

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Анисимов Михаил Николаевич

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

Специальность 1.5.2 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Гудимчук Никита Борисович**, доктор физико-математических наук

Официальные оппоненты: **Аветисов Владик Аванесович**, доктор физико-математических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова** Российской академии наук, главный научный сотрудник, отдел строения вещества

Бершицкий Сергей Юрьевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук**, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биологической подвижности

Бураков Антон Владимирович, доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник, отдел функциональной биохимии биополимеров

Защита диссертации состоится «19» декабря 2024 г. в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.011.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: РФ, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, аудитория 5-19.

E-mail: osminkina@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д.27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3241>

Автореферат разослан «__» ноября 2024г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.011.9,
кандидат физико-математических наук

Л.А. Осминкина

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 микропьедесталов 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 микропедесталов 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.

Структура и объем диссертации

Диссертация представлена на 130 страницах и состоит из введения, пяти глав, посвященных обзору литературы, описанию материалов и методов исследования, изложению результатов и их обсуждению, заключения, основных результатов и выводов, списка литературы, содержащего 114 наименований. Работа проиллюстрирована 37 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **общей характеристике работы** определяется актуальность избранной темы, степень ее разработанности, цели и задачи, объект исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология диссертационного исследования, положения, выносимые на защиту, апробация результатов.

Глава 1. Обзор литературы.

В разделе **1.1. Строение и свойства микротрубочек** приведены основные сведения о строении, свойствах и функциях микротрубочек. Рассмотрены основные гипотезы о механизмах динамического поведения микротрубочек, включающие гипотезы о механизме катастроф и спасений микротрубочек на основе представлений о ГТФ-шапке и дефектах решетки микротрубочек (Рис. 1).

В разделе **1.2. Регуляция динамики микротрубочек** известны экспериментальные данные о регуляции и модуляции динамического поведения

микротрубочек представлены на примере белков EB1, CLASP и низкомолекулярных веществ-лигандов белка тубулина.

В разделе **1.3. Методики исследования микротрубочек *in vitro*** разобраны основные подходы к изучению микротрубочек *in vitro*, дано описание классической экспериментальной методики вместе с её критической оценкой. Описаны основные методы световой микроскопии, используемые для визуализации динамики микротрубочек, DIC, TIRF микроскопии (англ. Differential Interference Contrast, Total Internal Reflection Fluorescence), перечислены их достоинства и недостатки.

В разделе **1.4. Методики скрининга низкомолекулярных модуляторов микротрубочек** сделан обзор основных методов, которые могут быть использованы для поиска новых лигандов белка тубулина. Описана библиотека веществ NCI (англ. National Cancer Institute) и метод COMPARE для работы с ней. Перечислены методы общего назначения (поверхностный плазмонный резонанс, калориметрическое исследование, микротермофорез, масс-спектрометрия), и методы специального назначения на основе флуоресцентных зондов для определения связывания лиганда с определённым сайтом белка тубулина.

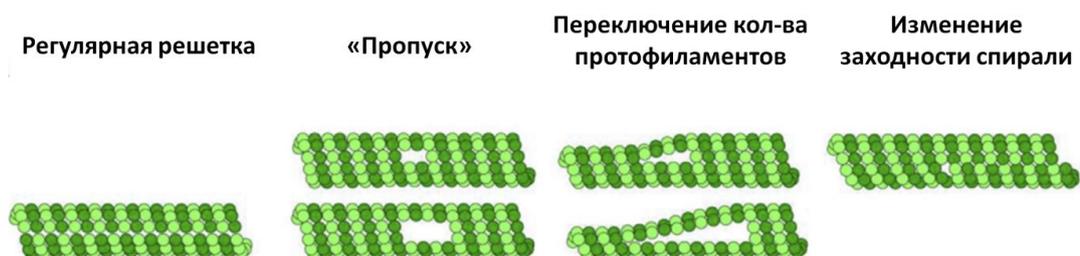


Рис. 1. Типы дефектов решетки микротрубочки [Théry, Blanchoin, 2021].

Глава 2. Материалы и методы

В разделе **2.1. Очистка белков и приготовление стабилизированных микротрубочек** описаны протоколы выделения и очистки белка тубулина, рекомбинантных белков EB1-GFP и фрагмента белка CLASP GFP-L-TOG2-S. Описана процедура создания стабилизированных микротрубочек-затравок, используемых для полимеризации от них динамических частей микротрубочек.

В разделе **2.2. Микроскопия микротрубочек** описаны классическая методика изучения микротрубочек на поверхности покровного стекла и новая методика с использованием микропьедесталов. Приведены протокол создания микропьедесталов с использованием фотолитографии, протоколы наблюдения динамических концов микротрубочек, растущих от стабилизированных затравок, с использованием DIC-микроскопии, и изучения встраивания ГТФ-тубулина в места дефектов решетки микротрубочек с использованием TIRF-микроскопии. Для случая новой экспериментальной методики описан специальный алгоритм коррекции засветки на краях микропьедесталов для улучшения качества получаемых изображений. Приведены алгоритмы обработки изображений микротрубочек, в том числе, измерение параметров встраивания ГТФ-тубулинов в их решетку (пространственной частоты) и параметров динамической нестабильности микротрубочек (скорости роста, укорочения, частоты катастроф и спасений).

В разделе **2.3. Низкомолекулярные ингибиторы динамики микротрубочек** описан процесс отбора веществ-кандидатов из базы данных NCI с помощью алгоритма COMPARE. Даны протоколы изучения флуоресцентных свойств кумарина-30 и его взаимодействия с белком тубулином. Подробно описан протокол скрининга потенциальных лигандов белка тубулина с помощью нового метода на основе кумарина-30 и микротермофореза.

Глава 3. Результаты и их обсуждение.

Раздел **3.1. Классическая методика наблюдения динамики микротрубочек** посвящен изучению процессов встраивания и диссоциации ГТФ-тубулинов в местах дефектов решетки микротрубочек и параметров динамической нестабильности с помощью классической экспериментальной

методики, то есть на поверхности покровного стекла (Рис. 2). Измеренная пространственная частота встраивания флуоресцентного ГТФ-тубулина и образование так называемых ГТФ-островков $0.12 \pm 0.02 \text{ мкм}^{-1}$ (Рис. 3а, в) соответствует опубликованным ранее

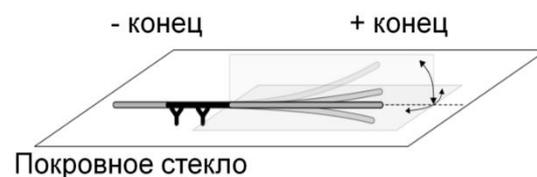


Рис. 2. Схема классической экспериментальной методики для исследования динамики микротрубочек *in vitro*.

данным в работах [Aumeier и др., 2016], [Schaedel и др., 2019]. По кимограммам (Рис. 4а) измерены параметры динамической нестабильности микротрубочек, 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 затравке, что не совпадает с теоретическими ожиданиями для их положений при возникновении на случайно расположенных ГТФ-островках (Рис. 4б, в). Поэтому распределение глубин деполимеризации микротрубочек не является экспоненциальным, следовательно, положение мест спасений не является случайным.

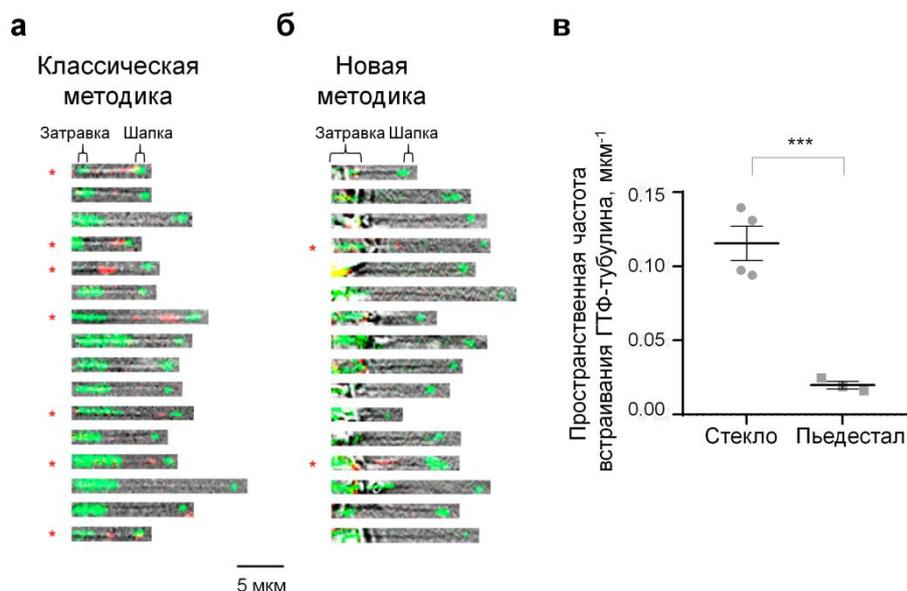


Рис. 3. Сравнение встраивания ГТФ-тубулина в решетку микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик. Красными звездочками отмечены случаи встраивания флуоресцентно меченного белка тубулина в решетку микротрубочек.

Существование пика в распределении спасений означает существование наиболее вероятной позиции спасения микротрубочки (вблизи конца затравки, но на некотором удалении от него). В то же время, тепловые колебания микротрубочек в случае применения классической экспериментальной методики могут приводить к преимущественным контактам её решетки с поверхностью покровного стекла в соответствии с основными модами колебаний 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. Вместе с этим, сама по себе временная адгезия микротрубочки к покровному стеклу могла бы удерживать протофиламенты и препятствовать деполимеризации микротрубочки.

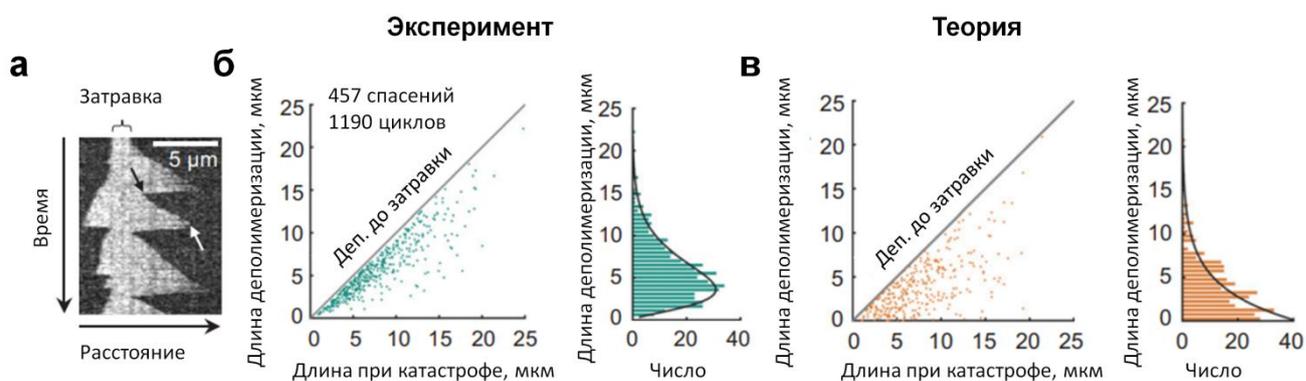


Рис. 4. Ожидаемое и экспериментально полученное распределение спасений микротрубочек. а) Пример экспериментально полученной кимограммы микротрубочки, отмечены события спасения (черная стрелка) и катастрофы (белая стрелка). Экспериментальные, б), и теоретические, в), данные о положении мест спасений.

Раздел 3.2. Методика наблюдения микротрубочек на микропьедесталах посвящен проверке гипотезы о том, что ГТФ-тубулин встраивается в места дефектов решетки микротрубочки и образующиеся в результате этого ГТФ-островки могут быть основным механизмом спасений. Использование новой *in vitro* экспериментальной методики позволило изолировать микротрубочки от любого взаимодействия с покровным стеклом (Рис. 5) благодаря нанесению микропьедесталов из фоторезиста SU-8 на покровное стекло методом фотолитографии. Значительная высота микропьедесталов и флуоресцентные

свойства материала SU-8 потребовали применение специального алгоритма коррекции засветки, разработанного в данной работе, для обеспечения сопоставимой чувствительности измерений по

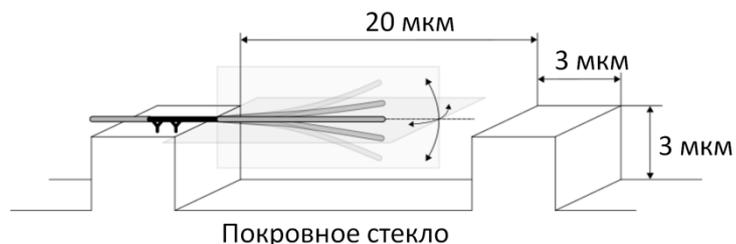


Рис. 5. Схема новой экспериментальной методики.

сравнению с классической методикой. Оказалось, что пространственная частота встраивания ГТФ-тубулина из раствора в решетку микротрубочек снизилась почти на порядок с 0.12 ± 0.02 до 0.020 ± 0.005 мкм^{-1} по сравнению со случаем использования классической экспериментальной методики (Рис. 3б, в). Частота спасений микротрубочек также значительно снизилась с 1.7 ± 0.6 до 0.5 ± 0.2 мин^{-1} , в то время как частота катастроф и скорость роста не изменились (Рис. 6). Эти результаты являются свидетельством ключевой роли факторов, которые приводят к дефектам решетки микротрубочек, и динамических процессов в местах дефектов в механизме возникновения спасений.

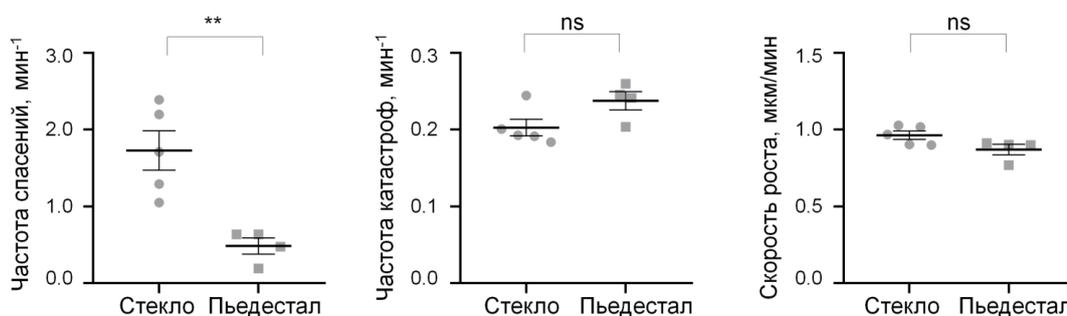


Рис. 6. Сравнение параметров динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик.

В разделе 3.3. Изучение регуляции динамики микротрубочек при использовании двух экспериментальных подходов изучался механизм воздействия на микротрубочки естественных регуляторов белковой природы (EB1 и CLASP) и низкомолекулярных ингибиторов динамики (паклитаксел, винбластин), в том числе, в комбинации друг с другом. Неожиданным оказалось, что комбинация белка EB1 и паклитаксела приводит к частым спасениям микротрубочек (что показано в работе [Mohan и др., 2013]) именно для случая

классической экспериментальной методики. В случае использования новой экспериментальной методики белок EB1 и паклитаксел не способны привести к частым спасениям (Рис. 7). 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.

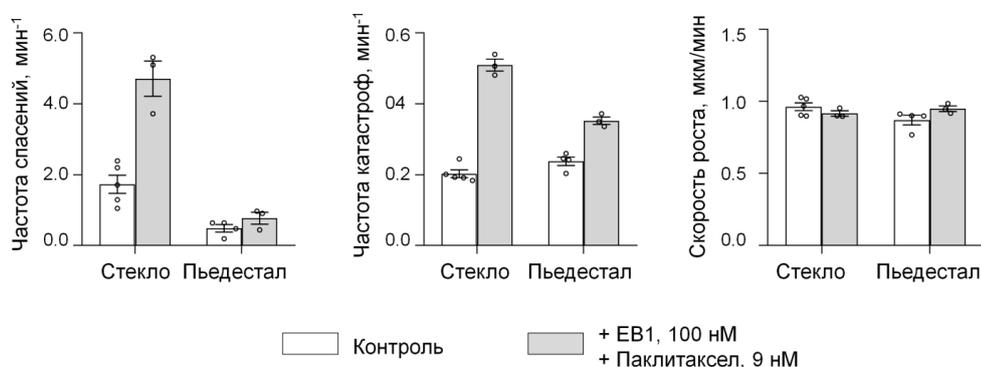


Рис. 7. Сравнение параметров динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик в присутствии белка EB1 (100 нМ) и паклитаксела (9 нМ).

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 (Рис. 8).

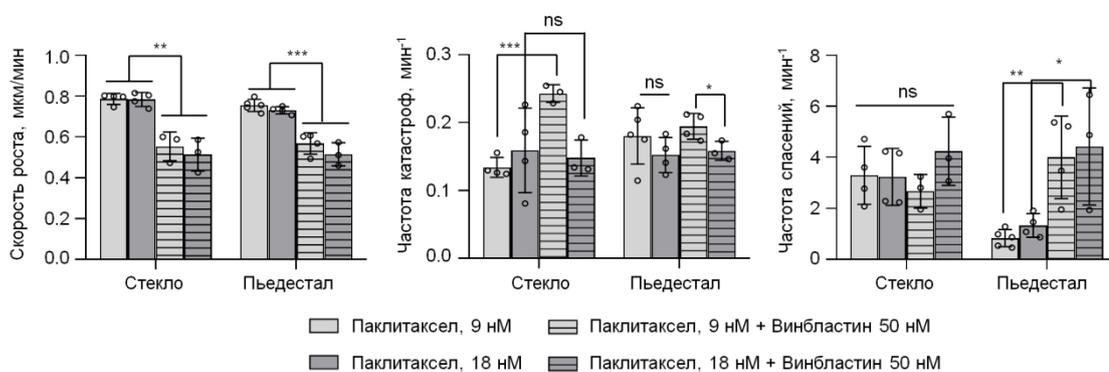


Рис. 8. Сравнение параметров динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик в присутствии винбластина и паклитаксела.

В то же время, оказалось, что естественный внутриклеточный модулятор спасений микротрубочек, белок CLASP, приводит к частым спасениям микротрубочек при использовании обеих экспериментальных методик (Рис. 9).

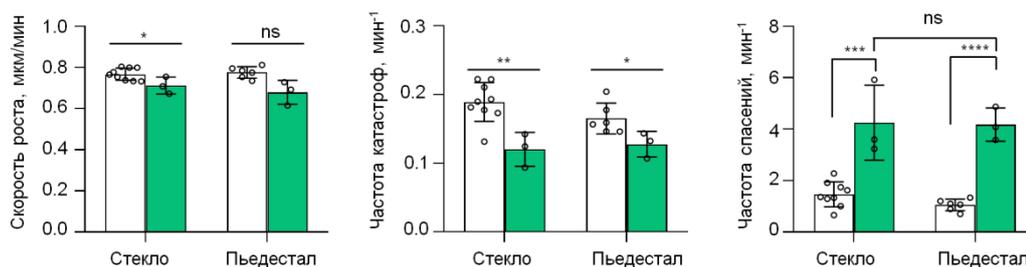


Рис. 9. Сравнение динамики микротрубочек при использовании классической и новой экспериментальных методик при добавлении фрагмента белка CLASP2.

В разделе 3.4. Поиск новых ингибиторов динамики микротрубочек впервые описаны свойства низкомолекулярного вещества кумарин-30 эффективно подавлять динамику микротрубочек (Рис. 10а), связываясь с колхициновым сайтом белка тубулина (Рис. 11).

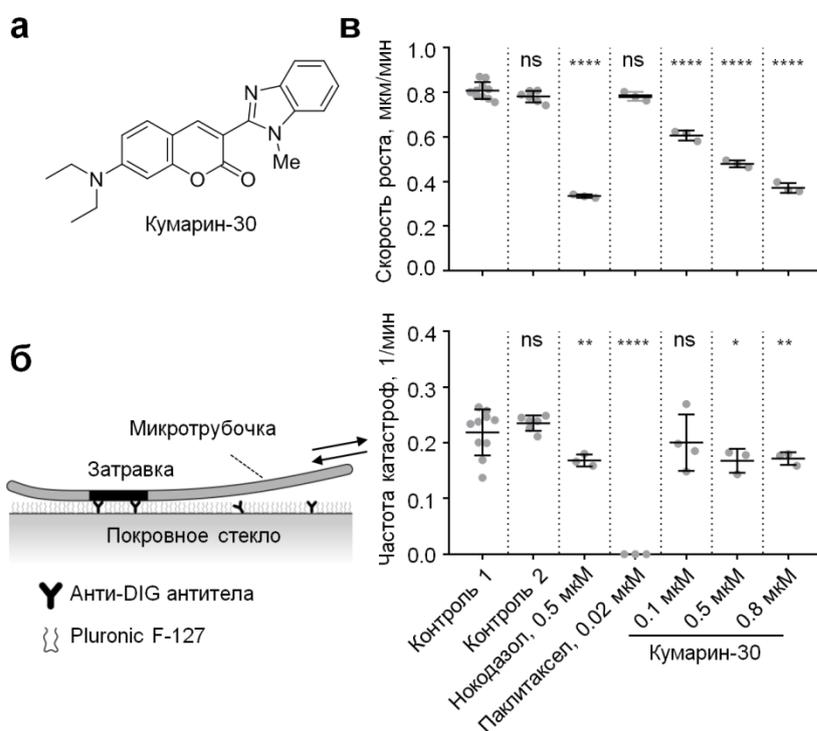


Рис. 10. Проверка воздействия кумарина-30 на динамику микротрубочек *in vitro*. а) Структура кумарина-30. б) Схема классической *in vitro* методики. в) Скорости роста микротрубочек и частоты катастроф в присутствии нокодазола (положительный контроль), паклитаксела или различных концентраций кумарина-30. Звездочками показана статистическая значимость отличий от контроля.

Выраженные флуоресцентные свойства кумарина-30, в том числе, его способность светиться ярче при связывании с белком тубулином (Рис. 11) позволили установить, что он связывается с колхициновым сайтом и в

комбинации с методом микротермофореза позволили создать новый метод скрининга (Рис. 12).

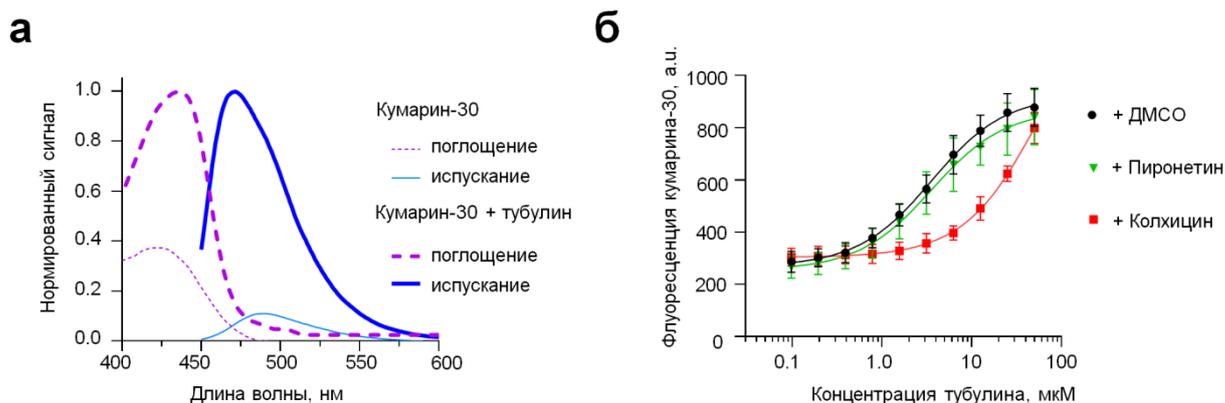


Рис. 11. Свойства кумарина-30. а) Спектры флуоресценции кумарина-30. б) Конкуренция кумарина-30 за колхициновый сайт белка тубулина (красная линия) и отсутствие конкуренции за альтернативный сайт пиронетина (зелёная линия).

Новый метод скрининга был валидирован на наборе хорошо известных лигандов белка тубулина, связывающихся с колхициновым и альтернативными сайтами (Рис. 13). Уникальная способность данного метода отличать лиганды колхицинового сайта от лигандов альтернативных сайтов была теоретически обоснована. 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

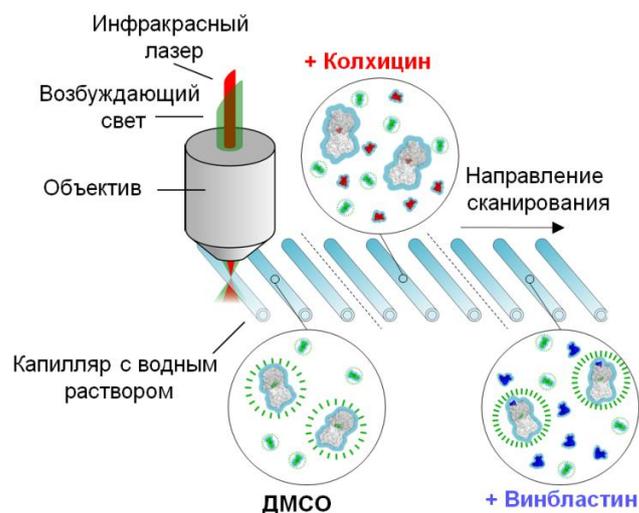


Рис. 12. Схема нового метода скрининга на основе микротермофореза и флуоресцентного зонда кумарин-30. Показаны случаи заполнения капилляров раствором белка тубулина, содержащим, кумарина-30 и ДМСО (контроль), колхицин и лиганд альтернативного сайта белка тубулина, винбластин.

распределению концентрации молекул, зависящему от разности температур нагретой и холодной областей и коэффициента S [Duhr, Braun, 2006]:

$$\frac{C}{C_0} = \exp\left(-\frac{D_T}{D}(T - T_0)\right) \quad (1)$$

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

$$S = \frac{D_T}{D} \quad (2)$$

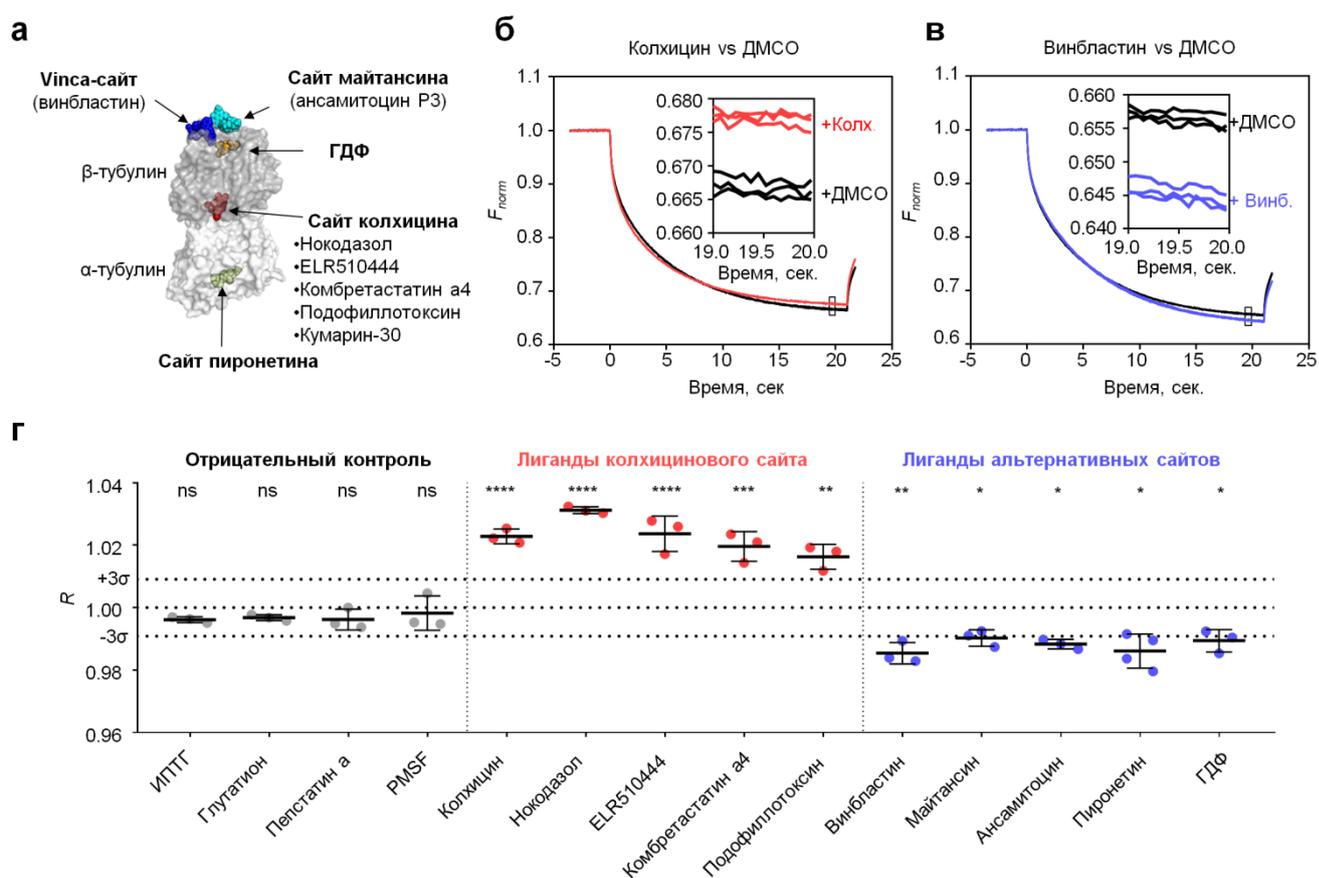


Рис. 13. Проверка нового метода скрининга на выборке известных лигандов белка тубулина. а) Расположение сайтов связывания лигандов белка тубулина. б), в) – примеры микротермофоретических треков для случаев добавления колхицина или винбластина, соответственно. г) Нормированные сигналы микротермофореза, R .

Известно, что размер молекулы и различные параметры её поверхности, такие как заряд и гидрофобность, влияют на коэффициент S . Влияние биомолекулярных параметров на термофоретический эффект в терминах термодинамического описания проведен в работе [Duhr, Braun, 2006]. Локальное

термодинамическое равновесие позволяет получить выражение для коэффициента S_{ore} :

$$S = \frac{D_T}{D} = \frac{1}{kT} \frac{\partial G}{\partial T} = \frac{A}{kT} \left(-S_{hyd} + \frac{\beta \sigma_{eff}^2}{4\epsilon\epsilon_0 T} \lambda_{DH} \right) \quad (3)$$

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, G — свободная энергия Гиббса.

Получаемые нормированные сигнал («ответ») задается следующей формулой:

$$R = \frac{F_{hot}^{ligand}}{F_{cold}^{ligand}} \frac{F_{cold}^{DMSO}}{F_{hot}^{DMSO}} \quad (4)$$

где F — флуоресценция кумарина-30, индексы *hot*, *cold* относятся к нагретой и холодной областям, соответственно; индексы *DMSO*, *ligand* относятся к контролю и случаю добавления исследуемого лиганда, соответственно.

Можно показать, что наблюдаемое различие в знаке сигнала микротермофореза для лигандов колхицинового сайта ($R > 1$) и лигандов альтернативных сайтов ($R < 1$) по сравнению с контролем ($R \equiv 1$) является 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 микротермофорез комплекса кумарин-30+тубулин. Использование данного метода скрининга на наборе веществ, отобранных из базы данных NCI, синтезированных аналогов и новых соединений, позволило обнаружить 5 новых лигандов колхицинового сайта белка тубулина (Рис. 14, 15б). Эксперименты *in vitro* и на раковых клетках показали, что данные вещества эффективно подавляют динамику микротрубочек и деление раковых клеток (Рис. 15а, в).

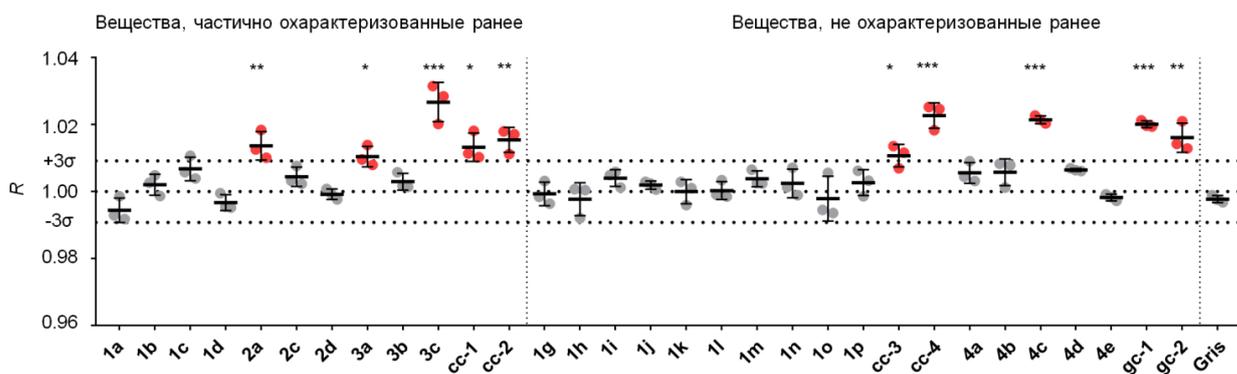


Рис. 14. Результаты скрининга с помощью нового метода позволили обнаружить 10 лигандов колхицинового сайта (отмечены красным), 5 из которых новые и ранее не охарактеризованные (сс-3, сс-4, 4с, gc-1, gc-2). Звездочками обозначена статистическая значимость отличий от 1.

Таким образом, благодаря нахождению флуоресцентного вещества кумарин-30 и установлению его способности связываться с колхициновым сайтом белка тубулина, и его комбинации с микротермофорезом, создан новый метод скрининга, позволивший найти другие новые ингибиторы динамики микротрубочек и блокаторы клеточного деления.

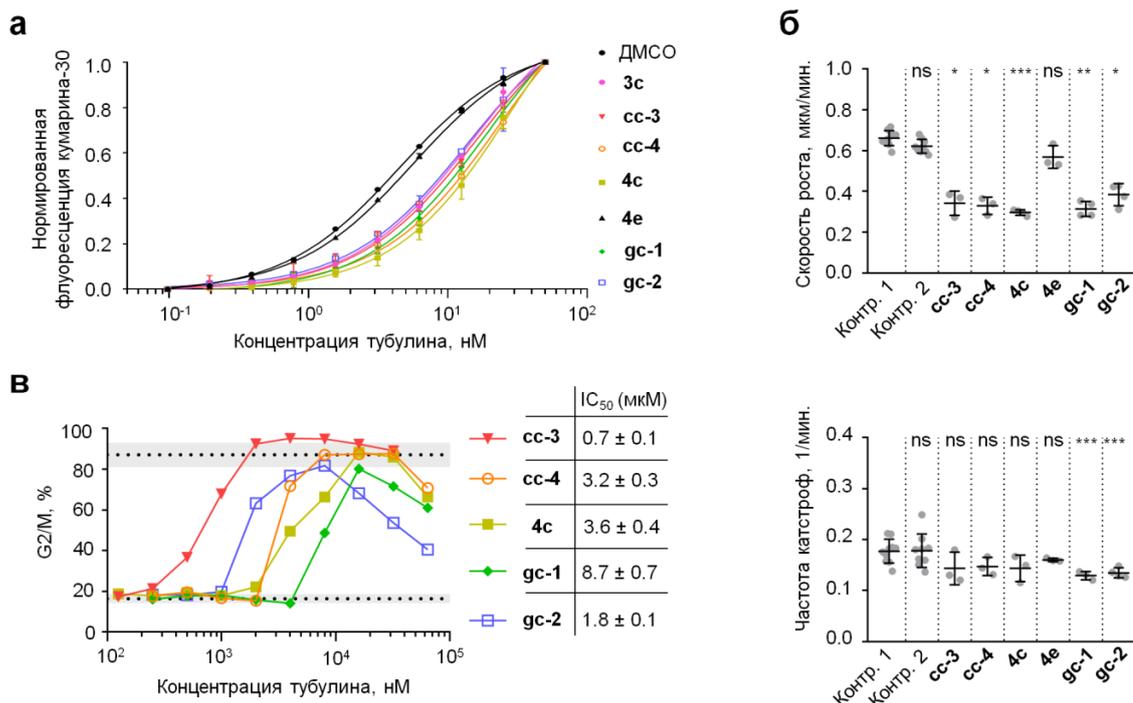


Рис. 15. Эффекты веществ, отобранных новым методом скрининга, на микротрубочки *in vitro* и на раковые клетки. а) Параметры динамики микротрубочек. б) Определение сайта связывания новых лигандов по конкуренции с кумарином-30. в) Измерение доли клеток в популяции, находящихся в фазе G2/M, в зависимости 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 нокодазола (верхняя).

В **Заключении** диссертации излагаются итоги выполненного исследования, выводы, рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

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 микротрубочки является основной причиной их переключений от разборки к сборке. Микротрубочки, полимеризованные с более регулярной решеткой, благодаря использованию метода микропъедесталов, 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 микротермофоретических 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aumeier C. и др. Self-repair promotes microtubule rescue // *Nat Cell Biol.* 2016. Т. 18. № 10. С. 1054–1064.
2. 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.
3. Duhr S., Braun D. Thermophoretic Depletion Follows Boltzmann Distribution // *Phys. Rev. Lett.* 2006. Т. 96. № 16. С. 168301.
4. Fees C. P., Moore J. K. A unified model for microtubule rescue // *Molecular Biology of the Cell.* 2019. Т. 30. № 6. С. 753–765.
5. Gardner M. K. и др. Rapid microtubule self-assembly kinetics // *Cell.* 2011. Т. 146. № 4. С. 582–592.
6. Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth // *Nature.* 1984. Т. 312. № 5991. С. 237–242.
7. 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.
8. Rai A. и др. Taxanes convert regions of perturbed microtubule growth into rescue sites // *Nat. Mater.* 2020. Т. 19. № 3. С. 355–365.
9. 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.
10. Schaedel L. и др. Lattice defects induce microtubule self-renewal // *Nat. Phys.* 2019. Т. 15. № 8. С. 830–838.
11. Théry M., Blanchoin L. Microtubule self-repair // *Current Opinion in Cell Biology.* 2021. Т. 68. С. 144–154.
12. Vemu A. и др. Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation // *Science.* 2018. Т. 361. № 6404. С. eaau1504.
13. Vitre B. и др. EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro // *Nature Cell Biology.* 2008. Т. 10. № 4. С. 415–421.
14. Walker R. A. и др. Dynamic Instability of Individual Microtubules // *The Journal of Cell Biology.* 1988. Т. 107. № October. С. 1437–1448.

**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. 2023. Т. 102. № 4. С. 151366. Импакт-фактор — 4.5 (WoS JIF, за 2 года). Объем — 0.5625 печ. листа. Вклад соискателя — 0.4523 печ. листа. DOI: 10.1016/j.ejcb.2023.151366.
2. V. Alexandrova, **М. Anisimov**, A. Zaitsev, V. Mustyatsa, V. Popov, F. Ataulakhanov 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. Импакт-фактор — 9.4 (WoS JIF, за 2 года). Объем — 0.625 печ. листа. Вклад соискателя — 0.321 печ. листа. DOI: 10.1073/pnas.2208294119.
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. Импакт-фактор — 14.4 (WoS JIF, за 2 года). Объем — 0.625 печ. листа. Вклад соискателя — 0.123 печ. листа. DOI: 10.1021/jacs.1c07088.