

Исследование взаимодействия микротрубочки и паклитаксела *in vitro* и *in silico*

Вовченко М.А.¹, Александрова В.В.², Мустьяца В.В.^{2,3}, Гудимчук Н.Б.^{2,3,4}

¹Московский физико-технический институт (научно-исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и
иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

maxvov@phystech.edu

Микротрубочки – динамические полимеры из белка тубулина, которые играют важную роль в процессе клеточного деления. Главной их особенностью является стохастический характер переходов из состояния роста в состояние укорочения. Вещество паклитаксел является противораковым препаратом, который воздействует на микротрубочки, стабилизируя их, и тем самым влияет на параметры их динамической нестабильности. Ингибирование динамики микротрубочек паклитакселом ведет к остановке деления клеток. Для исследования механизма воздействия паклитаксела на микротрубочки была проведена серия *in vitro* экспериментов по полимеризации микротрубочек в присутствии паклитаксела, а также была реализована компьютерная модель этого процесса. В ней были проверены несколько вариантов присоединения молекулы паклитаксела к микротрубочке и его влияния на димеры тубулина. Созданная модель описывает стабилизирующее действие паклитаксела на микротрубочку и будет использована в дальнейшем для более детального изучения этого процесса, необходимого с целью улучшения качества терапии рака с использованием паклитаксела.

Ключевые слова: компьютерное моделирование, микротрубочки, динамическая нестабильность, кинетическая модель, паклитаксел.

Study of the Microtubule-Paclitaxel Interaction *in vitro* and *in silico*

Vovchenko M.¹, Alexandova V.², Mustyatsa V.^{2,3}, Gudimchuk N.^{2,3,4}

¹Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia

²Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology RAS, Moscow, Russia,

³Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
Moscow, Russia

⁴Lomonosov Moscow State University, Moscow Russia

Microtubules are dynamic polymers of tubulin that play an important role in the process of cell division. One of their main features is a stochastic nature of transitions from growth to shrinkage. Paclitaxel is an anticancer chemotherapy drug, known to stabilize microtubule by suppressing their dynamic instability. Inhibition of microtubule dynamics induced by paclitaxel leads to cell cycle arrest. To investigate the mechanism of paclitaxel action on microtubules, we performed a series of *in vitro* experiments on microtubules assembly in the presence of paclitaxel, and used computer modeling to simulate this process. Several scenarios of the paclitaxel molecule attachment to the microtubule and its effect on tubulin dimers were tested. Our model describes the paclitaxel-induced stabilization of microtubules. The model can be elaborated in the future for a more detailed examination of this process, which is necessary for improving cancer therapy with paclitaxel.

Key words: computer modeling, microtubules, dynamic instability, kinetic model, paclitaxel.

1. Введение

Деление клетки – важный процесс, обеспечивающий рост и развитие живых организмов. При делении осуществляется передача наследственной информации, хранящейся в хромосомах клетки, от материнской клетки к

дочерним. Перемещение хромосом при делении осуществляет митотический аппарат, главными компонентами которого являются кинетохоры и микротрубочки.

Микротрубочки – внутриклеточные структуры, представляющие собой полые цилиндры из белка тубулина. Их главной особенностью является

колебательный характер полимеризации: длина микротрубочки может стохастически как увеличиваться, так и уменьшаться при одних и тех же внешних условиях [1]. Резкий переход от роста к укорочению называется катастрофой, а возобновление роста – спасением. Известно, что катастрофы и спасения связаны с конформационными свойствами димеров тубулина в двух нуклеотидных состояниях – в комплексе с молекулой гуанозинтрифосфата (ГТФ) и гуанозиндифосфатом (ГДФ)[2–4]. Динамическое поведение микротрубочек изучается с конца XX века, однако механизм все еще остается предметом споров [5].

Микротрубочки играют ключевую роль в процессе клеточного деления [6]. Воздействуя на динамику микротрубочек, можно регулировать процесс деления клетки, что является важным этапом терапии онкологических заболеваний. Так, известно, что вещество паклитаксел способно стабилизировать микротрубочки, подавляя их динамику в раковых клетках и тем самым останавливая их деление [7, 8]. На основе этого вещества был разработан препарат таксол (Таксол®, Taxol®), который успешно применяется в онкотерапии, однако механизм его действия до сих пор изучен не до конца и нуждается в подробном исследовании.

На текущий момент в литературе мало опубликованных данных, характеризующих параметры динамической нестабильности микротрубочек при различных, особенно субстехиометрических, концентрациях таксола и тубулина *in vitro* [7–9]. Большинство работ, посвященных этой теме, либо описывают присоединение таксола к тубулину со структурной точки зрения [10, 11], либо основаны на *in vivo* экспериментах, в которых трудно предсказать влияние других белков внутри клетки на динамику микротрубочки [12]. Таким образом, неизвестно, какие именно характеристики тубулина изменяются в результате связывания паклитаксала с микротрубочкой, приводя к ее стабилизации.

Для того чтобы прояснить молекулярный механизм воздействия паклитаксала на микротрубочки, мы провели исследование в очищенной системе (*in vitro*) и компьютерное моделирование. Для описания параметров динамической нестабильности микротрубочки их динамика визуализировалась методом DIC микроскопии в присутствии таксола *in vitro*. Экспериментальные данные характеризуют влияние таксола на скорость полимеризации микротрубочки, а также на число катастроф.

Разработана компьютерная модель взаимодействия влияния таксола на параметры динамической нестабильности микротрубочки (скорость полимеризации и деполимеризации, число катастроф). Теоретически рассмотрены два варианта присоединения таксола к микротрубочке: равномерное связывание вдоль всей длины и связывание преимущественно на конце. Исследована гипотеза изменения энергии изгиба

димера тубулина, связанного с таксомом как механизм воздействия таксола на микротрубочку.

Полученные теоретические результаты согласуются с экспериментальными наблюдениями и с ранее опубликованными в литературе данными.

2. Материалы и методы

2.1. Измерение динамики микротрубочек *in vitro*

Для изучения динамики микротрубочек была проведена серия *in vitro* экспериментов с различными концентрациями таксола при постоянной концентрации тубулина с использованием DIC-микроскопии.

Эксперименты проводились с использованием проточной камеры. Перед началом эксперимента дно камеры покрывалось GMPCPP-стабилизированными затравками в буфере BRB-80, изготовленными заранее, которые обеспечивали дальнейшую возможность роста микротрубочек.

Во время эксперимента вначале проводилась съёмка роста микротрубочек в растворе чистого тубулина (10 мкМ) в качестве контроля, затем раствор вымывался, и камера заполнялась исследуемыми растворами тубулина с таксомом по очереди. В конце эксперимента камера вновь заполнялась раствором чистого тубулина для второго контроля.

Каждая съёмка велась в течение 30 минут при 32 °С в режиме DIC-микроскопии с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 при помощи программы NIS-Elements AR. Анализ изображений и построение кимограмм производилось в программе ImageJ.

2.2. Описание модели динамики микротрубочки

Ранее в лаборатории биофизики клетки физического факультета МГУ была разработана модель микротрубочки с четырьмя состояниями (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**) на языке MATLAB. Помимо ГТФ- и ГДФ- состояний, в ней реализованы изогнутое и прямое состояние димера тубулина. Изогнутым считается естественное состояние тубулина, в котором он присоединяется к трубочке и отсоединяется от неё. В дополнение к этому димер может выпрямиться, что приведёт его в энергетически более неустойчивое состояние. В этой модели возможны несколько событий:

- присоединение свободного изогнутого ГТФ-тубулина к телу трубочки
- отсоединение изогнутого тубулина как в ГТФ-, так и в ГДФ-состоянии от тела трубочки (с константами, зависящими от лонгитудинальной энергии связи)
- выпрямление изогнутого ГТФ- или ГДФ-тубулина в теле трубочки
- изгиб прямого ГТФ- или ГДФ-тубулина в теле трубочки (с константами, зависящими от энергии изгиба и латеральной энергии связи)
- гидролиз прямого или изогнутого ГТФ-тубулина.

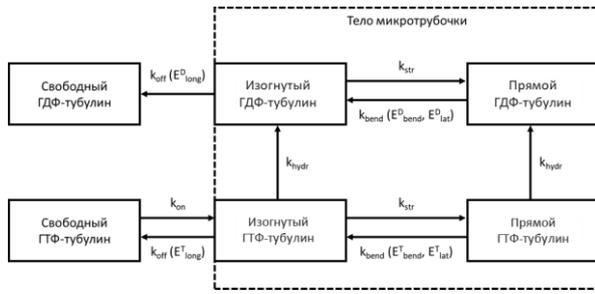


Рис. 1. Схема компьютерной модели микротрубочки.

Для описания воздействия таксола на микротрубочку была добавлена ещё одна матрица, отображающая, какие димеры тубулина связаны с таксомом, а какие – нет.

Были добавлены ещё два события:

- присоединение таксола к димеру на теле трубочки
- отсоединение таксола от димера на теле трубочки

Алгоритм работы модели включает в себя следующие шаги:

- 1) Задаются константы и условия, необходимые для проведения симуляции (концентрация тубулина, концентрация таксола, энергии связей и др.)
- 2) В начале работы микротрубочка представляет из себя затравку заданной длины, состоящую из тубулина в суперстабильном состоянии, которая не подвергается разборке
- 3) Для каждого из возможных событий на каждой итерации рассчитывается время реализации t , определяемое формулой

$$t = -\frac{\ln(1-p)}{k_i},$$

где p – случайное число от 0 до 1, k_i – константа, отвечающая каждому событию.

Из полученных времён выбирается наименьшее и реализуется отвечающее ему событие.

- 4) Предыдущий шаг повторяется до тех пор, пока не закончится время симуляции
- 5) Подсчитываются скорость роста микротрубочки, количество катастроф и спасений

3. Результаты и обсуждение

3.1. Экспериментальное описание влияния таксола на скорость роста и число катастроф микротрубочки

В результате серии экспериментов *in vitro* были получены зависимости скорости роста микротрубочки и числа катастроф при различных концентрациях таксола.

Как видно из рисунка 2, добавление таксола приводит к небольшому снижению скорости роста микротрубочки. С увеличением концентрации таксола на 0.1 мкМ скорость полимеризации микротрубочки уменьшается на величину около 5 %.

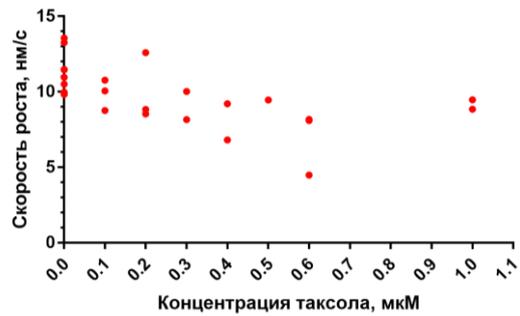


Рис. 2. Зависимость скорости роста микротрубочки от концентрации таксола в растворе.

Значительно более сильный эффект наблюдается при рассмотрении влияния таксола на количество катастроф микротрубочки (рисунок 3). Уже при концентрации 0.1 мкМ таксола количество катастроф падает в два раза и близка к нулю при 0.5 мкМ. При концентрации таксола 1 мкМ катастроф не наблюдается вообще.

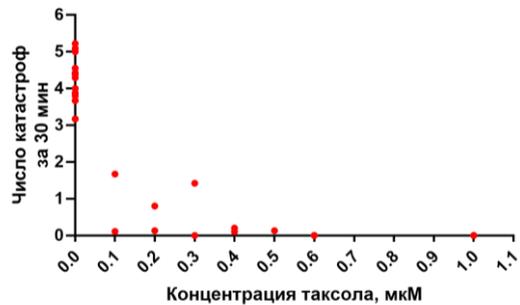


Рис. 3. Зависимость частоты катастроф микротрубочки от концентрации таксола в растворе.

Полученные результаты подтверждают и расширяют ранее опубликованные в литературе данные. Так, в статье [9] приведена зависимость скорости роста микротрубочки в зависимости от концентрации таксола при 17 мкМ тубулина. При изменении концентрации таксола на 0.1 мкМ скорость роста уменьшается на 5–10 %, что согласуется с описанными выше результатами.

3.2. Различные версии воздействия таксола на микротрубочку

Для изучения влияния таксола на динамические параметры микротрубочки была предложена гипотеза его воздействия на энергию изгиба ГТФ- и ГДФ-димеров тубулина. На основе описанных в литературе данных [13] было сделано предположение, что тубулин, связанный с таксомом внутри микротрубочки, может иметь промежуточную энергию деформации изгиба по сравнению с ГТФ- и ГДФ-состояниями. И действительно, известно, что таксолу свойственно выпрямлять протофиламенты микротрубочки [14], что свидетельствует о том, что прямое состояние

более предпочтительно для димеров тубулина, связанных с таксомом, чем изогнутое.

В рамках этой гипотезы были рассмотрены два варианта связывания таксола с микротрубочкой: равномерное распределение по всей длине и преимущественное связывание на конце (рис. 4).

Первый из двух рассмотренных гипотетических вариантов связывания таксола с микротрубочкой – вариант равномерного распределения таксола по всей длине микротрубочки. В этом случае приходится предполагать, что субстехиометрическое связывание таксола с микротрубочкой достаточно для проявления эффектов на параметрах динамической нестабильности. Так, в статье [9] при концентрации таксола 0.1 мкМ соотношение молекул таксола, приходящихся на один димер тубулина, равно 0.014. Иными словами, на 1000 димеров тубулина приходится всего 14 молекул таксола. Это позволяет предполагать, что таксол не полностью насыщает трубочку, а связывается лишь с редкими димерами в её решётке, и этого уже достаточно, чтобы повлиять на параметры её динамической нестабильности.

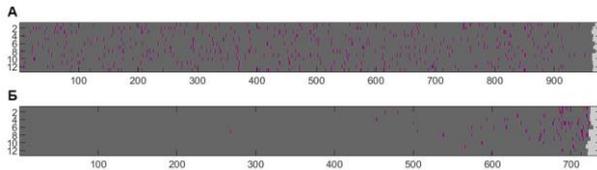


Рис. 4. Два варианта (А, Б) распределения таксола на микротрубочках в двух рассмотренных вариантах связывания таксола. Каждая ячейка показанных решеток соответствует отдельному димеру тубулина. По вертикали – 13 протофиламентов, по горизонтали число ячеек соответствует длине микротрубочки. Фиолетовым – тубулин в комплексе с таксомом, серым – тубулин, не связанный с таксомом, белым – ячейка, не заполненная тубулином.

Так как сайт связывания тубулина с таксомом находится на внутренней стороне β -тубулина, этот вариант может быть объяснён наличием небольших пор в решётке микротрубочки, сквозь которые возможна диффузия малых молекул в просвет трубочки извне.

Другим вариантом присоединения таксола к микротрубочке, основанным на статье [15], является его преимущественное связывание на конце. В статье утверждается, что таксаны преимущественно связываются с концами протофиламентов микротрубочки, плотно заполняя длину около 1 мкм. Основываясь на данных, полученных в результате флуоресцентной микроскопии, авторы утверждают, что эффективная концентрация таксола на конце в таком предположении составляет 0.07–0.14 молей таксола на моль тубулина.

3.3. Параметризация модели

Для развития модели было необходимо определить энергию изгиба $E_{\text{bend_TAX}}$ димера

тубулина, связанного с таксомом. Для каждого из вариантов распределения таксола по микротрубочке была проведена серия симуляций при различном значении этой энергии изгиба. В качестве параметров калибровки были взяты скорость роста микротрубочки и количество катастроф за 30 минут для сравнения с экспериментальными данными, полученными ранее.

На рисунках 5 и 6 приведено сравнение параметров динамической нестабильности микротрубочки, полученных экспериментально, с теми, что были посчитаны в результате моделирования.

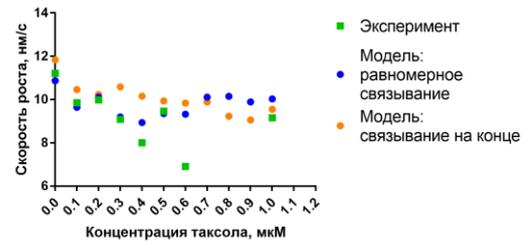


Рис. 5. Сравнение скоростей роста в зависимости от концентрации тубулина, полученных в результате эксперимента и моделирования.

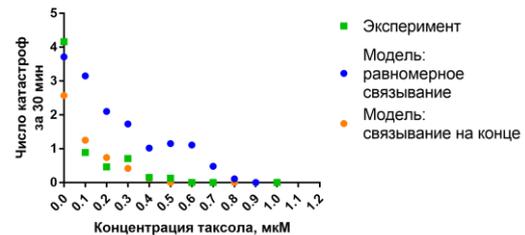


Рис. 6. Сравнение числа катастроф за 30 минут в зависимости от концентрации тубулина, полученного в результате эксперимента и моделирования.

Скорость роста микротрубочки в зависимости от концентрации таксола, полученная в обеих моделях, совпадает со значениями, полученными экспериментально.

Экспериментальное количество катастроф лучше описывается моделью связывания на конце, нежели моделью равномерного распределения по телу микротрубочки. Это подтверждает гипотезу о том, что для таксола более характерно проникновение в просвет микротрубочки при помощи диффузии через открытый конец и дальнейшее связывание с димерами тубулина, имеющими сайт связывания на внутренней стороне.

Для дальнейшего уточнения и развития модели взаимодействия микротрубочки и таксола необходимо провести ряд дополнительных экспериментов. Так, эксперименты по деполимеризации микротрубочек в разных концентрациях таксола могут помочь окончательно определиться с вариантом связывания таксола с микротрубочкой. На рисунке 7 изображена предсказанная зависимость скорости

деполимеризации микротрубочки от концентрации таксола. Проведя серию экспериментов по измерению этой величины, можно будет сравнить из с данными, полученными на основании модели, и сделать вывод о преобладании того или иного варианта связывания таксола с микротрубочкой.

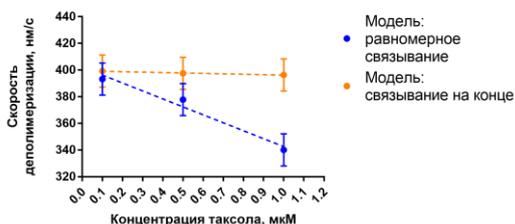


Рис. 7. Сравнение предсказанных зависимостей скоростей деполимеризации от концентрации таксола.

4. Выводы

В рамках работы был предложен механизм влияния молекулы таксола на структуру микротрубочки. Связываясь с димером тубулина, таксол переводит его в промежуточную энергетическую конформацию между ГТФ- и ГДФ-состояниями, тем самым сдвигая равновесие в сторону выпрямления димера. Переход из прямого в изогнутое состояние становится менее вероятен, что влечёт за собой значительное уменьшение частоты катастроф. Достаточно 0,1 мкМ таксола для снижения количества катастроф вдвое.

Описанная модель будет уточнена и усовершенствована в будущем, чтобы покрывать больший объём экспериментальных данных и более полно раскрыть механизм влияния таксола на параметры динамической нестабильности микротрубочек – прежде всего, на скорость деполимеризации и частоту спасений. Это сделает возможным моделирование взаимодействия комбинаций таксола и других препаратов, в частности, противораковых, с целью возможного снижения их дозы в качестве меры уменьшения токсичности и повышения эффективности терапии.

5. Благодарности

Работа была поддержана грантом президента РФ № МК-1869.2020.4.

6. Список литературы

- Walker R.A., O'Brien E.T., Pryer N.K., Soboeiro M.F., Voter W.A., Erickson H.P., Salmon E.D. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* 1988. V. 107. № 4. P. 1437–1448. doi: [10.1083/jcb.107.4.1437](https://doi.org/10.1083/jcb.107.4.1437).
- Mandelkow E.M., Mandelkow E.M., Milligan R.A. Microtubule dynamics and microtubule caps: A time-resolved cryo-electron

- microscopy study. *J. Cell Biol.* 1991. V. 114. № 5. P. 977–991. doi: [10.1083/jcb.114.5.977](https://doi.org/10.1083/jcb.114.5.977).
- Howard W.D., Timasheff S.N. GDP State of Tubulin: Stabilization of Double Rings. *Biochemistry.* 1986. V. 25. № 25. P. 8292–8300. doi: [10.1021/bi00373a025](https://doi.org/10.1021/bi00373a025).
- Hyman A.A., Salser S., Drechsel D.N., Unwin N., Mitchison T.J. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: Information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol. Biol. Cell.* 1992. V. 3. № 10. P. 1155–1167. doi: [10.1091/mbc.3.10.1155](https://doi.org/10.1091/mbc.3.10.1155).
- Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 1984. V. 312. № 5991. P. 237–242. doi: [10.1038/312237a0](https://doi.org/10.1038/312237a0).
- Wade R.H. Microtubules: an overview. *Methods Mol. Med.* 2007. V. 137. P. 1–16. doi: [10.1007/978-1-59745-442-1_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-442-1_1).
- Castle B. Mechanisms of kinetic stabilization by the drugs paclitaxel and vinblastine. *Mol. Biol. Cell.* 2017. V. 28. P. 1238–1257.
- Kellogg E. Insights into the distinct mechanisms of action of taxane and non-taxane microtubule stabilizers from cryo-EM structures. *J. Mol. Biol.* 2017. V. 429. P. 633–646.
- Derry W.B., Wilson L., Jordan M.A. Substoichiometric Binding of Taxol Suppresses Microtubule Dynamics. *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 7. P. 2203–2211. doi: [10.1021/bi00007a014](https://doi.org/10.1021/bi00007a014).
- Magnani M., MacCari G., Andreu J.M., Díaz J.F., Botta M. Possible binding site for paclitaxel at microtubule pores. *FEBS J.* 2009. doi: [10.1111/j.1742-4658.2009.06994.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06994.x).
- Snyder J.P., Nettles J.H., Cornett B., Downing K.H., Nogales E. The binding conformation of Taxol in β -tubulin: A model based on electron crystallographic density. *PNAS.* 2001. doi: [10.1073/pnas.051309398](https://doi.org/10.1073/pnas.051309398).
- Weaver B.A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell.* 2014. V. 25. № 18. P. 2677–2681. doi: [10.1091/mbc.E14-04-0916](https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0916).
- Jordan M.A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents.* 2002. doi: [10.2174/1568011023354290](https://doi.org/10.2174/1568011023354290).
- Elie-Caille C., Severin F., Helenius J., Howard J., Muller D.J., Hyman A.A. Straight GDP-Tubulin Protofilaments Form in the Presence of Taxol. *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 20. P. 1765–1770. doi: [10.1016/j.cub.2007.08.063](https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.063).
- Rai A., Liu T., Glauser S., Katrukha E.A., Estévez-Gallego J., Rodríguez-García R., Fang W.S., Díaz J.F., Steinmetz M.O., Altmann K.H., Kapitein L.C., Moores C.A., Akhmanova A. Taxanes convert regions of perturbed microtubule growth into rescue sites. *Nat. Mater.* 2019. V. 19. № 3. P. 355–365. doi: [10.1038/s41563-019-0546-6](https://doi.org/10.1038/s41563-019-0546-6).