовании новой экспериментальной методики. В присутствии 50 нМ винбластина наблюдалось ожидаемое снижение скорости роста микротрубочек как при использовании классической экспериментальной методики, так и новой методики, в то время как частота катастроф не менялась (Рис. 24). Кроме того, небольшое, но статистически значимое увеличение частоты спасений действительно наблюдалось в случае новой экспериментальной методики. Это говорит о том, что винбластин может приводить к повреждениям решетки микротрубочек, восстановление которых с помощью ГТФ-тубулина из раствора, как ожидается, увеличивает частоту спасений.

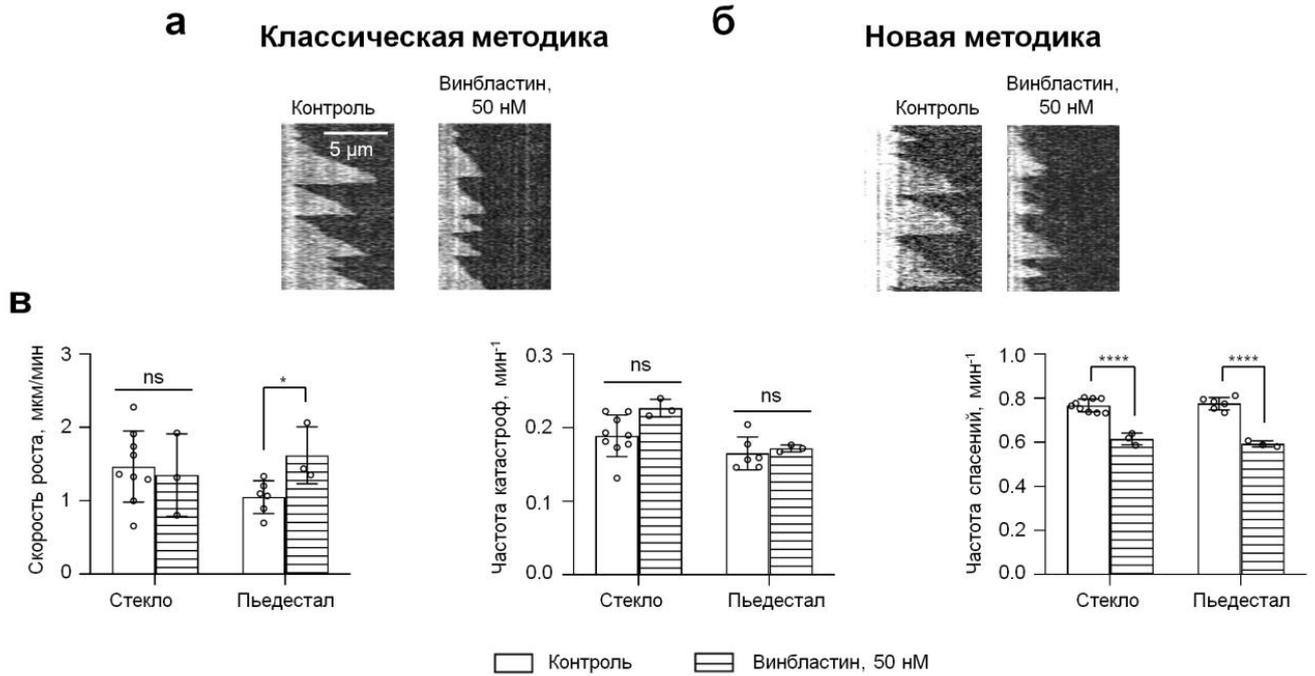


Рис. 24. Сравнение динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальной методик в присутствии вещества винбластин. а), б) — кимограммы, в) — параметры динамики микротрубочек. Статистический анализ представлен двусторонним непарным t-тестом: ns, отсутствие статистической значимости; * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

3.3.3. Изучение спасений микротрубочек, вызванных комбинацией винбластина и паклитаксела

В следующем эксперименте микротрубочки подвергались комбинированной обработке 50 нМ винбластина и низкими концентрациями паклитаксела, 9 и 18 нМ (Рис. 25). Можно видеть, что такая комбинация низкомолекулярных модуляторов динамики микротрубочек приводит к резкому увеличению частоты спасений микротрубочек в случае микропьедесталов до значений, наблюдаемых при использовании классической экспериментальной методики. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что нарушенная структура микротрубочек в присутствии винбластина облегчает связывание паклитаксела с микротрубочками.

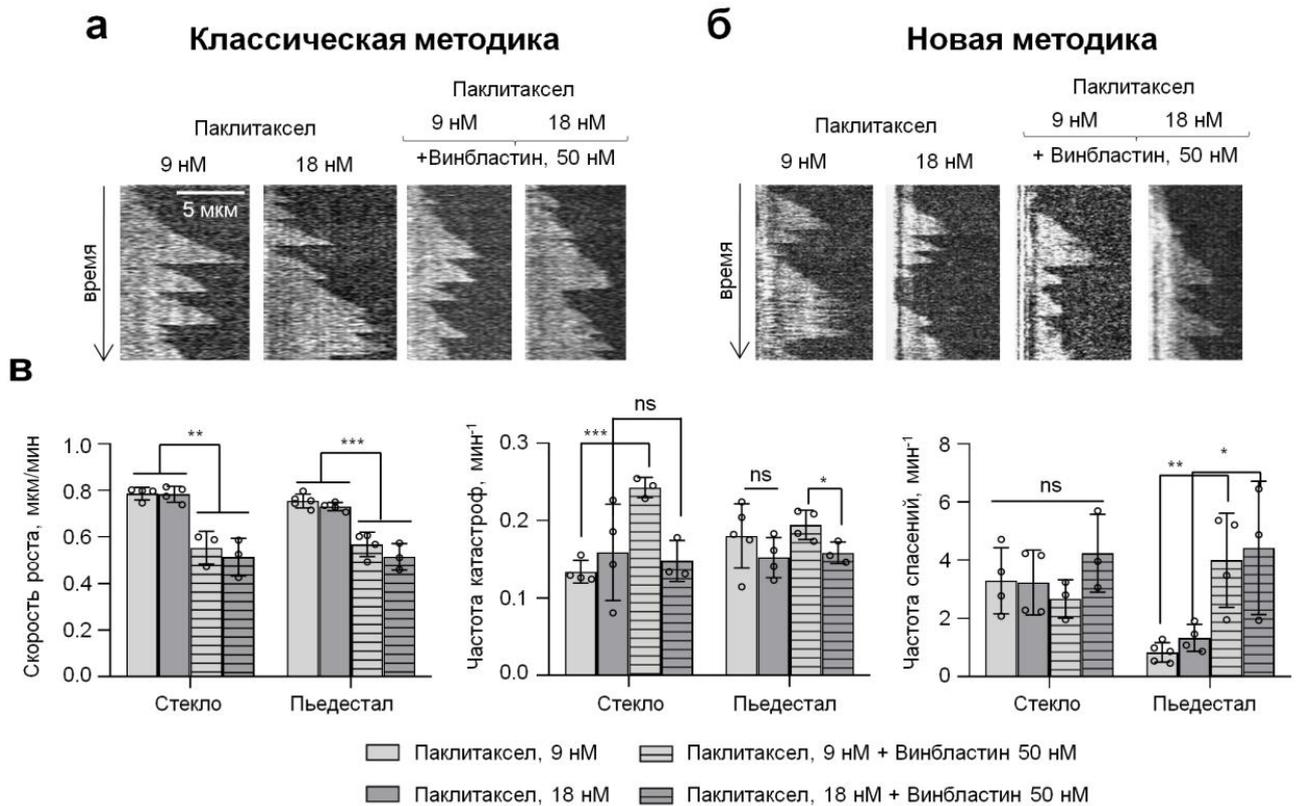


Рис. 25. Сравнение динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик в присутствии винбластина и паклитаксела. а), б) — кимограммы, в) — параметры динамики микротрубочек. Статистический анализ представлен двусторонним непарным t-тестом: ns, отсутствие статистической значимости; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3.3.4. Фрагмент белка CLASP2 увеличивает частоту спасений при использовании обеих экспериментальных методик

Помимо комбинации белка EB1 и паклитаксела, белок-модулятор CLASP2 был охарактеризован как ещё один эффектор динамики и основной фактор спасений микротрубочек [Drabek и др., 2006], [Mimori-Kiyosue и др., 2005], [Majumdar и др., 2018], [Aher и др., 2018], [Lawrence и др., 2018]. Его эффекты ранее охарактеризованы с помощью классической экспериментальной методики *in vitro*, поэтому интересным оказался вопрос, будет ли воздействие CLASP2 на микротрубочки аналогичным в случае использования новой экспериментальной методики или нет. Для этого в данной работе был синтезирован в бактериях и очищен минимальный фрагмент CLASP2, содержащий домен TOG2, окруженный

неупорядоченными L- и S-участками, на N-конце слитый с GFP ([Aher и др., 2018]). Ранее показано, что этот фрагмент GFP-L-TOG2-S обладает многими свойствами полноразмерной конструкции, включая способность вызывать спасения и подавлять катастрофы микротрубочек ([Aher и др., 2018]). Оказалось, что в присутствии 27 нМ GFP-L-TOG2-S и 100 нМ EB1-GFP в растворе скорость роста микротрубочек не изменялась, частота катастроф незначительно снижалась, в то время как частота спасений существенно увеличивалась при использовании обеих экспериментальных методик (Рис. 26).

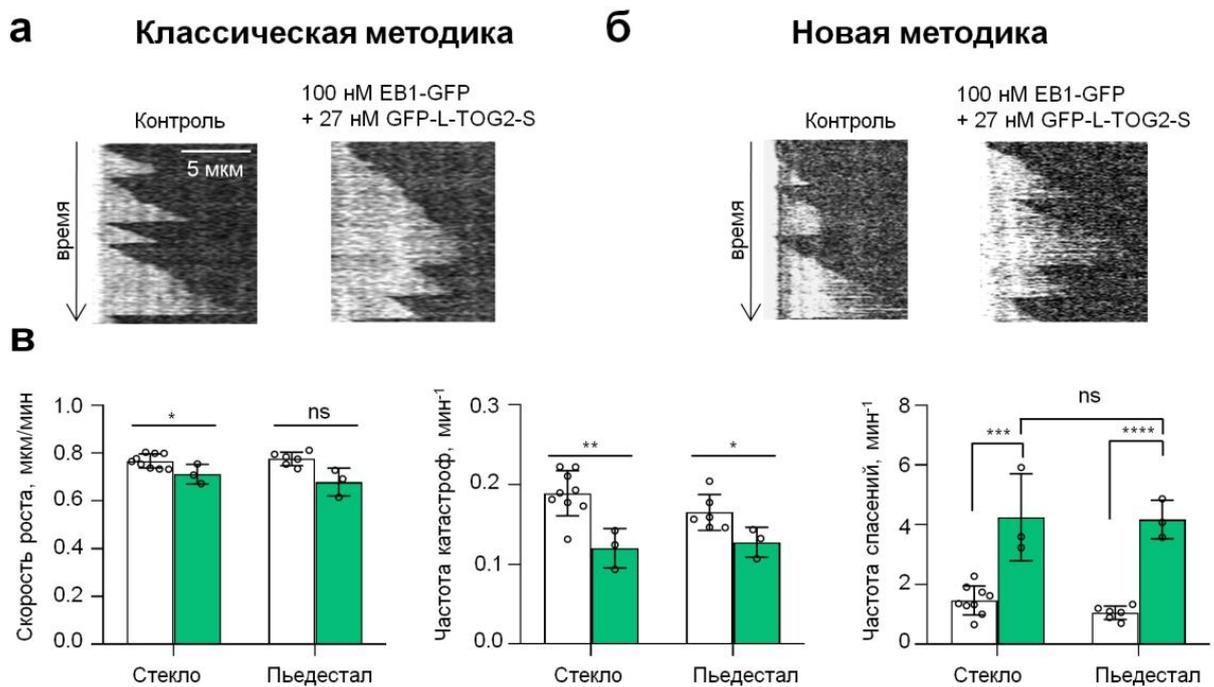


Рис. 26. Сравнение динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик при добавлении фрагмента белка CLASP2. а), б) — кимограммы, в) — параметры динамики микротрубочек. Статистический анализ представлен двусторонним непарным t-тестом: ns, отсутствие статистической значимости; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

3.3.5. Общие данные о спасениях микротрубочек, полученные с использованием двух экспериментальных методик

Обобщение данных о спасениях микротрубочек, полученных с использованием двух экспериментальных методик, в присутствии разных

регуляторных молекул представлено на Рис. 27. На основе этих данных можно сформулировать главный вывод о том, что микротрубочки с малым числом дефектов решетки, растущие в новой экспериментальной методике с использованием микропьедесталов, редко спасаются и слабо чувствительны к низким концентрациям паклитаксела, в отличие от случая использования классической экспериментальной методики. Следуя предыдущим работам ([Mohan и др., 2013], [Rai и др., 2020]), спасения были классифицированы на повторяющиеся и случайно локализованные для того, чтобы получить дополнительное представление об их механизме. Этот анализ показал, что при использовании классической экспериментальной методики значительная часть спасений, около 40%, происходит на так называемых «стабильных сайтах спасения», в то время как остальные 60% были локализованы случайным образом (Рис. 27). Причина возникновения «стабильных сайтов спасения» вполне естественно ложится на представления о типах дефектов решетки микротрубочки (Рис. 2, 3). Указанные пропорции примерно одинаковые во всех экспериментальных условиях в случае классической экспериментальной методики. В случае возникновения дефектов, которые не могут быть полностью восстановлены за счет встраивания ГТФ-тубулина из раствора, возникают условия для продолжительных динамических процессов обмена димеров белка тубулина внутри решетки микротрубочки с ГТФ-тубулином в растворе. Такие динамические процессы могли бы поддерживать существование ГТФ-островка, несмотря на постепенный гидролиз ГТФ, и определять его способность вызывать спасения. В то же время, доля повторных спасений в эксперименте с микропьедесталами была низкой в условиях, которые были определены как «малодефектные», то есть в контрольном случае и в присутствии паклитаксела. Вместе с тем, добавление вещества винбластин, нарушающего рост микротрубочек, увеличивало количество повторных спасений в случае новой методики.

а

Метод	Контроль	+ Паклитаксел	+ Винбластин	+ Паклитаксел и Винбластин	+ TOG2
Классический	1.5 ± 0.5 (787)	3.3 ± 0.8 (865)	1.3 ± 0.6 (287)	3.5 ± 0.9 (471)	4.3 ± 1.5 (231)
Новый	1.0 ± 0.2 (228)	1.1 ± 0.3 (265)	1.6 ± 0.4 (72)	4.2 ± 1.6 (146)	4.5 ± 1.3 (161)



б

Метод	Контроль	+ Паклитаксел	+ Винбластин	+ Паклитаксел и Винбластин	+ TOG2
Классический	36 ± 8	44 ± 10	46 ± 3	47 ± 8	37 ± 3
Новый	18 ± 10	15 ± 13	56 ± 36	79 ± 12	34 ± 11



Рис. 27. Совместный анализ спасений микроотрубочек.

3.3.6. Механизм регуляции спасений микроотрубочек

Как близость покровного стекла способна приводить к дефектам в решетке микроотрубочек? Можно рассмотреть два сценария. В первом случае, который в большей степени соответствует полученным в данной работе результатам, повреждения решетки могут возникнуть в результате нарушений полимеризации микроотрубочек, вызванных неспецифическими контактами растущего конца микроотрубочки с покровным стеклом. Например, протофиламент или группа

протофиламентов на растущем конце может иммобилизоваться на покровном стекле за счет неспецифических взаимодействий с ним и будет в таком случае отставать от остальных протофиламентов, способствуя переключению количества протофиламентов или приводя к наличию дефекта в решетке микротрубочки. Этот механизм согласуется также с предыдущими наблюдениями, согласно которым участки связывания флуоресцентных таксанов появляются вблизи конца растущей микротрубочки и затем сохраняются в течение нескольких минут ([Rai и др., 2020]). Во втором гипотетическом сценарии решетка микротрубочки может быть повреждена уже после её сборки из-за кратковременных взаимодействий своей боковой стороной с покровным стеклом. В этом случае дефект локализовался бы на некотором расстоянии от свободного конца микротрубочки. Этот сценарий представляется возможным, но значительно более редким, основываясь на наблюдениях взаимодействия микротрубочек с флуоресцентными таксанами ([Rai и др., 2020]). Тем не менее, в обоих сценариях неспецифические взаимодействия микротрубочек с покровным стеклом привели бы к появлению дефектов их решетки, где может происходить обмен с ГТФ-тубулином из раствора и включение паклитаксела (Рис. 28).

Влияние фрагмента CLASP2, GFP-L-TOG2-S, на спасения микротрубочек при использовании обеих методик, классической и новой, позволяет предположить, что этот белок оказывает стабилизирующее действие независимо от наличия участков дефектной решетки, способствующих связыванию паклитаксела. С другой стороны, в работе [Aher и др., 2020] показано, что CLASP2 связывается с дефектами решетки микротрубочки и устраняет их. Это кажущееся противоречие можно объяснить тем, что незначительные дефекты решетки, такие как наблюдаемые с помощью криоэлектронной микроскопии ([Debs и др., 2020], [Guyomar и др., 2022]), все еще могут присутствовать в решетках микротрубочек при использовании новой экспериментальной методики. Размер таких дефектов, вероятно, довольно мал по сравнению с ситуацией, когда в присутствии покровного стекла образуются дополнительные нарушения

решетки. Поэтому возможно, что такие небольшие дефекты решетки могут быть достаточными для связывания с доменом TOG2, но недостаточными для запуска кооперативной ассоциации с паклитакселом.

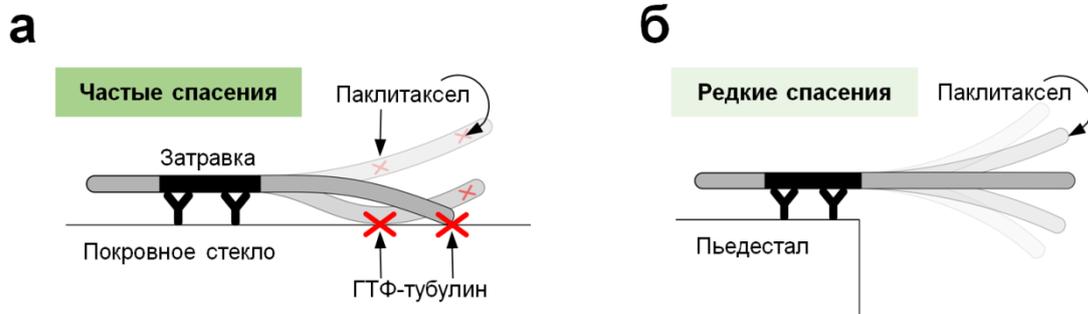


Рис. 28. Схема воздействия паклитаксела на микротрубочки в случае использования классической и новой экспериментальных методик.

3.4. Поиск новых ингибиторов динамики микротрубочек

3.4.1. Кумарин-30 эффективно подавляет динамику микротрубочек *in vitro*

Поиск новых лигандов колхицинового сайта белка тубулина в базе данных NCI производился методом, описанным в параграфе 2.3.1. (эта часть работа проводилась с.н.с. ФИЦ ХФ РАН имени Н.Н.Семенова, Романовым А.Н.). Среди предсказанных с помощью алгоритма COMPARE кандидатов веществ-аналогов колхицина кумарин-30 оказался известным лазерным красителем с ярко выраженными флуоресцентными свойствами (Рис. 29а). Это свойство кумарина-30 могло быть использовано для разработки на его основе флуоресцентного зонда белка тубулина при подтверждении его колхицин-подобных свойств. Для этого сначала было исследовано влияние кумарина-30 на отдельные микротрубочки с использованием классической экспериментальной методики *in vitro* (Рис. 29б) с помощью DIC микроскопии. Реализация этой методики включала использование стабилизированных затравок, прикрепленных к поверхности покровного стекла с помощью антител к дигоксигенину. Остальная поверхность покровного стекла блокировалась Pluronic F-127 (подробнее в параграфе 2.3.3).

На Рис. 29в в контрольных измерениях 1 и 2 показана динамика микротрубочек в отсутствие кумарина-30 в начале и в конце эксперимента для гарантии того, что нормальная динамика микротрубочек полностью восстанавливается после вымывания исследуемого вещества из проточной камеры после каждого теста. Нокодазол (0.5 мкМ) и паклитаксел (0.02 мкМ) использовались в качестве положительного контроля. Оказалось, что кумарин-30 действительно оказывает зависящее от концентрации ингибирующее действие на скорость роста микротрубочек, аналогично хорошо известному лиганду колхицинового сайта, нокодазолу, но отличается от хорошо известного стабилизатора микротрубочек, паклитаксела (Рис. 29в, г). При субмикромольной концентрации кумарина-30 ($IC_{50} = 0.7 \pm 0.1$ мкМ) было достигнуто двукратное снижение скорости роста микротрубочек и статистически значимое снижение

частоты их катастроф (Рис. 29г). Это наблюдение позволяет предположить, что кумарин-30 может влиять на сборку микротрубочек по механизму, отличному от тривиальной инактивации белка тубулина в растворе. В противном случае для заметного снижения скорости роста микротрубочек потребовалась бы гораздо более высокая концентрация кумарина-30. Таким образом, можно предположить, что кумарин-30 влияет на динамику микротрубочек, воздействуя на концевые участки микротрубочек, как и ожидается для веществ, связывающихся с колхициновым сайтом [Gudimchuk, McIntosh, 2021].

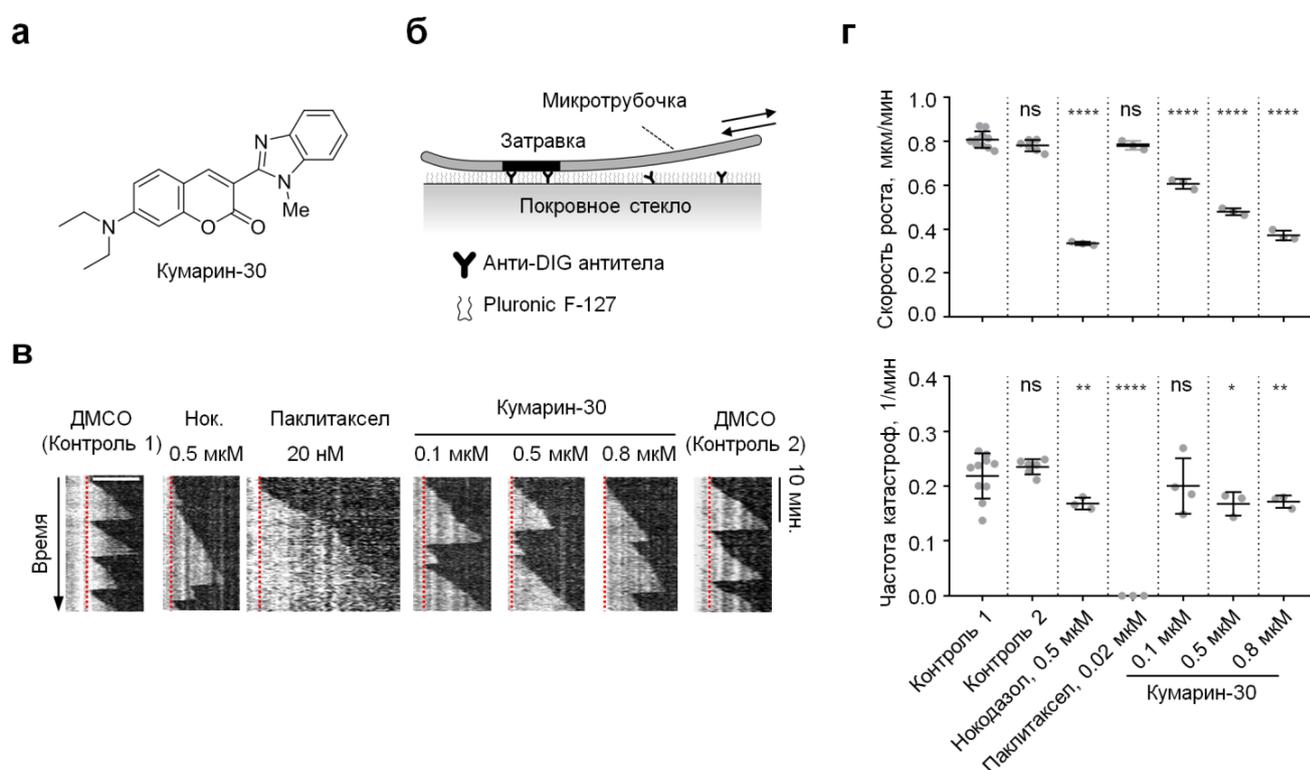


Рис. 29. Проверка воздействия кумарина-30 на динамику микротрубочек *in vitro*. а) Структура кумарина-30. б) Схема классической *in vitro* методики. в) Типичные кимограммы динамики микротрубочек при различных концентрациях кумарина-30, ДМСО, нокодазола и паклитаксела. Граница между стабильной затравкой микротрубочки и растущей динамической частью отмечена красной пунктирной линией. Масштабный отрезок — 5 мкм. г) Скорости роста микротрубочек и частоты катастроф в присутствии нокодазола, паклитаксела или различных концентраций кумарина-30. Статистический анализ представлен двусторонним непарным t-тестом с поправкой Уэлча: ns, отсутствие статистической значимости; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

3.4.2. Кумарин-30 эффективно подавляет деление раковых клеток

Данная часть работы выполнена в лаборатории проф. Ивана Андреевича Воробьёва (Назарбаев Университет, г. Астана, Казахстан). Обработка части экспериментальных данных проводилась автором.

Чтобы непосредственно визуализировать воздействие кумарина-30 на микротрубочки в митотическом веретене, произведена обработка клеток линии A549 кумарином-30, ДМСО, нокодазолом или паклитакселом с последующей 24-часовой инкубацией, фиксацией и окрашиванием антителами к белку тубулину (Рис. 30а). В отличие от контрольного случая с ДМСО, в котором наблюдались нормальные микротрубочки и митотическое веретено, обработка клеток паклитакселом приводила к образованию пучков микротрубочек и aberrантных веретен, в то время как в клетках, обработанных нокодазолом и кумарином-30, микротрубочки были полностью разобраны (Рис. 30а). Эти наблюдения подтверждают, что кумарин-30 действует как эффективный дестабилизатор микротрубочек.

Для изучения влияния кумарина-30 на пролиферацию культивируемых раковых клеток человека был использован анализ клеточного цикла с применением йодида пропидия и проточной цитометрии (Рис. 30б). В качестве положительного контроля использовалась обработка клеток нокодазолом. Оказалось, что кумарин-30 подавляет митоз в субмикромольных концентрациях ($IC_{50} = 0.15 \pm 0.01$ мкМ). Дополнительно, с помощью покадрового анализа данных микроскопии фазового контраста, было подтверждено, что кумарин-30, как и нокодазол, вызывает длительную остановку митоза в клетках линий A549, MCF-7 и HeLa после 12-часовой инкубации (Рис. 30в).

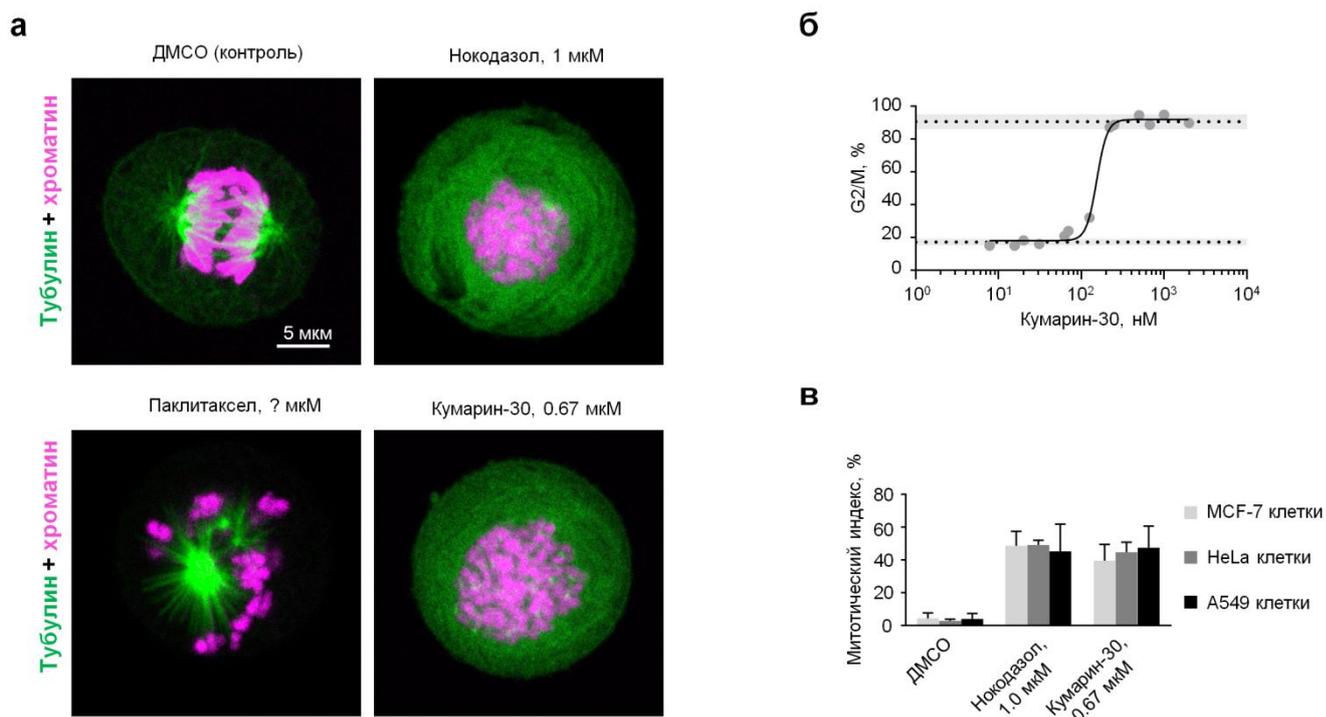


Рис. 30. Воздействие кумарина-30 на делящиеся раковые клетки. а) Примеры визуализации белка тубулина/микротрубочек и хроматина внутри клеток. б) Измерение доли клеток в популяции, находящихся в фазе G2/M, в зависимости от концентрации кумарина-30 на основе измерения распределения содержания ДНК с помощью проточной цитометрии. Пунктирные линии с SD соответствуют уровням для контроля с ДМСО (нижняя) и положительного контроля с 1 мкМ нокодазола (верхняя). в) Данные микроскопии фазового контраста о задержке митоза раковых клеток разных линий в присутствии кумарина-30 и нокодазола (положительный контроль).

3.4.3. Кумарин-30 связывается с растворённым белком тубулином и конкурирует с колхицином за сайт связывания

Флуоресцентные свойства кумарина-30 были использованы в данной работе чтобы охарактеризовать его связывание с белком тубулином. Было замечено, что пик флуоресценции кумарина-30 увеличивается примерно в 9 раз при добавлении избытка белка тубулина (Рис 31а). Усиление флуоресценции кумарина-30 при связывании с белком тубулином позволило измерить сродство к белку тубулину (Рис. 31б), константа диссоциации оказалась равна порядка 3.2 ± 0.2 мкМ. Когда к раствору кумарина-30 и белка тубулина добавлялось 100 мкМ колхицина, усиление флуоресценции подавлялось (Рис. 31б), что позволяет предположить,

что кумарин-30 конкурирует с колхицином за тот же участок связывания с белком тубулином. В то же время, подавление флуоресценции не наблюдалось при добавлении в раствор 100 мкМ пиронетина, хорошо охарактеризованного лиганда белка тубулина альтернативного сайта [Prota и др., 2016], Рис. 31б. Таким образом, кумарин-30 может быть использован в качестве зонда в анализах с конкуренцией для определения констант диссоциации лигандов, специфически взаимодействующих с колхициновым сайтом белка тубулина.

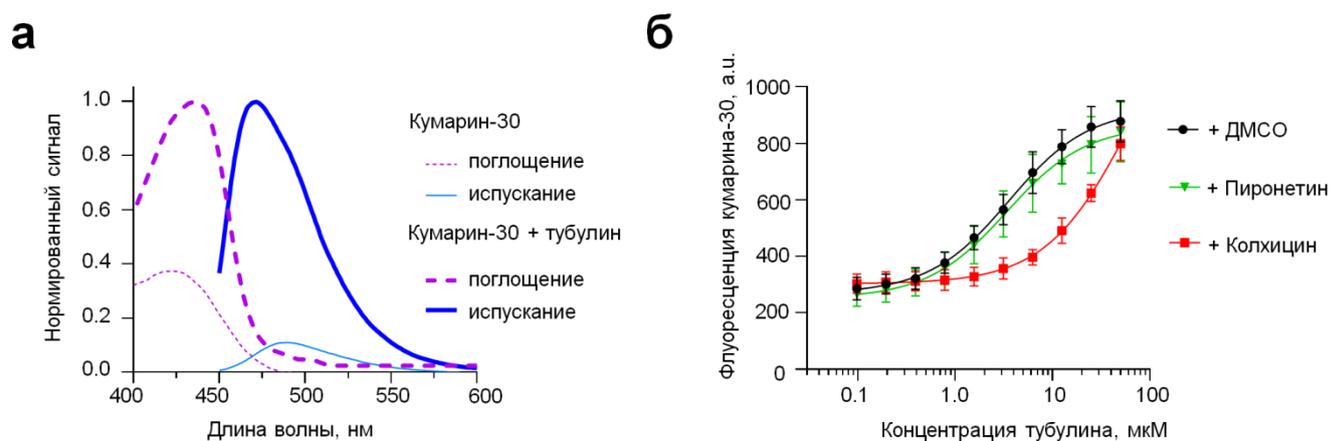


Рис. 31. Свойства кумарина-30. а) Спектры флуоресценции кумарина-30. б) Конкуренция кумарина-30 за колхициновый сайт белка тубулина.

3.4.4. Новый метод скрининга на основе кумарина-30 и микромасштабного термофореза

Высокая яркость, широкая коммерческая доступность и поглощение кумарина-30 в видимом спектре обеспечивают преимущество совместимости этого соединения со многими стандартными методами и инструментами для быстрого скрининга лигандов на предмет их способности связываться с колхициновым сайтом белка тубулина. Исходя из этой идеи, в данной работе был разработан новый метод скрининга на основе кумарина-30 и микротермофореза (Рис. 32а) [Jerabek-Willemsen и др., 2014]. Определение характеристик межмолекулярных взаимодействий с помощью микротермофореза основано на измерении изменения флуоресценции при локальном нагревании раствора,

содержащего флуоресцентные молекулы. Это изменение флуоресценции связано с термодиффузией флуоресцентных молекул, которая может быть изменена, когда флуоресцентная молекула связывается со своим партнером по взаимодействию. Чтобы проверить способность метода обнаруживать связывание кумарина-30 с белком тубулином сначала было выполнено микротермофоретическое измерение кумарина-30 в концентрации 0.75 мкМ в сочетании с бычьим сывороточным альбумином (BSA, используемый в качестве отрицательного контроля) или с белком тубулином в концентрации 400 нМ (Рис. 32б, в). Измерения выявили четкий микротермофоретический сигнал связывания кумарина-30 с белком тубулином, но не с BSA.

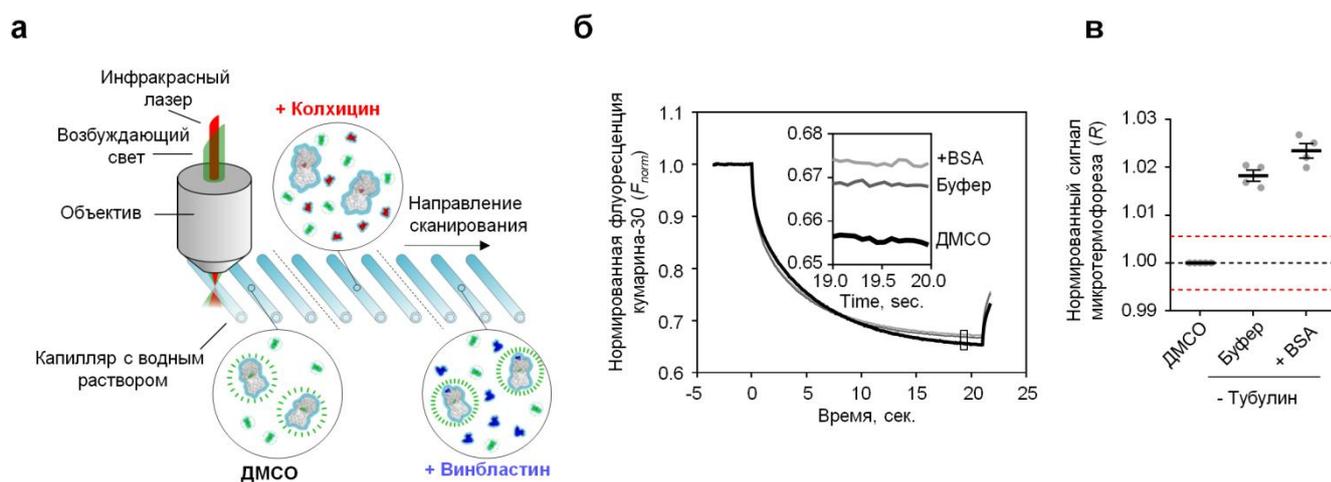


Рис. 32. Новый метод скрининга на основе микротермофореза и флуоресцентного зонда кумарин-30. а) Схема устройства для микротермофореза. б) Примеры микротермофоретических треков. в) Обработанные нормированные сигналы микротермофореза на основе треков б).

3.4.5. Проверка нового метода скрининга на известных лигандах белка тубулина

Затем проведены аналогичные измерения с теми же концентрациями кумарина-30 и белка тубулина в присутствии одного из установленных лигандов белка тубулина, связывающегося либо с колхициновым сайтом: колхицин, нокодазол [Wang и др., 2016], ELR510444 [Lei и др., 2021], подофиллотоксин [Ravelli и др., 2004], комбретастин А-4 [Gaspari и др., 2017], либо с альтернативным сайтом: винбластин [Gigant и др., 2005], пиронетин [Prota и др.,

2016], ансамитоцин Р-3 [Venghateri и др., 2013], [Menchon и др., 2018]; майтанзин [Prota и др., 2014] или природный лиганд белка тубулина, гуанозиндифосфат (ГДФ) (Рис. 33г).

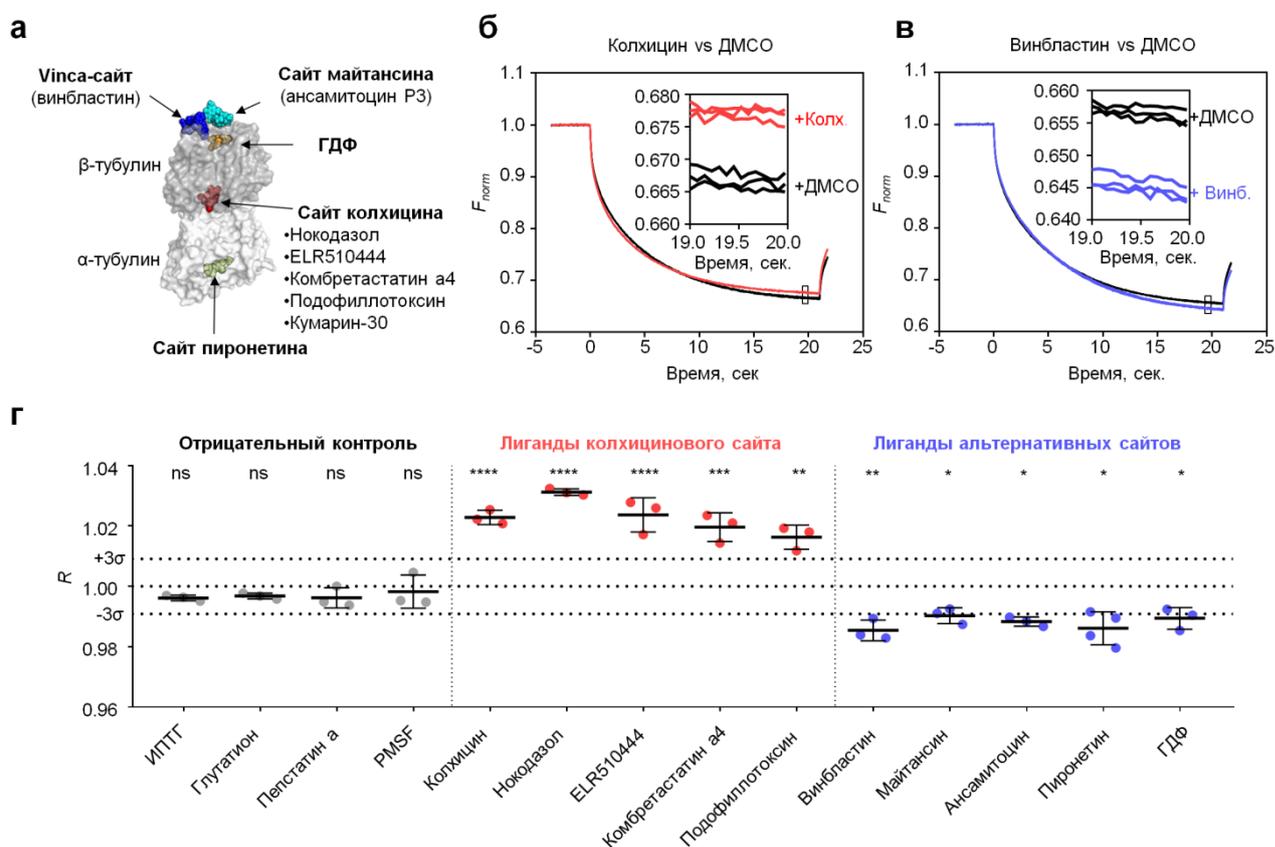


Рис. 33. Проверка нового метода скрининга на выборке известных лиганда белка тубулина. а) Сайты связывания лигандов белка тубулина. б), в) – примеры микротермофлуоресцентных треков для случаев добавления колхицина и винбластина, соответственно. г) Нормированные сигналы микротермофлуоресценции при добавлении веществ отрицательного контроля, лигандов колхицинового и альтернативных сайтов. Статистический анализ представлен Z-тестом для одной выборки (сравнение с 1): ns, отсутствие статистической значимости; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Все лиганды были добавлены в концентрациях, превышающих их ожидаемые константы диссоциации, чтобы обеспечить их связывание со значительной долей молекул белка тубулина. В качестве отрицательного контроля использовалось несколько распространенных лабораторных реагентов (ИПТГ, глутатион, пепстатин а, PMSF), которые, как ожидается, не взаимодействуют с белком тубулином. Наблюдались четко различимые сигналы микротермофлуоресценции для каждого из исследованных ингибиторов полимеризации

белка тубулина, но не для отрицательного контроля (Рис. 33 б-г). Интересно, что лиганды колхицинового сайта демонстрировали сигналы выше контрольного уровня, в то время как все лиганды альтернативных сайтов демонстрировали сигналы ниже контрольного уровня (Рис. 33 б-г).

Таким образом, метод микротермофореза в комбинации с новым флуоресцентным зондом белка тубулина, кумарином-30, подходит для быстрого скрининга химических соединений для определения их способности связываться с белком тубулином с одновременной классификацией соединений на лиганды колхицинового сайта и лиганды других сайтов связывания.

3.4.6. Интерпретация сигналов микротермофореза в новом методе скрининга

В методе микротермофореза при локальном нагревании водного раствора молекулы начинают перемещаться вдоль температурного градиента (с коэффициентом термодиффузии D_T). Этому молекулярному потоку противостоит массовая диффузия (с коэффициентом диффузии D). В стационарном состоянии оба эффекта уравниваются, что приводит к стационарному пространственному распределению концентрации молекул, зависящему от разности температур нагретой и холодной областей и коэффициента Соре S [Duhr, Braun, 2006]:

$$\frac{C}{C_0} = \exp\left(-\frac{D_T}{D}(T - T_0)\right) \quad (3.4.1)$$

здесь C и C_0 локальные концентрации молекул при температуре T и T_0 , соответственно. Коэффициент Соре определяется соотношением потока молекул при термофорезе и обычной диффузии:

$$S = \frac{D_T}{D} \quad (3.4.2)$$

Известно, что размер молекулы и различные параметры её поверхности, такие как заряд и гидрофобность, влияют на коэффициент Соре. Влияние

биомолекулярных параметров на термофоретический эффект в терминах термодинамического описания проведен в [Duhr, Braun, 2006]. Локальное термодинамическое равновесие позволяет получить выражение для коэффициента S_{ore} :

$$S = \frac{D_T}{D} = \frac{1}{kT} \frac{\partial G}{\partial T} = \frac{A}{kT} \left(-s_{hyd} + \frac{\beta \sigma_{eff}^2}{4\epsilon\epsilon_0 T} \lambda_{DH} \right) \quad (3.4.3)$$

здесь A — площадь поверхности молекулы, σ_{eff} — эффективный заряд молекулы, s_{hyd} — энтропия гидратации, λ_{DH} — расстояние экранирования Дебая-Хюккеля, ϵ — диэлектрическая константа, β — температурная производная диэлектрической константы.

Наблюдаемое различие в знаке сигнала микротермофореза для лигандов колхицинового сайта и лигандов альтернативных сайтов по сравнению с контролем может быть результатом различной природы сигналов в этих двух случаях. В случае лигандов колхицинового сайта происходит вытеснение кумарин-30 из белка тубулина, в то время как лиганды альтернативных сайтов связывания влияют непосредственно на микротермофорез комплекса кумарин-30+тубулин. Для описания физического механизма, который определяет получаемую разницу в сигналах сначала запишем выражения для сигналов флуоресценции кумарина-30 в холодной (F_{cold}) и теплой (F_{hot}) областях в простейшем случае, когда исследуемый лиганд не обладает выраженными флуоресцентными свойствами и не влияет на флуоресценцию кумарина-30 напрямую:

$$F_{cold} = I_{cold}^C C_{cold}^C + \alpha I_{cold}^C C_{cold}^{CT} + \beta I_{cold}^C C_{cold}^{CTL} \quad (3.4.4)$$

$$F_{hot} = I_{hot}^C C_{hot}^C + \alpha I_{hot}^C C_{hot}^{CT} + \beta I_{hot}^C C_{hot}^{CTL} \quad (3.4.5)$$

Здесь введены обозначения:

I^C, I^{CT}, I^{CTL} — интенсивности флуоресценции отдельной молекулы кумарина-30 и комплексов кумарин-30+тубулин, кумарин-30+тубулин+лиганд, соответственно.

C^C, C^{CT}, C^{CTL} — концентрации кумарина-30 и комплексов кумарин-30+тубулин, кумарин-30+тубулин+лиганд, соответственно.

α — изменение флуоресценции одной молекулы кумарина-30 при образовании комплекса кумарин-30+тубулин.

β — изменение флуоресценции одной молекулы кумарина-30 при образовании комплекса кумарин-30+тубулин+лиганд.

Флуоресценция кумарина-30 при облучении его светом с длиной волны 460-480 нм (используемый диапазон в приборе для микротермофореза Monolith NT.115) возрастает в несколько раз (Рис. 31а). Для простоты будем считать, что при нагревании (порядка нескольких К) отношение флуоресценции кумарина-30, связанного с белком тубулином, к флуоресценции свободного кумарина не меняется:

$$\alpha = \frac{I_{cold}^{CT}}{I_{cold}^C} = \frac{I_{hot}^{CT}}{I_{hot}^C} \quad (3.4.6)$$

$$\beta = \frac{I_{cold}^{CTL}}{I_{cold}^C} = \frac{I_{hot}^{CTL}}{I_{hot}^C} \quad (3.4.7)$$

Сигнал микротермофореза по определению задаётся соотношением:

$$F_{norm} = \frac{F_{hot}}{F_{cold}} \quad (3.4.8)$$

Используемый в данной работе нормированный «ответ» сигнала микротермофореза (по отношению к контрольному случаю с ДМСО) выражается следующим образом:

$$R = \frac{F_{norm}^{ligand}}{F_{norm}^{DMSO}} = \frac{F_{hot}^{ligand}}{F_{cold}^{ligand}} \frac{F_{cold}^{DMSO}}{F_{hot}^{DMSO}} \quad (3.4.9)$$

Теперь рассмотрим два случая, когда исследуемый лиганд связывается с колхициновым сайтом белка тубулина или с альтернативным сайтом.

Лиганд колхицинового сайта. В предельном случае избыток лиганда занимает все доступные сайты связывания, в результате чего кумарин-30 полностью вытесняется им и находится только в свободном виде, а члены I^{CTL} и C^{CTL} равны нулю. В эксперименте получается сигнал R больше единицы (Рис. 33б, г), то есть:

$$R = \frac{F_{hot}^{ligand}}{F_{cold}^{ligand}} \frac{F_{cold}^{DMSO}}{F_{hot}^{DMSO}} > 1 \quad (3.4.10)$$

С учётом (3.4.4), (3.4.5) это эквивалентно выражению:

$$\begin{aligned} \frac{I_{hot}^C C_{hot}^C}{I_{cold}^C C_{cold}^C} \frac{I_{cold}^C C_{cold}^C + \alpha I_{cold}^C C_{cold}^{CT}}{I_{hot}^C C_{hot}^C + \alpha I_{hot}^C C_{hot}^{CT}} &> 1 \\ \frac{1 + \frac{\alpha C_{cold}^{CT}}{C_{cold}^C}}{1 + \frac{\alpha C_{hot}^{CT}}{C_{hot}^C}} &> 1 \\ \frac{C_{cold}^{CT}}{C_{cold}^C} &> \frac{C_{hot}^{CT}}{C_{hot}^C} \\ \frac{C_{hot}^C}{C_{cold}^C} &> \frac{C_{hot}^{CT}}{C_{cold}^{CT}} \end{aligned} \quad (3.4.11)$$

С учётом (3.4.1) можно переписать неравенство (3.4.11) следующим образом:

$$\exp(-S^C \Delta T) > \exp(-S^{CT} \Delta T) \quad (3.4.12)$$

здесь $\Delta T = T - T_0$

Поэтому коэффициенты $Sore$ для кумарина-30 и комплекса кумарин-30+тубулин должны соотноситься следующим образом:

$$S^C < S^{CT} \quad (3.4.13)$$

В работе [Duhr, Braun, 2006] показано, что коэффициент S_{ore} пропорционален площади поверхности частицы с характерным размером a :

$$S_T \propto \frac{\partial G}{\partial T} \propto a^2 \quad (3.4.14)$$

Имея в виду, что площадь поверхности для свободной молекулы кумарина-30 значительно меньше площади поверхности для комплекса кумарин-30+тубулин получаем, что (3.4.10) справедливо.

Лиганд альтернативного сайта. В предельном случае избыток лиганда занимает все доступные сайты связывания, в результате чего все молекулы белка тубулина (в том числе, образующие комплекс кумарин-30+тубулин) связываются с лигандом альтернативного сайта. В эксперименте получается сигнал R меньше единицы (Рис. 33в, г), то есть:

$$R = \frac{F_{hot}^{ligand}}{F_{cold}^{ligand}} \frac{F_{cold}^{DMSO}}{F_{hot}^{DMSO}} < 1 \quad (3.4.15)$$

С учётом (3.4.4), (3.4.5) это эквивалентно выражению:

$$\frac{I_{hot}^C C_{hot}^C + I_{hot}^{CTL} C_{hot}^{CTL}}{I_{cold}^C C_{cold}^C + I_{cold}^{CTL} C_{cold}^{CTL}} \frac{I_{cold}^C C_{cold}^C + \alpha I_{cold}^C C_{cold}^{CT}}{I_{hot}^C C_{hot}^C + \alpha I_{hot}^C C_{hot}^{CT}} < 1$$

$$\alpha \left(\frac{C_{cold}^{CT}}{C_{cold}^C} - \frac{C_{hot}^{CT}}{C_{hot}^C} \right) + \beta \left(\frac{C_{hot}^{CTL}}{C_{hot}^C} - \frac{C_{cold}^{CTL}}{C_{cold}^C} \right) + \alpha\beta \left(\frac{C_{hot}^{CTL}}{C_{hot}^C} \frac{C_{cold}^{CT}}{C_{cold}^C} - \frac{C_{cold}^{CTL}}{C_{cold}^C} \frac{C_{hot}^{CT}}{C_{hot}^C} \right) < 0 \quad (3.4.16)$$

Перепишем неравенство (3.4.16) в терминах коэффициентов S_{ore} с учетом (3.4.1):

$$\alpha(e^{-S^C \Delta T} - e^{-S^{CT} \Delta T}) + \beta(e^{-S^{CTL} \Delta T} - e^{-S^C \Delta T}) +$$

$$+ \alpha\beta \frac{C_{cold}^{CTL}}{C_{cold}^C} (e^{-S^{CTL} \Delta T} - e^{-S^{CT} \Delta T}) < 0$$

ИЛИ

$$\alpha(e^{-S^C \Delta T} - e^{-S^{CT} \Delta T}) - \beta(e^{-S^C \Delta T} - e^{-S^{CTL} \Delta T}) +$$

$$+ \alpha\beta \frac{C_{cold}^{CTL}}{C_{cold}^C} (e^{-S^{CTL} \Delta T} - e^{-S^C \Delta T}) < 0 \quad (3.4.17)$$

Первой слагаемое, согласно (3.4.12), положительно. Знак второго слагаемого определяется соотношением коэффициентов S_{ore} для свободного кумарина-30 и комплекса кумарин-30+тубулин+лиганд, поэтому, по аналогии с (3.4.13), он отрицательный. В свою очередь, знак третьего слагаемого и соотношения абсолютных величин второго и первого слагаемых могут быть оценены из следующих соображений. Исследуемые лиганды являются незаряженными, и при их взаимодействии с альтернативными сайтами белка тубулина может поменяться энтропия гидратации, поскольку молекулы воды на поверхности белка в таком случае высвобождаются или перестраиваются. В итоге, это соответствует иммобилизации большего числа молекул воды на поверхности белка, отрицательной энтропии гидратации s_{hyd} , входящей в формулу (3.4.3), и большим значениям её абсолютной величины. Схематически это отображено на Рис. 32а, где для каждой молекулы в растворе показана гидратная оболочка синей обводкой. Так как энтропия гидратации входит в выражение (3.4.3) со знаком минус, это приводит к увеличению коэффициента S_{ore} при связывании лиганда альтернативного сайта с комплексом кумарин-30+тубулин. Итого, получаем:

$$S^C < S^{CT} < S^{CTL} \quad (3.4.18)$$

Поэтому знак третьего слагаемого отрицательный. Знак суммы первого и второго слагаемых определяется соотношением α и β . Флуоресценция кумарина-30 сильно зависит от окружения [Das и др., 2021], а уменьшение энтропии гидратации комплекса кумарин-30+тубулин при связывании с ним лиганда альтернативного сайта подразумевает уменьшение числа степеней свободы молекул воды, окружающих кумарин-30 в составе белка тубулина. Это может приводить к увеличению флуоресценции кумарина-30 в комплексе с белком тубулином при его связывании с лигандом альтернативного сайта, что было частично экспериментально подтверждено в данной работе по измерениям

сигналов начальной флуоресценции при проверке метода скрининга на выборке известных лигандов белка тубулина (Рис. 34).

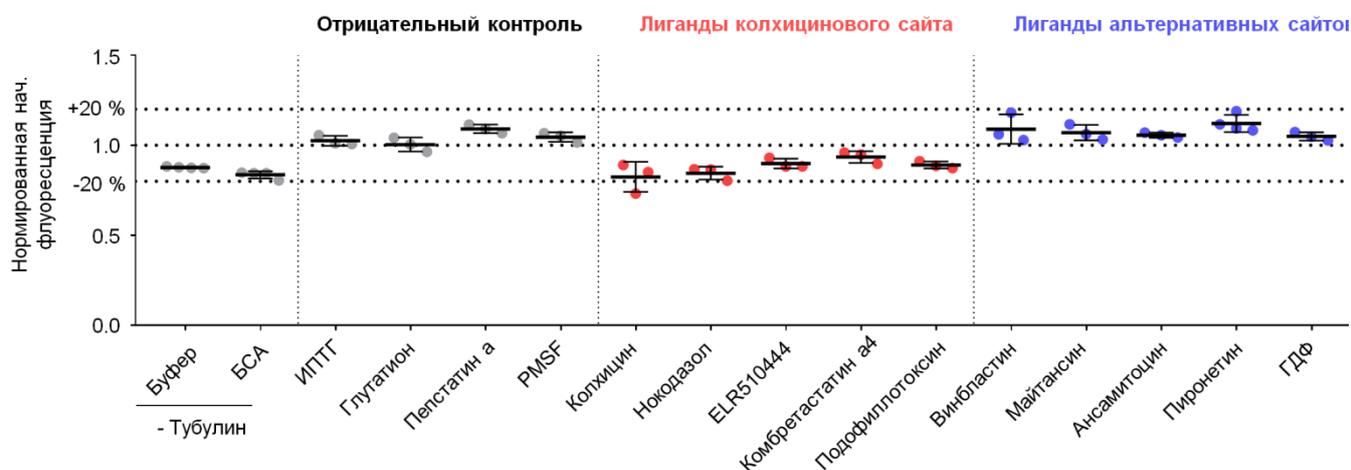


Рис. 34. Нормированные сигналы начальной флуоресценции кумарина-30 в присутствии белка тубулина и известных лигандов.

Поэтому получаем соотношение $\alpha < \beta$, откуда следует, что сумма первого и второго слагаемых в левой части неравенства (3.4.17) имеет отрицательный знак, и все неравенство (3.4.15) справедливо.

3.4.7. Определение новых лигандов белка тубулина

Новый метод скрининга на основе флуоресцентного зонда кумарина-30 и микротермофореза был применён для поиска новых лигандов белка тубулина среди четырех групп соединений: 1) соединения 1a-p, 2a-d и 3a-c, которые были частично охарактеризованы ранее как ингибиторы динамики микротрубочек *in vitro* и внутри клеток (Рис. 35а, [Anisimov и др., 2024]); 2) потенциальные колхицин-подобные ингибиторы белка тубулина, сс-1 – сс-4, найденные с помощью алгоритма COMPARE (Рис. 35б, подробнее в параграфе 2.3.1); 3) новые вещества-структурные аналоги сс-4 (Рис. 35в); 4) потенциальные аналоги вещества гризеофульвин, гс-1 и гс-2, найденные с помощью алгоритма COMPARE (Рис. 35г, подробнее в параграфе 2.3.1). Синтез и очистка веществ 1a-

р, 2а-d, 3а-с, сс-4 и 4а-е выполнены в группе в.н.с. химического факультета МГУ, Ольги Александровны Ивановой.

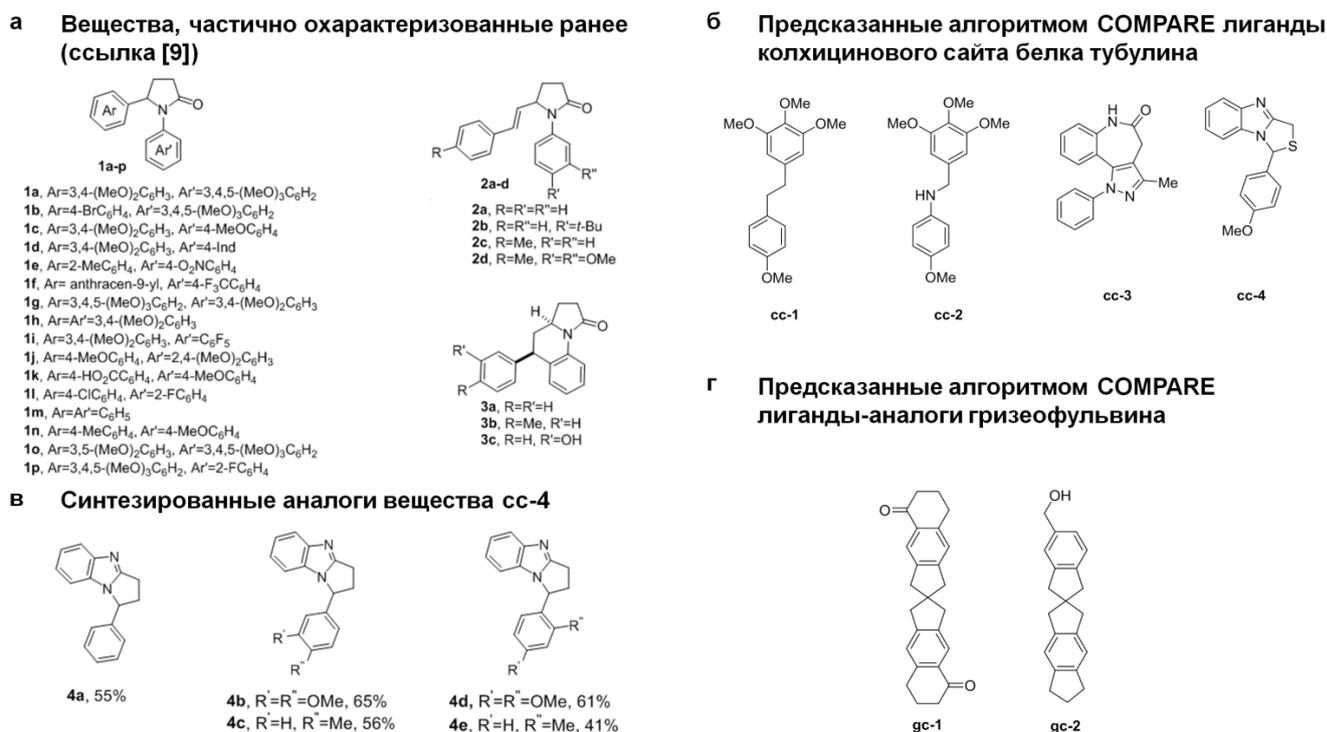


Рис. 35. Структуры веществ-потенциальных лигандов белка тубулина. а) Частично охарактеризованные ранее ([Anisimov и др., 2024]). б) Потенциальные колхицин-подобные ингибиторы белка тубулина, найденные с помощью алгоритма COMPARE. в) Новые вещества-структурные аналоги сс-4. г) Потенциальные аналоги вещества гризеофульвин, найденные с помощью алгоритма COMPARE.

Среди указанных соединений десять демонстрируют четкий сигнал связывания с белком тубулином, позволяющий классифицировать их как лиганды колхицинового сайта (Рис. 36). Два из них (сс-1 и сс-2) являются структурными аналогами комбретастатина А-4 и были частично описаны ранее ([Cushman и др., 1992] и патенты WO-9323357-A1, US-5430062-A, EP-0641301-A1), два других (сс-3, сс-4), как и аналоги вещества сс-4 4а-е, ранее не изучались. С использованием экспериментальной постановки с титровкой белка тубулина при постоянной концентрации кумарина-30 и исследуемого лиганда, было подтверждено, что соединения сс-3, сс-4 и 4с конкурируют с комарином-30 за место связывания, подтверждая их классификацию как лигандов колхицинового сайта белка тубулина (Рис. 37а).

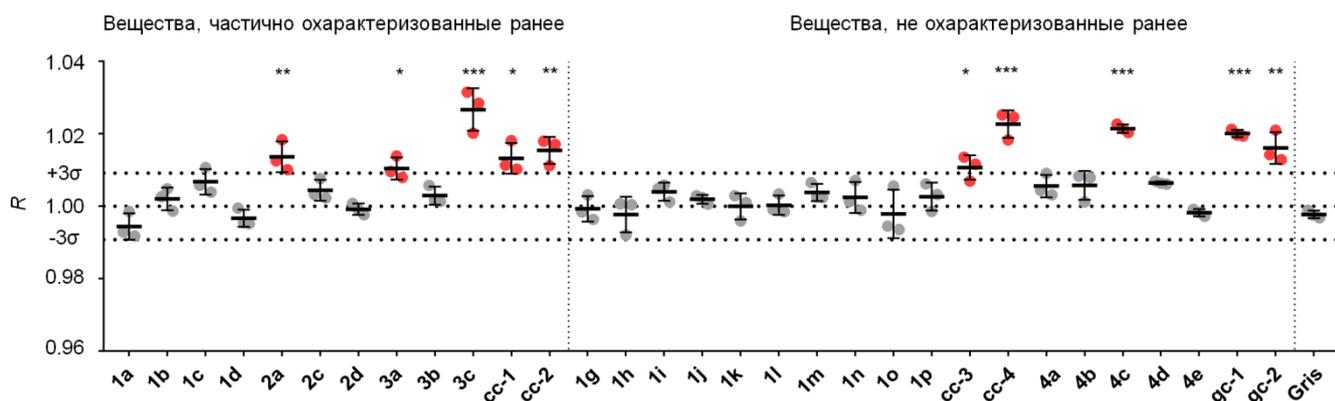


Рис. 36. Новый метод скрининга позволил обнаружить 10 лигандов колхицинового сайта (отмечены красным), 5 из которых новые и ранее не охарактеризованные (сс-3, сс-4, 4с, gc-1, gc-2). Звездочками обозначена статистическая значимость отличий от 1. Статистический анализ представлен Z-тестом для одной выборки (сравнение с 1): «», отсутствие статистической значимости; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

В поисках возможных лигандов альтернативных сайтов белка тубулина с помощью алгоритма COMPARE составлен список 100 соединений из базы данных NCI по корреляции с веществом гризеофульвин. Список составлялся по аналогии со случаем использования колхицина как «пробного» вещества (параграф 2.3.1.), но вместо него был выбран гризеофульвин как противогрибковый препарат, который, как известно, связывается с белком тубулином с низким сродством ($K_D \sim 80 \text{ мкМ}$) за пределами колхицинового сайта [Ray Chaudhuri, Ludueña, 1996]. В этом списке выбраны два спиросоединения, коррелирующие с гризеофульвином (названные в данной работе gc-1 и gc-2), которые занимают 15-е и 97-е места в списке, соответственно, и имеют относительно низкие средние значения GI_{50} (4 и 1.6 мкМ , соответственно). Оказалось, что спиросоединения gc-1 и gc-2 взаимодействуют с колхициновым сайтом белка тубулина (Рис. 36), несмотря на то, что они имеют структуры, отличные от известных лигандов колхицинового сайта. Следует отметить, что сигнал связывания самого гризеофульвина выходил за пределы чувствительности проведённого скрининга с использованием кумарин-30 и микротермофореза, что согласуется со значительно более высоким сродством соединений gc-1 и gc-2 к связыванию с белком тубулином (Рис. 36).

3.4.8. Проверка эффектов отобранных веществ *in vitro* и на клеточных культурах

Чтобы лучше охарактеризовать найденные в данной работе новые лиганды колхицинового сайта белка тубулина, изучалась способность веществ *сс-3*, *сс-4*, *4с*, *гс-1* и *гс-2* вытеснять кумарин-30 из колхицинового сайта белка тубулина, их воздействие на динамику микротрубочек *in vitro* с помощью DIC микроскопии и на раковые клетки (Рис. 37). Оказалось, что все указанные вещества действительно вытесняют кумарин-30 из его сайта связывания (с константой диссоциации, K_D , в диапазоне от 23 ± 2 до 30 ± 2 мкМ), в то время как невзаимодействующие с белком тубулином соединения, такие как *4е*, не проявляют конкуренции с кумарином-30 за связывание с белком тубулином (Рис. 37а). Все найденные соединения эффективно снижают скорость роста микротрубочек примерно на 50% и оказывают статистически значимое влияние на частоту катастроф микротрубочек при добавлении в смесь для полимеризации белка тубулина в концентрациях 5-10 мкМ (Рис. 37б). Кроме того, каждое из веществ приводит к задержке клеток А549 в митозе, о чем свидетельствуют результаты, полученные с помощью проточной цитометрии и анализа клеточного цикла с использованием пропидия йодида (Рис. 37в). Значения IC_{50} для этих соединений варьируются от 0.7 до 8.7 мкМ, что делает их перспективными ингибиторами динамики микротрубочек.

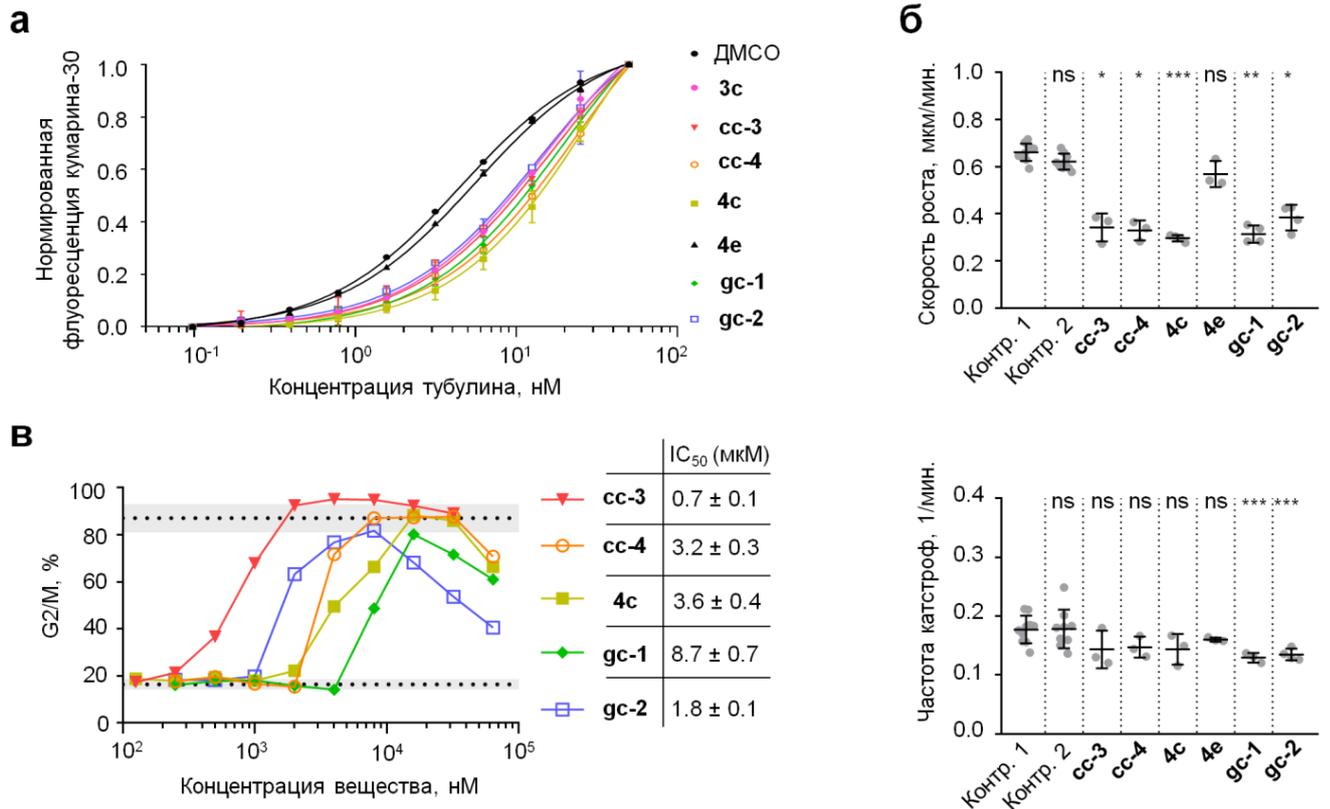


Рис. 37. Эффекты веществ, отобранных новым методом скрининга, на микротрубочки *in vitro* и на раковые клетки. а) Определение сайта связывания новых лигандов по конкуренции с кумарином-30. Титровочные кривые нормированы на своё максимальное значение и сдвинуты по оси ординат на величину, равную своему минимальному значению. б) Скорости роста и частоты катастроф микротрубочек. Статистический анализ представлен двусторонним непарным t-тестом с поправкой Уэлча: ns, отсутствие статистической значимости; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. в) Измерение доли клеток в популяции, находящихся в фазе G2/M, в зависимости от концентрации указанных веществ на основе измерения распределения содержания ДНК с помощью проточной цитометрии. Пунктирные линии с SD соответствуют уровням для контроля с ДМСО (нижняя) и положительного контроля с 1 мкМ нокадазола (верхняя).

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной диссертационной работе проанализированы молекулярные механизмы динамической нестабильности микротрубочек, принципы её регуляции, и разработаны новые подходы к поиску ингибиторов этого процесса и найдены новые низкомолекулярные ингибиторы полимеризации белка тубулина. Динамическая нестабильность, впервые наблюдаемая в работе [Mitchison, Kirschner, 1984], позволяет микротрубочкам выполнять важнейшие функции внутри клетки. Спонтанные переключения между фазами роста и укорочения микротрубочек составляют суть динамической нестабильности. Внутри клетки поведение микротрубочек четко регулируется для выполнения многочисленных функций, включающих поиск, захват и сегрегацию хромосом во время клеточного деления [Gudimchuk, McIntosh, 2021]. Использование низкомолекулярных веществ-ингибиторов динамической нестабильности позволяет бороться с раковыми клетками за счет подавления их быстрого деления [Jordan, Wilson, 2004].

Теоретические представления о механизме динамической нестабильности основываются на преобразованиях энергии гидролиза ГТФ. Известно, что за счет этого процесса меняются механические свойства молекул белка тубулина, и их нахождение в решетке микротрубочки становится невыгодным с термодинамической точки зрения [Gudimchuk и др., 2020]. Считается, что баланс между гидролизом ГТФ и динамическими процессами присоединения-отсоединения молекул белка тубулина на концах микротрубочки приводят к образованию так называемой ГТФ-шапки, которая способна стабилизировать всю решетку микротрубочки. Эта теория хорошо описывает переключения микротрубочек с фазы сборки на фазу разборки во время так называемых катастроф. Для их возникновения ГТФ-шапка должна быть нарушена, тогда микротрубочка быстро разбирается. В то же время, способность микротрубочек внутри клетки и *in vitro* внезапно прервать быструю разборку и возобновить свой рост во время так называемых спасений долгое время оставалась необъясненной.

В данной работе определялась роль структурных дефектов решетки микротрубочек в механизме спасений, то есть переключений от разборки к сборке. Рассмотрение данного вопроса основано на растущем объеме современных структурных данных о том, что регулярная решетка микротрубочек может обладать дефектами, а динамические процессы присоединения-отсоединения молекул белка тубулина могут происходить не только на концах, но и в решетке микротрубочки [Aumeier и др., 2016], [Schaedel и др., 2015], [Schaedel и др., 2019], [Debs и др., 2020], [Guyomar и др., 2022]. Тщательное рассмотрение данного вопроса потребовало создание новой экспериментальной *in vitro* методики, с помощью которой впервые удалось наблюдать динамику микротрубочек вдали от поверхности покровного стекла в отсутствие его деформирующего воздействия. По сравнению со случаем использования классической экспериментальной методики наблюдалось значительное снижение пространственной частоты встраивания ГТФ-тубулина из раствора в решетку микротрубочек почти на порядок с 0.12 ± 0.02 до 0.020 ± 0.005 мкм⁻¹. Частота спасений микротрубочек также значительно снизилась с 1.7 ± 0.6 до 0.5 ± 0.2 мин⁻¹. Эти результаты, полученные в данной работе, являются свидетельством ключевой роли факторов, которые приводят к дефектам решетки микротрубочек, и динамических процессов в местах дефектов для возникновения спасений.

Созданная в данной работе новая методика позволила изучить регуляцию спасений микротрубочек низкомолекулярными ингибиторами динамики, паклитакселом и винбластином, и белком EB1, одним из основных естественных внутриклеточных регуляторов динамики. Опубликованные в работе [Mohan и др., 2013] данные о том, что комбинация белков семейства EB и паклитаксела приводит к частым спасениям микротрубочек оказалась справедливой именно для случая классической экспериментальной методики. В случае использования новой экспериментальной методики, в которой микротрубочки растут от микропьедесталов, белок EB1 и паклитаксел не способны привести к частым спасениям, по крайней мере, при концентрациях, в которых они вызывают частые

спасения при использовании классической экспериментальной методики. Учитывая, что паклитаксел способен аккумулироваться в местах дефектов решетки микротрубочек [Rai и др., 2021], [Rai и др., 2020] и вызывать спасения микротрубочек в этих местах, использование новой экспериментальной методики подтверждает как представления о механизме спасений за счет дефектов решетки микротрубочек и динамических процессов в них, так и механизм регуляции спасений паклитакселем. Эти данные дополнительно подтверждаются тем, что частые спасения микротрубочек наблюдались при комбинации EB1, паклитаксела и вещества винбластин, которое нарушает полимеризацию микротрубочки и приводит к дефектам её решетки.

За последние пару десятилетий *in vitro* исследований были разработаны довольно сложные протоколы очистки, гидрофобизации и пассивации покровных стекол для проточных камер микроскопии, которые значительно улучшают качество изображения при проведении, в том числе, одномолекулярных экспериментов. Однако результаты данной работы показывают, что даже такая современная обработка покровного стекла, как, например, представленная в работе [Helenius и др., 2006], в сочетании с максимальными усилиями по исключению из анализа микротрубочек с любыми признаками неспецифической адгезии к покровному стеклу, может оказаться недостаточной, чтобы гарантировать отсутствие влияния покровного стекла на динамику микротрубочек. Поэтому присутствие покровного стекла в случае классической экспериментальной методики может быть скрытой причиной плохой воспроизводимости в определенных типах исследований, таких как исследования спасения микротрубочек и взаимодействия микротрубочек с регуляторными молекулами. Можно надеяться, что разработанная в данной работе новая экспериментальная методика с использованием микропъедесталов может стать полезной альтернативой традиционному анализу для такого рода исследований. Новая экспериментальная методика создает искусственную ситуацию, когда подвешенные микротрубочки растут изолированно от любых других объектов,

что, безусловно, далеко от физиологических условий роста микротрубочек в плотной клеточной среде. Однако это обеспечивает возможность проведения наблюдений в более контролируемых условиях, что необходимо для исследования роли влияния различных факторов на исследуемый процесс.

Задача поиска новых регуляторов динамики микротрубочек с целью разработки эффективных противоопухолевых препаратов решена в данной работе с помощью создания нового метода скрининга. Для этого в библиотеке веществ NCI были отобраны потенциальные аналоги хорошо известного ингибитора динамики микротрубочек, вещества колхицин, с целью найти более подходящие по сравнению с ним соединения для химиотерапии. Среди этих веществ был обнаружен известный флуорофор, лазерный краситель, кумарин-30. Его способность подавлять динамику микротрубочек за счет связывания с колхициновым сайтом белка тубулина была впервые охарактеризована в данной работе. Это свойство в сочетании с ярко выраженной флуоресценцией в видимом диапазоне длин волн открыло кумарин-30 для данной области не только как эффективный ингибитор динамики микротрубочек, но и как новый флуоресцентный зонд белка тубулина. Использование кумарин-30 в экспериментах с конкуренцией вместе с исследуемыми лигандами за колхициновый сайт основано на усилении флуоресценции кумарина-30 при его связывании с белком тубулином. Эта особенность, в основе которой, вероятно, лежит гидрофобный характер связей между кумарином-30 и белком тубулином, присуща многим известным флуоресцентным зондам колхицинового сайта [Zhu и др.,], [Suzuki,], [Bhattacharyya, Wolff, 1974], [Fitzgerald, 1976], [Peurot и др.,], [Das и др.,]. Однако оригинальность метода скрининга с использованием кумарина-30, разработанного в данной работе, проявляется в сочетании с методом микротермофореза [Jerabek-Willemsen и др., 2014]. Экспериментальные и теоретические исследования, проведённые в данной работе, показывают, что созданный метод позволяет наблюдать различие в знаке сигнала микротермофореза для лигандов колхицинового сайта и лигандов альтернативных

сайтов по сравнению с контролем. Эта особенность может быть результатом различной природы сигналов в этих двух случаях. В случае лигандов колхицинового сайта происходит вытеснение кумарина-30 из белка тубулина, в то время как лиганды альтернативных сайтов связывания влияют непосредственно на микротермофрез комплекса кумарин-30+тубулин. Поэтому разработанный в данной работе метод не имеет известных аналогов для целей быстрого и эффективного скрининга лигандов белка тубулина с их одновременной классификацией на лиганды колхицинового сайта и лиганды альтернативных сайтов. В данной работе с его помощью определены новые лиганды белка тубулина, связывающиеся с колхициновым сайтом и подавляющие деление раковых клеток с IC_{50} в диапазоне от 0.7 до 8.7 мкМ.

Следует также отметить, что флуоресцентные низкомолекулярные лиганды белка тубулина могут служить ценными инструментами для фундаментальных биофизических исследований. Например, флуоресцентные аналоги эрибулина и паклитаксела уже использовались для изучения новых свойств решетки микротрубочек и их динамических концов [Doodhi и др., 2016], [Rai и др., 2020], [Rai и др., 2019]. Аллоколхицин, который связывается с изогнутыми димерами белка тубулина, был использован для исследования конформации молекул белка тубулина в растворе [Rice, Montabana, Agard, 2008]. Фотоактивируемые аналоги паклитаксела и комбретастатина были использованы для локальной стабилизации или разборки тубулинового цитоскелета в клетках под воздействием света с целью изучения роли микротрубочек в различных клеточных процессах [Bogowiak и др., 2015], [Müller-Deku и др., 2020]. Можно предполагать, что кумарин-30 пополнит арсенал доступных инструментов для фундаментальных исследований, например, для изучения конформации концов микротрубочек и дальнейшей визуализации ее взаимосвязи с динамикой микротрубочек.

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В данной диссертационной работе с помощью экспериментальных и теоретических методов исследованы молекулярные механизмы динамики микротрубочек, принципы ее регуляции; с помощью разработанного подхода обнаружены новые ингибиторы полимеризации белка тубулина:

1. Разработана новая экспериментальная методика для исследования динамики микротрубочек и особенностей строения их решетки вдали от поверхности покровного стекла, которая обеспечивает формирование микротрубочек с более регулярной решеткой. С ее помощью обнаружено, что встраивание ГТФ-тубулина в места структурных дефектов решетки микротрубочек является основной причиной их переключений от разборки к сборке. Микротрубочки, полимеризованные с более регулярной решеткой, благодаря использованию метода микропьедесталов, характеризуются почти на порядок меньшей пространственной частотой встраивания ГТФ-тубулина из раствора в решетку: частота снижена с 0.12 ± 0.02 до 0.020 ± 0.005 мкм⁻¹; частота спасений микротрубочек с регулярной решеткой также значительно снижена с 1.7 ± 0.6 до 0.5 ± 0.2 мин⁻¹.

2. Обнаружено, что низкомолекулярные ингибиторы динамики микротрубочек, паклитаксел и винбластин, могут модулировать частоту спасений, способствуя образованию структурных дефектов решетки микротрубочки и/или более эффективно проникая через них.

3. Показано, что использование кумарина-30 в качестве флуоресцентного зонда для белка тубулина позволяет обнаруживать взаимодействие данного белка с низкомолекулярными лигандами и проводить классификацию их по сайту связывания на основе измеряемых параметров микротермодинамических кривых. С помощью разработанной методики обнаружены новые ингибиторы динамики микротрубочек, связывающиеся с колхициновым сайтом белка тубулина с константой диссоциации, K_D , в диапазоне от 22 ± 1 до 37 ± 2 мкМ и константой полумаксимального ингибирования деления раковых клеток, IC_{50} , в диапазоне от 0.7 до 8.7 мкМ.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах из перечня ВАК и индексируемых в базах Web of Science, Scopus, RSCI:

1. **М. Anisimov**, A. Korshunova, V. Popov, N. Gudimchuk. Microtubule rescue control by drugs and MAPs examined with in vitro pedestal assay // Eur. J. Cell Biol. Т. 102. № 4. С. 151366. 0.5625/0.4523 печ. листа. Импакт-фактор 4.5 (WoS JIF, за 2 года). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151366> (Вклад М.Н. Анисимова основной, он предложил идею исследования, провёл основные эксперименты, их обработку и анализ полученных результатов).
2. V. Alexandrova, **М. Anisimov**, A. Zaitsev, V. Mustyatsa, V. Popov, F. Ataullakhanov and N. Gudimchuk. Theory of tip structure-dependent microtubule catastrophes and damage-induced microtubule rescues // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2022. Т. 119. № 46. С. e2208294119. 0.625/0.321 печ. листа. Импакт-фактор 9.4 (WoS JIF, за 2 года). DOI: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2208294119> (Вклад М.Н. Анисимова один из основных, он провёл основные эксперименты, их обработку и анализ полученных результатов).
3. Vartanova A., Plodukhin A., Ratmanova N., Andreev I., **Anisimov M.**, Gudimchuk N., Rybakov V., Levina I., Ivanova O., Trushkov I., Alabugin I. Expanding Stereoelectronic Limits of *endo - tet* Cyclizations: Synthesis of Benz[*b*]azepines from Donor–Acceptor Cyclopropanes // J. Am. Chem. Soc. 2021. Т. 143. № 34. С. 13952–13961. 0.625/0.123 печ. листа. Импакт-фактор 14.4 (WoS JIF, за 2 года). DOI: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.1c07088> (Вклад М.Н. Анисимова состоит в проведении экспериментов и обработке данных о регуляции динамики микротрубочек низкомолекулярными веществами и анализе полученных результатов).

Статьи, опубликованные в прочих научных журналах и изданиях:

1. **Anisimov M.** Approaches to visualize microtubule dynamics in vitro // *Systems Biology and Physiology Reports*. – 2022. – Т. 1. – №. 6. – С. 1-16. 1.0/1.0 печ. лист. DOI: <https://doi.org/10.52455/sbpr.01.202206011>

2. **Анисимов М. Н.,** Гудимчук Н. Б. «Зоопарк» ингибиторов динамики микротрубочек, «Природа» // *Priroda*. 2020. № 8. С. 3–12. 0.625/0.601 печ. лист. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0032874X20080013> (Импакт фактор РИНЦ: 0.2).

Публикации в материалах конференций, индексируемых в Web of Science, Scopus:

1. **Anisimov M.N.,** Romanov A.N., Borzunova I.N., Janibekova M.O., Kechko O.I., Mitkevich V.A., Vorobyev I.A., Gudimchuk N.B. Coumarin-based inhibitors of microtubule dynamic instability targeting the colchicine site of tubulin. The 7th Congress of Biophysicists of Russia - conference proceedings: Abstracts // *Biophys Rev*. 2023. Т. 15. № 5. С. 1425–1861. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12551-023-01150-w>

2. **Анисимов М.Н.,** Романов А.Н., Митькевич В.А., Гудимчук Н.Б. Исследование нового колхицин-подобного ингибитора тубулина // *Цитология*. – 2022. – Т. 64. – №. 7. DOI: 10.31857/S004137712207001X

3. **Anisimov M.,** Gudimchuk N. "In vitro study of the microtubule rescue mechanism". 13th EBSA congress, July 24–28, 2021, Vienna, Austria (*European Biophysics Journal*), P-250. DOI: 10.1007/s00249-021 01558-w, <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00249-021-01558-w>.

4. Alexandrova V.V., **Anisimov M.N.,** Gudimchuk N.B. Insights into the mechanisms of microtubule catastrophe and rescue from computational modeling and in

vitro reconstitution experiments // 2021 ASCB Annual Meeting abstracts, Molecular Biology of the Cell. –2021. – Т. 32. – №. 22. DOI: 10.1091/mbc.E21-11-0545.

Публикации в материалах конференций, индексируемых в РИНЦ:

1. **Анисимов М.** Изучение механизма спасений микротрубочек // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2022» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2022. ISBN 978-5-317-06824-0

Список конференций, на которых были доложены результаты исследования:

1. VI Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2024», Нижний Новгород, Россия, 1-4 июля 2024. **Анисимов М.Н.**, Гудимчук Н.Б. Метод микрорельефной поверхности: новый *in vitro* подход к исследованию антитубулиновых препаратов (стендовый).

2. VI Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2024», Нижний Новгород, Россия, 1-4 июля 2024. Гудимчук Н.Б., **Анисимов М.Н.**, Лифшиц И.А., Бойченко М.А., Плодухин А. Ю., Шорохов В. В., Ратманова Н.К., Андреев И.А., Иванова О.А., Трушков И.В. Разработка и сравнение *in vitro* подходов для поиска новых низкомолекулярных лигандов тубулина (стендовый).

3. VII Съезд биофизиков России, Краснодар, Россия, 17-23 апреля 2023. **Anisimov M.N.**, Romanov A.N., Borzunova I.N., Janibekova M.O., Kechko O.I., Mitkevich V.A., Vorobyev I.A., Gudimchuk N.B. Coumarin-based inhibitors of microtubule dynamic instability targeting the colchicine site of tubulin (устный).

4. VIII Молодёжная Школа-Конференция по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, 10-14 октября 2022. **Анисимов М.Н.**, Романов А.Н., Митькевич В.А., Гудимчук Н.Б. Исследование нового колхицин-подобного ингибитора тубулина (устный).
5. XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2022", Москва, Россия, 11-22 апреля 2022. **Анисимов М.Н.** Изучение механизма спасений микротрубочек (устный).
6. 13th EBSA congress, Vienna, Austria, July 24–28, 2021. **Anisimov M.**, Gudimchuk N. "In vitro study of the microtubule rescue mechanism" (стендовый).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность всем коллегам по лаборатории, в частности, Коршуновой Алёне Викторовне, Вадиму Вадимовичу Мустьяца и проф. Атауллаханову Фазоилу Иноятовичу за помощь и поддержку в освоении новых методик, получении и обсуждении результатов, представленных в данной диссертации, и Лифшицу Илье Андреевичу за помощь в получении и обработке экспериментальных данных. Автор также благодарит своих коллег из дружественных лабораторий Ивановой Ольги Александровны и проф. Трушкова Игоря Викоторовича, Митькевича Владимира Александровича, проф. Воробьёва Ивана Андреевича за возможность использования новых подходов, методов и за совместную работу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aher A. и др. CLASP Suppresses Microtubule Catastrophes through a Single TOG Domain // *Developmental Cell*. 2018. Т. 46. № 1. С. 40- 58.e8.
2. Aher A. и др. CLASP Mediates Microtubule Repair by Restricting Lattice Damage and Regulating Tubulin Incorporation // *Current Biology*. 2020. Т. 30. № 11. С. 2175-2183.e6.
3. Akhmanova A., Steinmetz M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008. Т. 9. № 4. С. 309–322.
4. Akhmanova A., Steinmetz M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015. Т. 16. № 12. С. 711–726.
5. Alushin G. M. и др. High-Resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis // *Cell*. 2014. Т. 157. № 5. С. 1117–1129.
6. Amos L., Hirose K. *Studying the Structure of Microtubules by Electron Microscopy*. , 2007. 65–91 с.
7. Andreu J. M. и др. Interaction of Tubulin with Bifunctional Colchicine Analogues: An Equilibrium Study?
8. Anisimov M. N. и др. Microtubule rescue control by drugs and MAPs examined with in vitro pedestal assay // *European Journal of Cell Biology*. 2023. Т. 102. № 4. С. 151366.
9. Anisimov M. N. и др. Synthesis and evaluation of tetrahydropyrrolo[1,2-a]quinolin-1(2H)-ones as new tubulin polymerization inhibitors // Препринт на ChemRxiv: <https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/6662f395418a5379b04ae157> 2024.

10. Atherton J. и др. Microtubule architecture *in vitro* and in cells revealed by cryo-electron tomography // *Acta Crystallographica Section D*. 2018. Т. 74. № 6. С. 572–584.
11. Aumeier C. и др. Self-repair promotes microtubule rescue // *Nat Cell Biol*. 2016. Т. 18. № 10. С. 1054–1064.
12. Bai R. L. и др. Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data // *Journal of Biological Chemistry*. 1991. Т. 266. № 24. С. 15882–15889.
13. Bane S. и др. Binding to tubulin of the colchicine analog 2-methoxy-5-(2', 3', 4'-trimethoxyphenyl)tropone. Thermodynamic and kinetic aspects. // *Journal of Biological Chemistry*. 1984. Т. 259. № 12. С. 7391–7398.
14. Barasoain I., Díaz J. F., Andreu J. M. Chapter 19 - Fluorescent Taxoid Probes for Microtubule Research // *Microtubules, in vitro Methods in Cell Biology*. / под ред. L. Wilson, J. J. Correia. : Academic Press, 2010. С. 353–372.
15. Berg C. M. van den и др. CSPP1 stabilizes growing microtubule ends and damaged lattices from the luminal side // *Journal of Cell Biology*. 2023. Т. 222. № 4. С. e202208062.
16. Bhattacharyya B., Wolff J. Promotion of fluorescence upon binding of colchicine to tubulin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1974. Т. 71. № 7. С. 2627–2631.
17. Bollinger J. A. и др. Tubulin islands containing slowly hydrolyzable GTP analogs regulate the mechanism and kinetics of microtubule depolymerization // *Sci Rep*. 2020. Т. 10. № 1. С. 13661.
18. Borowiak M. и др. Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death // *Cell*. 2015. Т. 162. № 2. С. 403–411.

19. Boyd M. R., Paull K. D., Rubinstein L. R. Data Display and Analysis Strategies for the NCI Disease-Oriented in Vitro Antitumor Drug Screen // *Cytotoxic Anticancer Drugs: Models and Concepts for Drug Discovery and Development* / под ред. F. A. Valeriote, T. H. Corbett, L. H. Baker. Boston, MA: Springer US, 1992. С. 11–34.
20. Castoldi M., Popov A. V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization- depolymerization in a high-molarity buffer // *Protein Expression and Purification*. 2003. Т. 32. № 1. С. 83–88.
21. Chatterjee S. K. и др. Interaction of Tubulin with a New Fluorescent Analogue of Vinblastine , // *Biochemistry*. 2002. Т. 41. № 47. С. 14010–14018.
22. Chrétien D., Flyvbjerg H., Fuller S. D. Limited flexibility of the inter-protofilament bonds in microtubules assembled from pure tubulin // *European Biophysics Journal*. 1998. Т. 27. № 5. С. 490–500.
23. Chrétien D., Fuller S. D. Microtubules switch occasionally into unfavorable configurations during elongation // *Journal of Molecular Biology*. 2000. Т. 298. № 4. С. 663–676.
24. 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. Т. 129. № 5. С. 1311–1328.
25. Cushman M. Synthesis and Evaluation of Analogues of (Z)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethanes Potential Cytotoxic and Antimitotic Agents.
26. Das A. и др. Exploration of Self-Aggregation of Coumarin 7 and Coumarin 30 in Water: Role of β -Cyclodextrin as a Modulator // *J. Phys. Chem. B*. 2021. Т. 125. № 49. С. 13482–13493.
27. Das L. и др. Binding of Indanocine to the Colchicine Site on Tubulin Promotes Fluorescence, and Its Binding Parameters Resemble Those of the Colchicine Analogue AC.

28. David-Pfeuty T., Erickson H. P., Pantaloni D. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Т. 74. № 12. С. 5372–5376.
29. Debs G. E. и др. Dynamic and asymmetric fluctuations in the microtubule wall captured by high-resolution cryoelectron microscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020. Т. 117. № 29. С. 16976–16984.
30. Deng G., Sanyal G. Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006. Т. 40. № 3. С. 528–538.
31. Dimitrov A. и др. Detection of GTP-Tubulin Conformation in Vivo Reveals a Role for GTP Remnants in Microtubule Rescues // *Science*. 2008. Т. 322. № 5906. С. 1353–1356.
32. Díaz J. F., Barasoain I., Andreu J. M. Fast Kinetics of Taxol Binding to Microtubules // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Т. 278. № 10. С. 8407–8419.
33. Doodhi H. и др. Termination of Protofilament Elongation by Eribulin Induces Lattice Defects that Promote Microtubule Catastrophes // *Current Biology*. 2016. Т. 26. № 13. С. 1713–1721.
34. Drabek K. и др. Role of CLASP2 in Microtubule Stabilization and the Regulation of Persistent Motility // *Current Biology*. 2006. Т. 16. № 22. С. 2259–2264.
35. Duhr S., Braun D. Thermophoretic Depletion Follows Boltzmann Distribution // *Phys. Rev. Lett.* 2006. Т. 96. № 16. С. 168301.
36. Dumontet C., Jordan M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics // *Nat Rev Drug Discov*. 2010. Т. 9. № 10. С. 790–803.
37. Fees C. P., Moore J. K. A unified model for microtubule rescue // *Molecular Biology of the Cell*. 2019. Т. 30. № 6. С. 753–765.

38. Fitzgerald T. J. Molecular features of colchicine associated with antimitotic activity and inhibition of tubulin polymerization // *Biochemical Pharmacology*. 1976. Т. 25. № 12. С. 1383–1387.
39. Forges H. de и др. Localized Mechanical Stress Promotes Microtubule Rescue // *Current Biology*. 2016. Т. 26. № 24. С. 3399–3406.
40. Gardner M. K. и др. Rapid microtubule self-assembly kinetics // *Cell*. 2011. Т. 146. № 4. С. 582–592.
41. Gaspari R. и др. Structural Basis of cis- and trans-Combretastatin Binding to Tubulin // *Chem*. 2017. Т. 2. № 1. С. 102–113.
42. Gigant B. и др. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine // *Nature*. 2005. Т. 435. № 7041. С. 519–522.
43. Gracheva I. A. и др. Colchicine Alkaloids and Synthetic Analogues: Current Progress and Perspectives // *J. Med. Chem*. 2020. Т. 63. № 19. С. 10618–10651.
44. Gudimchuk N. B. и др. Mechanisms of microtubule dynamics and force generation examined with computational modeling and electron cryotomography // *Nature Communications*. № 2020. С. 1–15.
45. Gudimchuk N. B., McIntosh J. R. Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021. Т. 22. № 12. С. 777–795.
46. Guyomar C. и др. Changes in seam number and location induce holes within microtubules assembled from porcine brain tubulin and in *Xenopus* egg cytoplasmic extracts // *eLife*. 2022. Т. 11. С. e83021.
47. Helenius J. и др. The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends // *Nature*. 2006. Т. 441. № 7089. С. 115–119.

48. Holy T. E., Leibler S. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. Т. 91. № 12. С. 5682–5685.
49. Hoops S. и др. COPASI—a COmplex PATHway SIMulator // *Bioinformatics*. 2006. Т. 22. № 24. С. 3067–3074.
50. Horio T., Hotani H. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy // *Nature*. 1986. Т. 321. № 6070. С. 605–607.
51. Howes S. C. и др. Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure // *MBoC*. 2014. Т. 25. № 2. С. 257–266.
52. Hunyadi V., Chrétien D., Jánosi I. M. Mechanical stress induced mechanism of microtubule catastrophes // *Journal of Molecular Biology*. 2005. Т. 348. № 4. С. 927–938.
53. Hyman A. и др. Preparation of modified tubulins // *Methods in Enzymology*. 1991. Т. 196. № С. С. 478–485.
54. Janson M. E., Dogterom M. A Bending Mode Analysis for Growing Microtubules: Evidence for a Velocity-Dependent Rigidity // *Biophysical Journal*. 2004. Т. 87. № 4. С. 2723–2736.
55. Jerabek-Willemsen M. и др. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis // *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2011. Т. 9. № 4. С. 342–353.
56. Jerabek-Willemsen M. и др. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond // *Journal of Molecular Structure*. 2014. Т. 1077. С. 101–113.
57. Jordan M. A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // *Nature Reviews Cancer*. 2004. Т. 4. № 4. С. 253–265.

58. Jünger F., Olshausen P. v., Rohrbach A. Fast, label-free super-resolution live-cell imaging using rotating coherent scattering (ROCS) microscopy // *Sci Rep.* 2016. T. 6. № 1. С. 30393.
59. Kato T. A., Haskins J. S. Mitotic Index Analysis // *Chromosome Analysis: Methods and Protocols* / под ред. E. Gotoh. New York, NY: Springer US, 2023. С. 17–26.
60. Kikkawa M. и др. Direct Visualization of the Microtubule Lattice Seam Both In Vitro and In Vivo Preparation of Tubulin Surface Image of Kinesin Head // *Synthesis.* 1994. T. 127. № 6. С. 1965–1971.
61. Lawrence E. J. и др. Human CLASP2 specifically regulates microtubule catastrophe and rescue // *MBoC.* 2018. T. 29. № 10. С. 1168–1177.
62. Lawrence E. J., Zanic M. Rescuing microtubules from the brink of catastrophe: CLASPs lead the way // *Current Opinion in Cell Biology.* 2019. T. 56. С. 94–101.
63. Lei J.-H. и др. Structural insights into targeting of the colchicine binding site by ELR510444 and parbendazole to achieve rational drug design // *RSC Adv.* 2021. T. 11. № 31. С. 18938–18944.
64. Luo W. и др. CLASP2 recognizes tubulins exposed at the microtubule plus-end in a nucleotide state-sensitive manner // *Sci. Adv.* 2023. T. 9. № 1. С. eabq5404.
65. Majumdar S. и др. An isolated CLASP TOG domain suppresses microtubule catastrophe and promotes rescue // *MBoC.* 2018. T. 29. № 11. С. 1359–1375.
66. Matthew S. и др. Gatorbulin-1, a distinct cyclodepsipeptide chemotype, targets a seventh tubulin pharmacological site // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021. T. 118. № 9. С. e2021847118.
67. McLoughlin E. C., O’Boyle N. M. Colchicine-Binding Site Inhibitors from Chemistry to Clinic: A Review // *Pharmaceuticals.* 2020. T. 13. № 1. С. 8.

68. Menchon G. и др. A fluorescence anisotropy assay to discover and characterize ligands targeting the maytansine site of tubulin // *Nat Commun.* 2018. Т. 9. № 1. С. 2106.
69. Meurer-Grob P., Kasparian J., Wade R. H. Microtubule structure at improved resolution // *Biochemistry.* 2001. Т. 40. № 27. С. 8000–8008.
70. Michaels T. C. и др. Mechanics and kinetics of dynamic instability // *eLife.* 2020. Т. 9. С. e54077.
71. Mimori-Kiyosue Y. и др. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex // *The Journal of Cell Biology.* 2005. Т. 168. № 1. С. 141–153.
72. Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth // *Nature.* 1984. Т. 312. № 5991. С. 237–242.
73. Mitchiso.TJ. Localization of an exchangeable GTP-binding site at the plus end of microtubules // *Science.* 1993. Т. 261. № August. С. 1044–1047.
74. Mohan R. и др. End-binding proteins sensitize microtubules to the action of microtubule-targeting agents // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013. Т. 110. № 22. С. 8900–8905.
75. Mühlethaler T. и др. Comprehensive Analysis of Binding Sites in Tubulin // *Angew Chem Int Ed.* 2021. Т. 60. № 24. С. 13331–13342.
76. Müller-Deku A. и др. Photoswitchable paclitaxel-based microtubule stabilisers allow optical control over the microtubule cytoskeleton // *Nat Commun.* 2020. Т. 11. № 1. С. 4640.
77. Noble R. L. The discovery of the vinca alkaloids—chemotherapeutic agents against cancer // *Biochem. Cell Biol.* 1990. Т. 68. № 12. С. 1344–1351.

78. Olaru A. и др. Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2015. Т. 45. № 2. С. 97–105.
79. Ortega-Arroyo J., Kukura P. Interferometric scattering microscopy (iSCAT): new frontiers in ultrafast and ultrasensitive optical microscopy // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012. Т. 14. № 45. С. 15625.
80. Paull K. D. и др. Display and Analysis of Patterns of Differential Activity of Drugs Against Human Tumor Cell Lines: Development of Mean Graph and COMPARE Algorithm // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 1989. Т. 81. № 14. С. 1088–1092.
81. Paull K. D. и др. Identification of novel antimitotic agents acting at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity data. // *Cancer Res.* 1992. Т. 52. № 14. С. 3892–3900.
82. Peyrot V. и др. Mechanism of Binding of the New Antimitotic Drug MDL 27048 to the Colchicine Site of Tubulin: Equilibrium Studies?
83. Prota A. E. и др. A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014. Т. 111. № 38. С. 13817–13821.
84. Prota A. E. и др. Pironetin Binds Covalently to α Cys316 and Perturbs a Major Loop and Helix of α -Tubulin to Inhibit Microtubule Formation // *Journal of Molecular Biology*. 2016. Т. 428. № 15. С. 2981–2988.
85. Rai A. и др. Taxanes convert regions of perturbed microtubule growth into rescue sites // *Nature Materials*. 2019.
86. Rai A. и др. Taxanes convert regions of perturbed microtubule growth into rescue sites // *Nat. Mater.* 2020. Т. 19. № 3. С. 355–365.

87. Rai A. и др. Lattice defects induced by microtubule-stabilizing agents exert a long-range effect on microtubule growth by promoting catastrophes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021. Т. 118. № 51. С. e2112261118.
88. Ravelli R. B. G. и др. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain // *Nature*. 2004. Т. 428. № 6979. С. 198–202.
89. Ray Chaudhuri A., Ludueña R. F. Griseofulvin: A novel interaction with bovine brain tubulin // *Biochemical Pharmacology*. 1996. Т. 51. № 7. С. 903–909.
90. Rice L. M., Montabana E. A., Agard D. A. 2008 - Rice, Montabana, Agard - The lattice as allosteric effector Structural studies of α - and β -tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly - PNAS.pdf // 2008. Т. 105. № 14. С. 8–13.
91. Rusan N. M. и др. Reorganization of the microtubule array in prophase/prometaphase requires cytoplasmic dynein-dependent microtubule transport // *The Journal of Cell Biology*. 2002. Т. 158. № 6. С. 997–1003.
92. Schaedel L. и др. Microtubules self-repair in response to mechanical stress // *Nature Mater*. 2015. Т. 14. № 11. С. 1156–1163.
93. Schaedel L. и др. Lattice defects induce microtubule self-renewal // *Nat. Phys.* 2019. Т. 15. № 8. С. 830–838.
94. Schaedel L. и др. Vimentin intermediate filaments stabilize dynamic microtubules by direct interactions // *Nat Commun*. 2021. Т. 12. № 1. С. 3799.
95. Spiegelman B. M., Penningroth S. M., Kirschner M. W. Turnover of tubulin and the N site GTP in chinese hamster ovary cells // *Cell*. 1977. Т. 12. № 3. С. 587–600.
96. Steinmetz M. O., Prota A. E. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton // *Trends in Cell Biology*. 2018. Т. 28. № 10. С. 776–792.
97. Suleimenov M. и др. Bcl-xL activity influences outcome of the mitotic arrest // *Frontiers in Pharmacology*.

98. Suzuki Y. Fluorescent anticancer quinazolines as molecular probes for β -tubulin colchicine site competition assay and visualization of microtubules as intracellular targeting sites.
99. Théry M., Blanchoin L. Microtubule self-repair // *Current Opinion in Cell Biology*. 2021. Т. 68. С. 144–154.
100. Vartanova A. E. и др. Expanding Stereoelectronic Limits of endo - tet Cyclizations: Synthesis of Benz[b]azepines from Donor–Acceptor Cyclopropanes // *J. Am. Chem. Soc.* 2021. Т. 143. № 34. С. 13952–13961.
101. Vemu A. и др. Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation // *Science*. 2018. Т. 361. № 6404. С. eaau1504.
102. Venghateri J. B. и др. Ansamitocin P3 Depolymerizes Microtubules and Induces Apoptosis by Binding to Tubulin at the Vinblastine Site // *PLoS ONE*. 2013. Т. 8. № 10. С. e75182.
103. Vitre B. и др. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro // *Nature Cell Biology*. 2008. Т. 10. № 4. С. 415–421.
104. Volkov V. A., Zaytsev A. V., Grishchuk E. L. Preparation of segmented microtubules to study motions driven by the disassembling microtubule ends // *Journal of Visualized Experiments*. 2014. № 85. С. 1–14.
105. Walker R. A. и др. Dynamic Instability of Individual Microtubules // *The Journal of Cell Biology*. 1988. Т. 107. № October. С. 1437–1448.
106. Wang Y. и др. Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery // *The FEBS Journal*. 2016. Т. 283. № 1. С. 102–111.
107. Weber P. C., Salemme F. R. Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions // *Current Opinion in Structural Biology*. 2003. Т. 13. № 1. С. 115–121.

108. Wiggins C. H. и др. Trapping and Wiggling: Elastohydrodynamics of Driven Microfilaments // *Biophysical Journal*. 1998. Т. 74.
109. Wijaya E. и др. Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies // *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2011. Т. 15. № 5. С. 208–224.
110. Wollman R. и др. Efficient Chromosome Capture Requires a Bias in the ‘Search-and-Capture’ Process during Mitotic-Spindle Assembly // *Current Biology*. 2005. Т. 15. № 9. С. 828–832.
111. Yang C.-P. H., Horwitz S. B. Taxol(®): The First Microtubule Stabilizing Agent. // *Int J Mol Sci*. 2017. Т. 18. № 8.
112. Zakharov P. N. и др. Microtubule: a dynamically unstable stochastic phase switching polymer // *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*. 2016. Т. 186. № 8. С. 853–868.
113. Zhu C. и др. Distinct Tubulin Dynamics in Cancer Cells Explored by a Highly Tubulin-Specific Fluorescent Probe.
114. Zwetsloot A. J., Tut G., Straube A. Measuring microtubule dynamics // *Essays in Biochemistry*. 2018. Т. 62. № 6. С. 725–735.