

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи

Вахрушева Анна Владимировна

**Инженерия клеточных моделей для изучения роли септина и виментина с
целью воздействия на клеточные процессы пролиферации и миграции**

03.01.08 — «Биоинженерия»

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва — 2022

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова»

Научный *Соколова Ольга Сергеевна*
руководитель *доктор биологических наук, профессор РАН*

Официальные *Киреев Игорь Игоревич* — доктор биологических наук,
оппоненты *заведующий отделом электронной микроскопии НИИ физико-
химической биологии имени А.Н. Белозёрского МГУ имени М.В.
Ломоносова*

Александрова Антонина Юрьевна — доктор биологических
наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов
канцерогенеза ФГБУ Национального медицинского
исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фёдоров Владимир Андреевич — кандидат физико-
математических наук, научный сотрудник проблемной
лаборатории космической биологии кафедры биофизики
биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится 8 июня 2022 года в 15.00 на заседании
диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73,
Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки
МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский проспект, д. 27) и на
сайте ИАС «Истина»: <https://istina.msu.ru/dissertations/452818172/>

Автореферат разослан __ апреля 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

И.В. Шаповалова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Раковые метастазы вносят более чем 90% вклад в смертность, по сравнению с первичными опухолями (Chaffer *et al.*, 2011; Seyfried *et al.*, 2014). Основными характеристиками метастатических клеток являются их повышенная способность к миграции и пролиферации (Seyfried *et al.*, 2014). Одной из наиболее перспективных областей для лечения и диагностики онкологических заболеваний является разработка способов воздействия на белки цитоскелета, опосредующих миграцию и пролиферацию клеток. В этой связи необходима инженерия клеточных моделей для установления роли цитоскелетных белков в данных процессах и разработка биоинженерных подходов для поиска потенциальных ингибиторов, модулирующих процессы пролиферации и миграции.

До сих пор использование малых молекул на клеточные процессы опухолевых клеток активно осуществлялось через воздействие на микротрубочки и микрофиламенты. В связи с этим прослеживается недостаточная изученность малых молекул, влияющих на другие компоненты цитоскелета.

Белок промежуточных филаментов — виментин — является одним из основных маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), при котором происходит трансформация эпителиальных клеток в подвижные мезенхимальные (Kokkinos *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2018; Usman *et al.*, 2021). ЭМП является одной из основных гипотез появления раковых метастазов, в частности за счёт реорганизации цитоскелета (Sun *et al.*, 2015). Повышенная экспрессия виментина коррелирует с количеством метастазов в лимфатических узлах и неблагоприятным прогнозом при плоскоклеточной карциноме полости рта (Liu *et al.*, 2016), аденокарциноме лёгкого (Richardson *et al.*, 2017).

Нарушение экспрессии септина также часто ассоциировано с онкологическими заболеваниями (Connolly *et al.*, 2011). Септин 9 принимает участие в ЭМП и прогрессии метастатических клеток (Short, 2014; Østevold *et al.*, 2017; Shankar *et al.*, 2010), коррелирует с плохим прогнозом при глиоме (Guodong

et al., 2020), раке молочной железы (Gonzalez *et al.*, 2007; Montagna *et al.*, 2003), яичников (Burrows *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2005) и других типов рака (Bennett *et al.*, 2008; Stanbery *et al.*, 2010), также является предиктивным маркером колоректального рака и его метастазирования (Huang *et al.*, 2022).

В связи с этим разработка биоинженерных моделей для изучения процессов, происходящих при миграции и пролиферации раковых клеток, а также для поиска веществ, влияющих на структурную организацию септиновых и виментиновых филаментов, с потенциальным фокусом на терапию широко распространённых онкологических заболеваний, является актуальной темой для исследований и одной из важнейших задач с практической точки зрения.

Степень разработанности темы исследования

Септины, в частности септин 9, являются важными регуляторами при ЭМП. Подавление их экспрессии приводит к остановке ЭМП и значительному снижению миграции и инвазии метастатических клеток. Напротив, увеличение экспрессии септинов ведёт к возрастанию миграционной подвижности (Gonzalez *et al.*, 2007; Shankar *et al.*, 2010; Dolat *et al.*, 2014; Calvo *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Østevold *et al.*, 2017; Guodong *et al.*, 2020). Помимо этого, септины важны для сборки и работы сократительного кольца у делящихся эукариотических клеток (Mavrikakis *et al.*, 2014). Нарушение функции или удаление разных типов септинов приводит к дефектам в процессе цитокинеза (Kinoshita *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 2005; Spiliotis *et al.*, 2005; Surka *et al.*, 2002; Nagata *et al.*, 2003). Показана важность септина 9 для завершения последних стадий цитокинеза и деления клеток (Estey *et al.*, 2010).

Структурная динамика септинов крайне важна для их многофункциональности и функционирования. Известные соединения, воздействующие на септиновые филаменты, CPPU (FCF — форхлорфенурон) и его модифицированные аналоги (Kim *et al.*, 2020), приводят к стабилизации полимерных структур септинов (Angelis *et al.*, 2014), снижению скорости их

диссоциации и накоплению септиновых агрегатов, приводящих в итоге к митотическим дефектам (Hu *et al.*, 2008). Помимо этого, CPPU имеет и другие неспецифические мишени в клетке (Heasley *et al.*, 2014).

Стоит отметить, что олигомерные формы септинов сохраняют функциональность и могут связываться с актиновыми филаментами (Kinoshita *et al.*, 2002), мембранными компонентами клетки (Bertin *et al.*, 2010), самособираться в кольцевые структуры (Kinoshita *et al.*, 2002) без участия ГТФ и полимеризации в филаменты. В связи с этим предлагается в противовес веществам, формирующим агрегатные септиновые структуры, разработать подход по отбору молекул, нацеленных на ингибирование сборки септинов в филаменты.

Подавление основного маркера ЭМП, виментина, приводит к нарушению процесса заживления ран, потере направленной миграции, уменьшению фокальных контактов и снижению жёсткости клеток. Увеличенная экспрессия виментина, напротив, повышает модуль упругости и подвижность клеток, способствуя формированию специфичного для ЭМП фенотипа (Liu *et al.*, 2015; Xuan *et al.*, 2020).

Среди малых молекул, взаимодействующих с виментиновыми филаментами, наиболее полно исследован Витаферин А, стероидный лактон из растения *Withania somnifera* (Singh *et al.*, 2011). Витаферин связывается не только с центральным доменом виментина (Bargagna-Mohan *et al.*, 2007; Antony *et al.*, 2014; Heyninck *et al.*, 2014; Bargagna-Mohan *et al.*, 2010). Тем не менее, он индуцирует формирование виментиновых агрегатов, вызывающих впоследствии апоптоз клеток (Grin *et al.*, 2012). Схожее воздействие показано для синтетического вещества FiVe1 (Bollong *et al.*, 2017) и Симвастатина (Trogden *et al.*, 2018), которые ингибируют пролиферацию и подвижность раковых клеток. Тем не менее, механизм действия виментиновых филаментов в поддержании миграции клеток остаётся не до конца выясненным.

Цель и задачи работы:

Цель работы заключалась в установлении роли белков септина и виментина в клеточной пролиферации и миграции для поиска ингибиторов этих процессов в раковых клетках.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Получить биоинженерными методами белки Hof1, мономеры септинов Cdc11, Cdc12, Cdc3 и Cdc10, а также их филаментные формы;
- 2) Охарактеризовать солокализацию септинов и актина в присутствии и отсутствии белка Hof1 *in vitro* и *in vivo* с помощью разработанной клеточной системы дрожжей;
- 3) Методом виртуального скрининга отобрать соединения, нарушающие полимеризацию септиновых филаментов, и изучить их влияние на структуру филаментов и пролиферацию раковых клеток;
- 4) Разработать биоинженерную клеточную систему с разными формами виментина и нокаутированным виментином для изучения направленной миграции фибробластов;
- 5) Разработать модельную систему для определения биомеханических свойств на противоположных концах мигрирующих клеток методом атомно-силовой спектроскопии;
- 6) Методом виртуального скрининга отобрать соединения, потенциально влияющие на взаимодействие в комплексе виментин-плектин, и изучить их влияние на биомеханические свойства и миграцию фибробластов.

Научная новизна

Впервые показана способность септиновых филаментов взаимодействовать как напрямую, так и опосредованно через актин-связывающий белок Hof1 с актиновыми филаментами на модельной системе делящихся клеток дрожжей. Впервые предложен подход к ингибированию полимеризации септинов в филаментные структуры для воздействия на процесс клеточной пролиферации.

Методом виртуального скрининга отобрано соединение Процианидин ВЗ, воздействующее на формирование полимерных структур и замедляющее процесс пролиферации у раковых клеток.

В работе впервые предложена модель регуляции направленной клеточной миграции путём поддержания жёсткости на лидирующем крае клетки через виментин-плектин-актиновые взаимодействия и рассмотрен подход по воздействию на процесс миграции через ингибирование данных взаимодействий. Для этого была разработана экспериментальная система для измерения жёсткости на противоположных краях мигрирующих клеток и установлено, что короткая форма виментиновых филаментов (ULF — unit-length filament) также участвует в поддержании жёсткости и направленной миграции. Впервые построена *in silico* структура 5 домена плектина с линкером и белок-белковый комплекс виментина с плектином, на основе которого методом виртуального скрининга отобрано соединение Паромомицин, препятствующее белок-белковому взаимодействию. Паромомицин оказал влияние на локализацию виментиновых филаментов в клетке и уменьшил миграционные свойства клеток путём снижения жёсткости на лидирующем крае.

Теоретическая и практическая значимость

Разработанная система определения жёсткости мигрирующих клеток может применяться для поиска ингибиторов, влияющих на направленную миграцию. Полученные в работе данные могут послужить основой для дальнейшей оптимизации малых молекул-ингибиторов, влияющих на структурно-функциональные свойства виментина и септина, процессы миграции и пролиферации, а также для изучения роли септина и виментина в других клеточных процессах.

Методология исследования

Использован комплекс структурных, генно-инженерных, молекулярно-биологических, иммунохимических методов исследования, а также работа с культурами клеток, молекулярное моделирование и докинг.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Септины в месте деления клеток являются актин-координирующим центром, они взаимодействуют с актином как напрямую, так и опосредованно через актин-связывающие белки типа Hof1.
- 2) Потенциальный ингибитор септин-септинового взаимодействия, Процианидин В3, приводит к снижению полимеризации септинов и замедляет процесс пролиферации раковых клеток.
- 3) Направленность клеточной миграции не зависит от полноты сборки виментиновых филаментов. Клетки с мутантным виментином в виде ULF сохраняют жёсткость на лидирующем крае и направленную миграцию.
- 4) Предложена гипотеза о том, что взаимодействие между ULF и актином происходит посредством адаптерного белка плектина. Потенциальный ингибитор виментин-плектинового взаимодействия, Паромомицин, приводит к локализации виментина в перинуклеарной области, снижает жёсткость на лидирующем крае и направленную миграцию клеток.
- 5) Разработанная модельная система по измерению биомеханических свойств на противоположных краях клеток может использоваться для отбора веществ, воздействующих на цитоскелет и процесс клеточной миграции.

Степень достоверности данных

Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, определяется репрезентативным объёмом проведённых экспериментальных исследований, комплексным применением современных методов исследования и подтверждается статистической обработкой полученных данных.

Личный вклад автора

Автору диссертационного исследования принадлежит ключевая роль в постановке целей и формулировке задач, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке тезисов и публикаций по теме исследования.

Связь с государственными программами

Диссертационная работа выполнена при поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№ 19-34-90178).

Апробация диссертации

Полученные в ходе работы результаты были доложены на 10 российских и зарубежных международных конференциях, таких как FEBS (2018, 2019, 2021), Microscopy and Microanalysis (2018, 2019, 2020), XXVIII Российская конференция по электронной микроскопии "Современные методы электронной, зондовой микроскопии и комплементарных методов исследований наноструктур и наноматериалов" (2020), VI съезд биофизиков России (2019), Зимняя молодёжная школа по биофизике и молекулярной биологии (2019), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018». Результаты докладывались на научных семинарах группы структурной биотехнологии кафедры биоинженерии и кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

Публикации

По материалам работы было опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 8 глав и 12 подглав результатов собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов, благодарностей, списка литературы. Работа изложена на 150 страницах компьютерного текста, содержит 9 таблиц, 43 рисунка. Список литературы включает 298 источник.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Атомно-силовая спектроскопия и измерение модуля Юнга клеток.

Измерение жёсткости клеток проводилось с помощью атомно-силового микроскопа в режиме спектроскопии. Для работы с клетками использовались зонды, модифицированные полистероновой микросферой и зонды в форме лопасти. Численная обработка силовых кривых была выполнена с помощью программы MATLAB (The MathWorks, Natick, MA) и с использованием скорректированной модели Герца.

Методы молекулярного моделирования и виртуального скрининга.

Виртуальный скрининг и докинг, молекулярная динамика проводились с использованием программных пакетов Schrödinger LLC (New York, USA), GROMACS 4.5.5 (Pronk *et al.*, 2013) на суперкомпьютере “Ломоносов”.

Выделение и очистка белков. Экспрессия белка Hof1 и четырёх мономеров септинов Cdc11, Cdc12, Cdc3 и Cdc10, формирующих филаменты, проводилась в клетках *Escherichia coli* (штамм BL21). Очистка проводилась с помощью металл-аффинной и ионообменной хроматографий (носители HisTrap и HiTrapQ). Чистоту определяли с помощью электрофореза (Laemmli *et al.*, 1970).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Образцы (очищенные белки или комплексы с лигандами) наносились на медную сетку, покрытую углеродной подложкой (Ted Pella), предварительно обработанную в атмосфере тлеющего разряда, и окрашивались 1% водным раствором уранилацетата. Микрографии были получены на просвечивающем электронном микроскопе JEOL2100 (JEOL, Japan) при ускоряющем напряжении в 200 кВ.

Клеточные линии. Клеточные линии эмбриональных фибробластов крысы REF-/-, REF_52 и REF_117, а также MDA-MB-231 культивировали в среде DMEM (PanEco, Moscow, Russia) с 10% фетальной бычьей сывороткой (HyClone, Logan, UT) при 37°C в инкубаторе в 5%-ой атмосфере CO₂ (Sanyo, Moriguchi, Japan).

Малые молекулы. Процианидин B3 (CAS 23567-23-9, Xi'an Plant Bio-engineering) и CPPU (CAS 68157-60-8, Shanghai Huirui Chemical Technology Co., Ltd) разводили в ДМСО; Амикацин (CAS 39831-55-5, Shanghai Huirui Chemical Technology Co., Ltd) и Паромомицин (CAS 1263-89-4, Shanghai Huirui Chemical Technology Co., Ltd) разводили в дистиллированной воде до нужных концентраций.

Связывание белков с лигандами. Комплексы белков с малыми молекулами были сформированы путём инкубации при комнатной температуре в течение 30 мин, далее несвязавшийся лиганд отделяли путём фильтрации на Microcon-30кДа фильтрах (Millipore, Merck, Germany). Последующее измерение концентраций проводили на спектрофотометре Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) в диапазоне 200-600 нм.

Иммунофлуоресценция. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом 10 минут при комнатной температуре, пермеабелизацию осуществляли 0,25% Triton X-100. Блокирование неспецифического связывания проводили в фосфатно-солевом буфере с 0,1% Tween, 1% BSA и 22,5 мг/мл глицина. Используемые первичные антитела: к септину (PA5-100077, ThermoFisher, USA), к виментину (OMA1-06001, ThermoFisher, USA), к плектину (MA5-32102, ThermoFisher, USA). Соответствующие вторичные антитела с меткой Alexa Fluor 594/488 (Abcam, Great Britain) добавляли к клеткам. Флуоресцентный сигнал регистрировали на микроскопе Axio Lab.A (Zeiss, Germany). Данные обрабатывали в программе ImageJ (Rueden *et al.*, 2017).

Модель «рана монослоя» (Wound healing assay). В сформированном монослое клеток стерильным 10-мкл наконечником прочерчивалась «рана». Процесс застывания раневой поверхности анализировали в течение 0, 24 и 48

часов с помощью микроскопа Axio Lab.A (Zeiss, Germany). Изображения обрабатывались в программе ImageJ (Rueden *et al.*, 2017).

Измерение клеточной пролиферации и жизнеспособности. Клетки обрабатывали разными концентрациями исследуемых малых молекул. По истечении 24-72 часов клетки собирали путём трипсинизации и подсчитывали с помощью гемоцитометра. Краситель трипановый синий использовали для подсчёта живых и мёртвых клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

СЕПТИНЫ

Септины координируют расположение актиновых филаментов у делящихся клеток через белок Hof1

Септины являются важными компонентами для сборки и работы сократительного кольца у делящихся клеток. Нарушение их функционирования ведёт к дефектам цитокинеза (Nagata *et al.*, 2003; Spiliotis *et al.*, 2005). С использованием дрожжевой модели (Garabedian *et al.*, 2020) нами было показано, что в месте отпочковывания дочерней клетки у *Saccharomyces cerevisiae* актин-связывающий белок Hof1 ассоциирован одновременно с актиновыми и септиновыми филаментами (Рисунок 1Б). Септины также могут напрямую, однако менее эффективно связывать актиновые филаменты *in vitro* (Рисунок 1Б). Мы подтвердили, что септины являются актин-организующим центром при делении клеток. Нарушение их полимеризации должно предотвращать формирование септинового кольца в месте разделения клеток и, в свою очередь, вести к снижению пролиферации (Рисунок 1В).

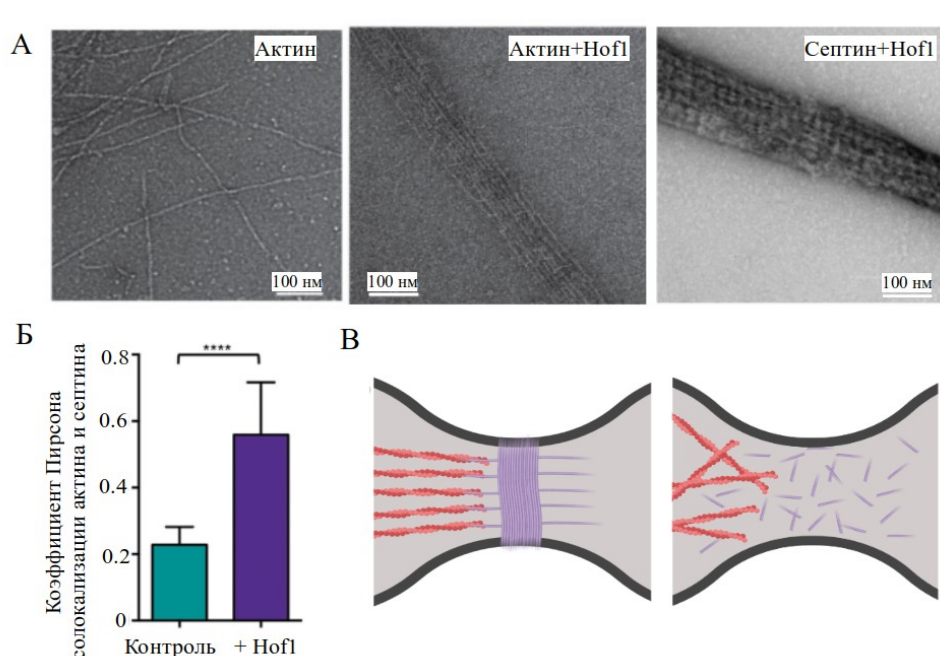


Рисунок 1. (А) Изображения ПЭМ негативно окрашенных актиновых и септиновых филаментов с Hof1-FL. (Б) Солокализация актиновых и септиновых филаментов в контроле и с Hof1 (**** $p \leq 0.0001$). (В) Схема септин-организующего центра актиновых филаментов в месте разделения клеток (слева); гипотеза о нарушении септин-организующего центра (справа); красным показан актин, фиолетовым — септин.

Данная гипотеза была взята за основу для поиска малой молекулы, способной нарушить пролиферацию раковых клеток за счёт ингибирования взаимодействия между септиновыми субъединицами.

В качестве таргетной молекулы для поиска использовалась кристаллическая структура септина 9 (PDB ID 5CYP), так как эта субъединица является замыкающей и соединяет октамеры септинов в филаменты (Kim *et al.*, 2011). Помимо этого, септин 9 имеет треониновый остаток, необходимый для гидролиза ГТФ (Spiliotis *et al.*, 2018).

Так как септинам необходим ГТФ для полимеризации и стабилизации структуры, то были проанализированы две модели конформационного состояния септина 9: димер со связанным ГТФ и мономер без ГТФ. Были зафиксированы определённые различия в мономерной структуре септина без ГТФ, что далее использовалось для построения фармакофора и виртуального скрининга соединений.

В результате было отобрано вещество Процианидин В3 (ПВ3), показавшее способность связываться с консервативным ГТФ-сайтом септина и блокировать связывание ГТФ, при этом оно не стабилизировало димерную форму септина (Vakhrusheva *et al.*, 2021) (Рисунок 2).

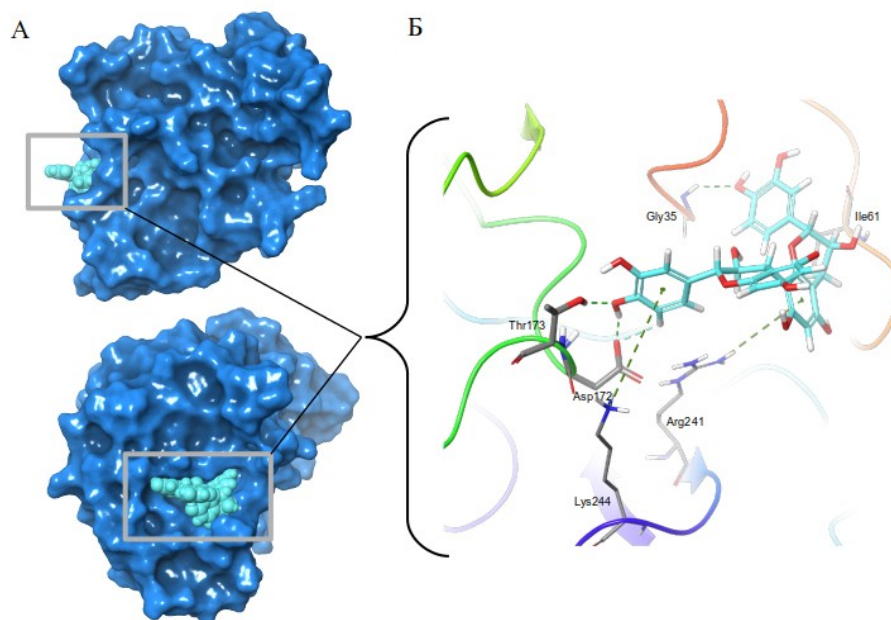


Рисунок 2. Комплекс септина 9 и ПВЗ (А) в виде поверхности: синий — септин 9, бирюзовый — ПВЗ; (Б) приближенный вид ПВЗ (бирюзовый) в сайте связывания септина 9.

Процианидин ВЗ снижает полимеризацию септиновых филаментов

Для *in vitro* тестирования влияния ПВЗ на структуру септинов была отработана методика их экспрессии и выделения (см. Методы), а также олигомеризации. Связывание ПВЗ с септинами было оценено с помощью 30 кДа фильтра, пропускающего только несвязавшиеся малые молекулы (Рисунок 3). Процент несвязавшегося ПВЗ варьировал от 10 до 55% в зависимости от

молярного соотношения септин-ПВЗ (Рисунок 3).

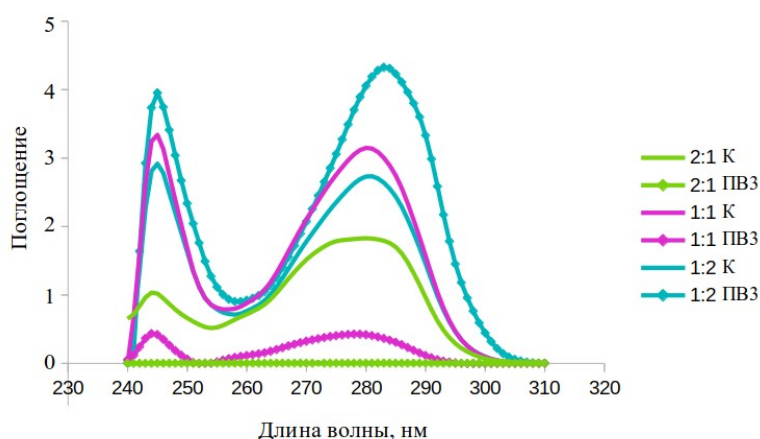


Рисунок 3. Спектр поглощения комплексов септина с ПВЗ (К) и несвязавшихся молекул ПВЗ (ПВЗ); различными цветами показаны молярные соотношения септин-ПВЗ.

С помощью ПЭМ мы показали, что при инкубации септинов с ПВЗ филаментные структуры не формировались, в отличие от контроля (Рисунок 4А). Построенная 3Д-модель электронной плотности на основе септиновых

субъединиц, собранных с подложки в контрольном образце, соответствовала октамерной форме септина (Рисунок 4Б, снизу). Добавление ПВЗ приводило к образованию преимущественно гексамерных единиц (Рисунок 4Б, сверху) и препятствовало формированию септиновых филаментов.

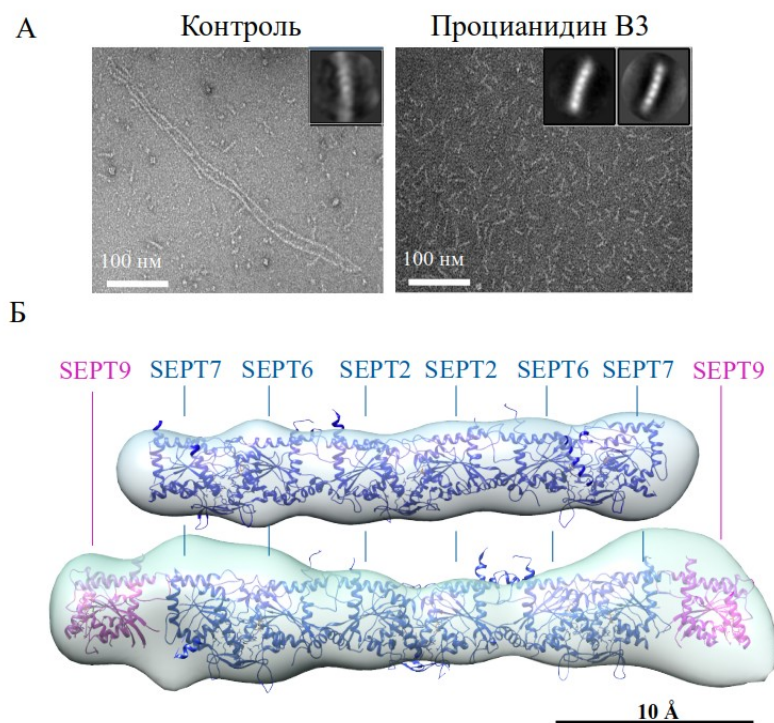


Рисунок 4. (А) Электронная микроскопия септинов в отсутствие и присутствии ПВЗ; врезки — 2D-классы октамера и гексамера, соответственно. (Б) 3Д-модель электронной плотности гексамерной (сверху) и октамерной (снизу) септиновой субъединицы со вставленными структурами гексамера септина (PDB ID 7M6J, синий) и мономера септина 9 (PDB ID 5CYP, розовый); SEPT = септин.

ПВЗ влиял на морфологию клеток, воздействуя на клеточный цитоскелет. Контрольные клетки имели характерную для фибробластов вытянутую форму с длинными отростками (Рисунок 5А). Клетки, инкубированные с найденным нами соединением ПВЗ и ранее известным синтетическим ингибитором септинов CPPU (Angelis *et al.*, 2014), приобретали более округлую форму и были, соответственно, в 1,5-3 раза короче контрольных (Рисунок 5Б).

Известно, что септины, в частности септин 9, необходимы для завершения последних этапов цитокинеза, когда они участвуют в формировании септинового кольца (Kremer *et al.*, 2005; Spiliotis *et al.*, 2005; Estey *et al.*, 2010). В связи с этим интенсивность флуоресценции септинов в области формирования перетяжки у делящейся клетки использовалась для идентификации клеток на последних фазах митоза (Рисунок 5В, жёлтая линия). Нормализованная интенсивность у

контрольных делящихся клеток в межъядерной области была примерно на 40% выше, по сравнению со значениями у клеток, находящихся на ранних фазах митотического цикла.

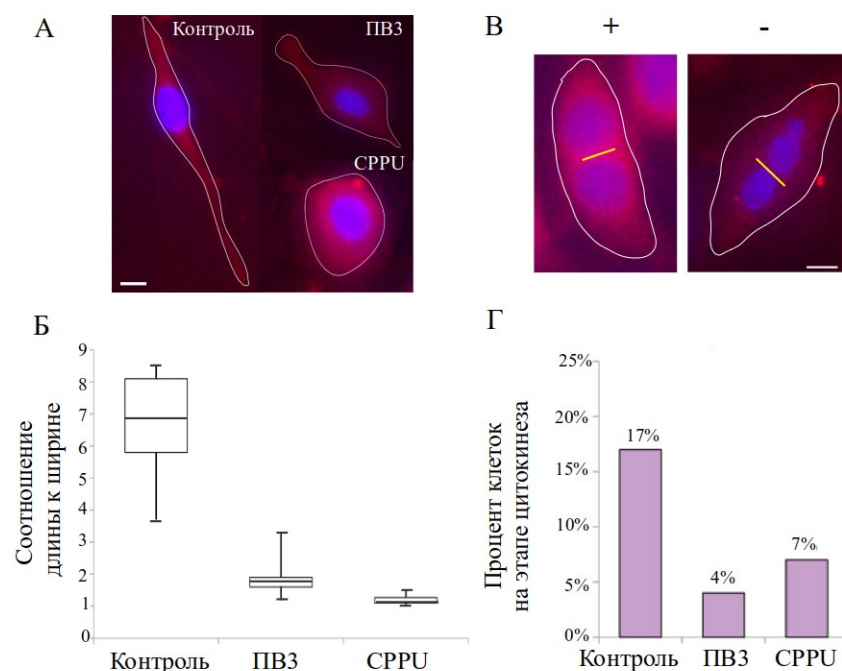


Рисунок 5.

(А) Иммунофлюоресценция клеток REF_52 с ПВЗ и CPPU (окрашивание антителами к септину — красный, DAPI — синий); масштабный отрезок 10 мкм. (Б) График соотношения длины клеток к ширине ($n=45$). (В) Репрезентативные снимки клеток REF_52, подходящих под параметр последних этапов цитокинеза (слева) и нет (справа); масштабный отрезок 5 мкм. (Г) График процентного соотношения клеток на этапе цитокинеза от числа делящихся клеток ($n=280$); $p < 0.05$.

Используя данный параметр, было определено, что количество клеток, обработанных ПВЗ или CPPU и находящихся на последних этапах цитокинеза, было в 3-4 раза меньше (Рисунок 5Г), несмотря на большее количество делящихся клеток. Предполагается, что оба вещества нарушали формирование септинового кольца и успешное разделение клеток.

Процианидин ВЗ снижает пролиферацию и жизнеспособность клеток рака молочной железы

Клетки рака молочной железы MDA-MB-231, обработанные 50 мкМ ПВЗ, показали снижение пролиферативной способности на 50% с дальнейшим дозозависимым уменьшением до 98% (Рисунок 6).

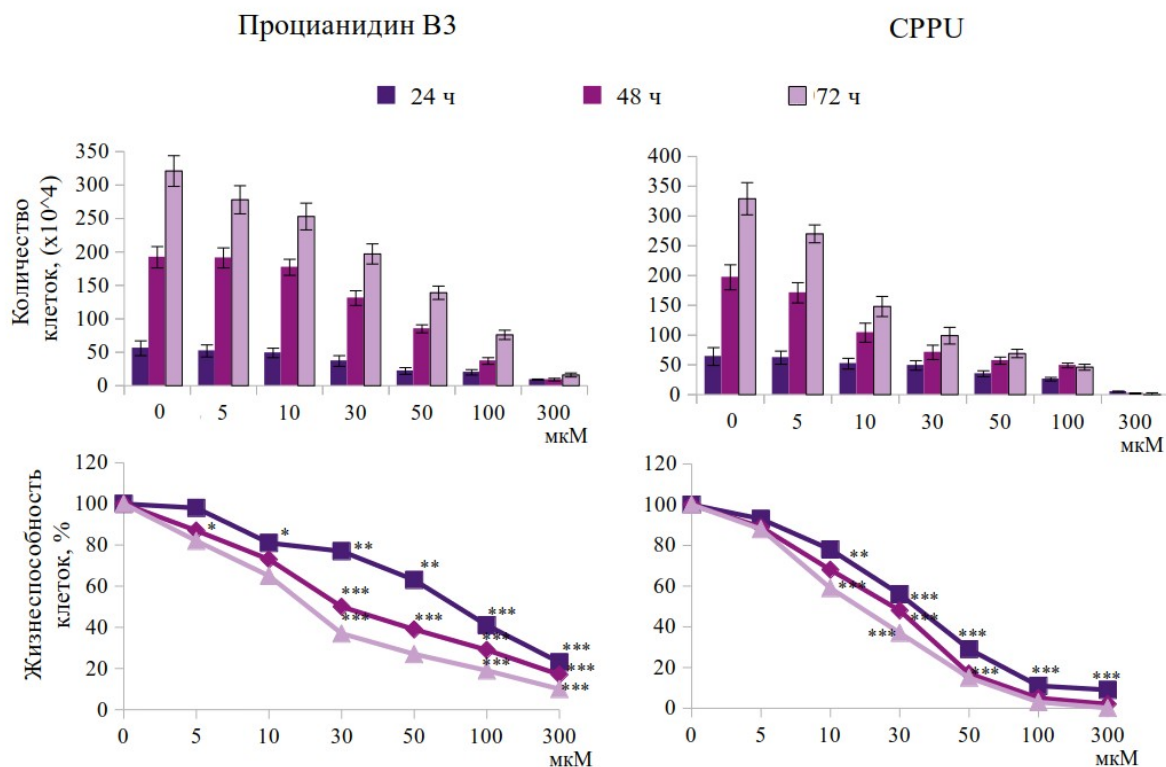


Рисунок 6. Оценка пролиферативной способности и жизнеспособности клеток рака молочной железы MDA-MB-231, обработанных различными концентрациями ПВЗ или CPPU в течение 24, 48 и 72 часов; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Соединение CPPU действовало более эффективно, показав значительное снижение пролиферации уже при 10 мкМ на 50%. Однако, жизнеспособность клеток, обработанных CPPU, была намного ниже в сравнении с ПВЗ, и при концентрации 100 мкМ составляла менее 10%. У клеток с ПВЗ она сохранялась на уровне 20-50% при той же концентрации.

Различия воздействия молекул, вероятно, связаны с разными механизмами. CPPU приводит к образованию агрегатов и невозможности дальнейшего функционирования клетки. При применении ПВЗ остаются олигомерные формы септинов, которые частично могут замещать функции филаментов и замедлять клеточные процессы, в частности пролиферацию.

ВИМЕНТИН

Направленность клеточной миграции не зависит от степени сборки виментиновых филаментов

Для исследования роли виментиновых филаментов в процессе миграции клеток *in vitro* использовались следующие типы клеток: эмбриональные фибробласты крысы (REF) с нормальными виментиновыми филаментами (контроль, REF_52), с нокаутным виментином (REF-/-), а также с виментином, мутированным по аминокислотному остатку Y117L (REF_117), образующим ULF (Рисунок 7А). Все клетки имели одинаковую скорость миграции. При этом клетки с виментином (REF_52 и REF_117), дольше сохраняли направленность движения, по сравнению с клетками без виментина (REF-/-), которые чаще поворачивали (Рисунок 7Б).

Было предположено, что виментин принимает участие в обеспечении направленности движения клеток в независимости от уровня сборки филаментов. Для проверки этой гипотезы измерялась жёсткость на противоположных краях мигрирующих клеток.

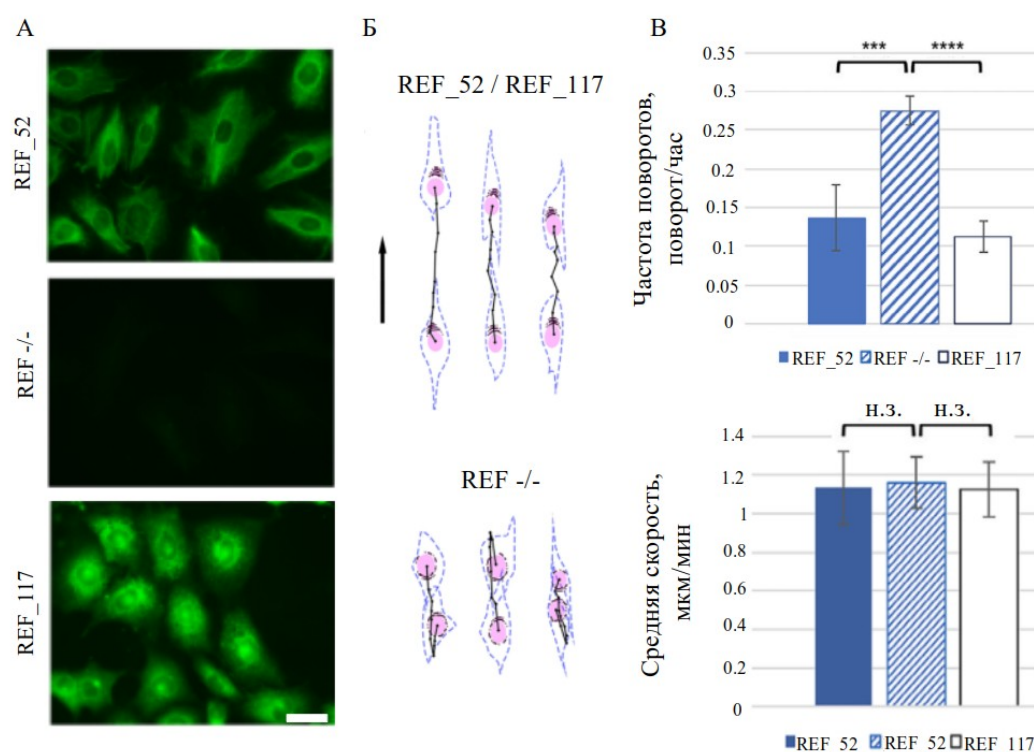


Рисунок 7. (А) Флуоресцентная визуализация фибробластов REF_52 дикого типа, REF-/- с нокаутом виментина и REF_117 с мутацией Y117L (ULF). Виментин обозначен зелёным цветом, масштабный отрезок 20 мкм. (Б) Схематическое изображение траектории движений клеток. (В) График частоты поворотов и график средней скорости движения трёх типов REF ($n=30$); *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, н.з. — не значимо.

скорости движения трёх типов REF ($n=30$); *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, н.з. — не значимо.

Для фиксации клеток в вытянутом положении была разработана экспериментальная система (Vakhrusheva *et al.*, 2019), представляющая рельефную подложку с продольными желобами на расстоянии 1.70 ± 0.02 мкм друг от друга и глубиной 350 ± 7 нм (Рисунок 8А).

Клетки мигрировали вдоль этих желобков, принимая вытянутую форму, таким образом, позволяя провести измерения на лидирующем и заднем краях клетки независимо. Лидирующий край клетки определялся в экспериментах с помощью флуоресцентной микроскопии по локализации относительно ядра клетки аппарата Гольджи, окрашенного С6-NBD-керамидом.

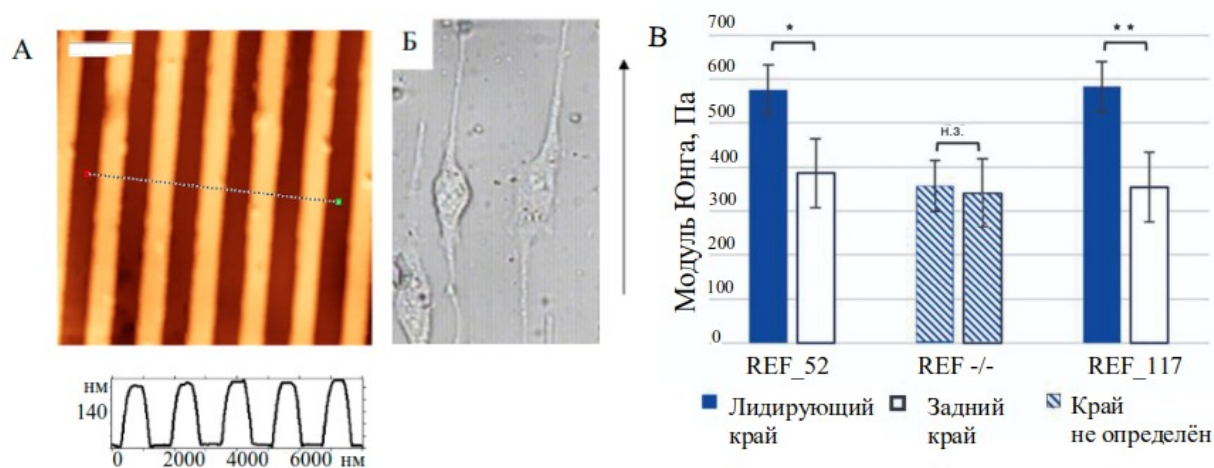


Рисунок 8. (А) Модельная система подложки для измерения модуля Юнга на противоположных краях мигрирующих клеток. (Б) Мигрирующие клетки вдоль желобов подложки. (В) Модуль Юнга, измеренный на противоположных краях клеток REF_52, REF_117 и REF -/- ($n=52$); * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, н.з. — не значимо.

Измерения модуля Юнга проводились на лидирующем и заднем краях клеток с помощью атомно-силовой спектроскопии. Большинство клеток с виментиновыми филаментами (REF_52) и с ULF (REF_117) имели в два раза большую жёсткость на переднем крае (порядка 550 Па), по сравнению с задним (порядка 350 Па). В клетках, нокаутных по виментину (REF-/-) жёсткость была одинакова на двух противоположных краях (по 360 Па) (Рисунок 8Б).

Таким образом, степень сборки виментиновых филаментов не важна для сохранения направленности клеточной миграции. Основную роль в миграции клеток играют актиновые филаменты, которые взаимодействуют с виментином

через белок-адаптер плектин (Jiu *et al.*, 2015). Нами была предложена гипотеза, объясняющая сохранение жёсткости на лидирующем крае клеток с ULF (Рисунок 9). Так как размеры ULF виментина намного меньше виментиновых филаментов, то это не позволяет формировать перпендикулярное расположение актина-виментина. Мы полагаем, что в случае ULF их соединение через плектин с актином происходит при скрещивании и уменьшении угла между актиновыми фибриллами.

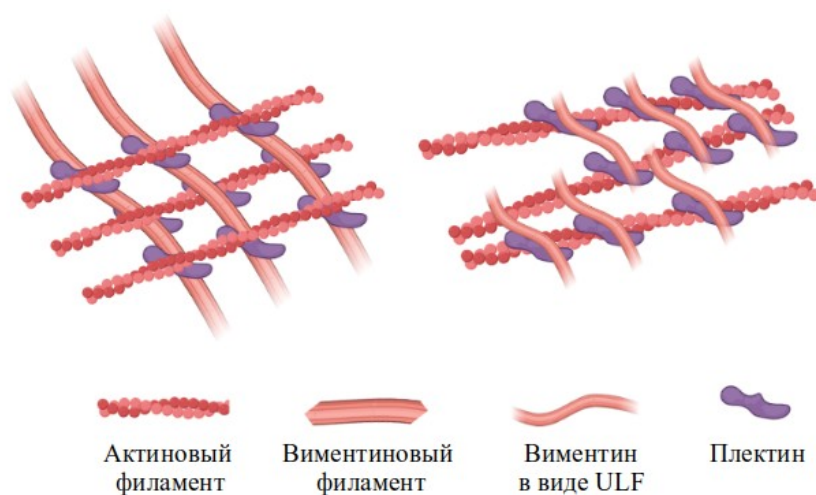


Рисунок 9. Модель взаимодействий разных форм виментина с актином через плектин (слева — полноразмерные филаменты, справа — ULF).

Для тестирования гипотезы мы использовали молекулярное моделирование для построения белок-белкового комплекса виментина с плектином на основе известных литературных данных (Nikolic *et al.*, 1996; Foisner *et al.*, 1988; Steinbock *et al.*, 2000; Favre *et al.*, 2011). Модель 5 PRD плектина с линкером была построена по гомологии с десмоплакином (PDB ID 5DZZ) и линкером периплакина (PDB ID 4Q28). Далее была проведена молекулярная динамика в течение 300 нс для уравнивания полученной системы и белок-белковый докинг полученной структуры с участком сегмента 1B виментина (PDB ID 3UF1) (Рисунок 10А).

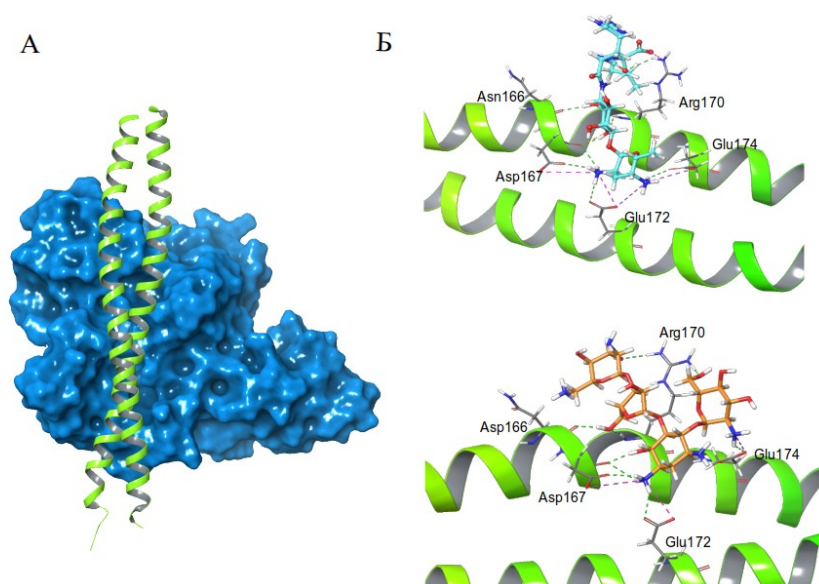


Рисунок 10.
(А) Результаты белок-белкового докинга (виментин — зелёный; 5 PRD домен плектина с линкером — синяя поверхность;
(Б) Докинг малой молекулы Амикацина (бирюзовый) и Паромомицина (оранжевый) на виментиновый 1В сегмент.

Взаимодействия в комплексе были проанализированы и

построен фармакофор для скрининга библиотеки малых молекул, нацеленных на ингибирование взаимодействия виментин-плектин. В результате были отобраны две молекулы с потенциально высокой аффинностью к виментину — антибиотики аминогликозидного ряда — Амикацин и Паромомицин (Рисунок 10Б).

Паромомицин и Амикацин изменяют локализацию элементов цитоскелета

Связывание малых молекул, Паромомицина и Амикацина, было оценено с помощью элюирования белок-лигандных комплексов через фильтр, пропускающий только несвязавшиеся малые молекулы (Таблица 1).

Таблица 1 — Процент связавшихся молекул с виментином при различном молярном соотношении

Молярное соотношение виментин-молекула	Процент, связавшегося Паромомицина с виментином	Процент, не связавшегося Паромомицина с виментином	Процент, связавшегося Амикацина с виментином	Процент, не связавшегося Амикацина с виментином
2:1	100%	0%	50%	50%
1:1	100%	0%	10%	90%
1:2	70%	30%	15%	85%

Паромомицин в значительной мере связывался с виментином, при его избытке видимо, наблюдалось неспецифическое связывание. Амикацин в наших экспериментах связывался с виментином значительно слабее (Таблица 1).

Статистический анализ профилей, измеренных вдоль клеток (Рисунок 11А, жёлтая линия), интенсивности флуоресценции по виментину показал, что при добавлении к клеткам Паромомицина, виментин преимущественно локализуется вокруг ядра, вне связи с плектином (Рисунок 11А, середина). Это может свидетельствовать о нарушении виментин-пектин-актинового взаимодействия. Инкубация с Амикацином приводила к локализации виментина (Рисунок 11Б) с плектином в одном конце клетки и снижала количество актиновых филаментов (Рисунок 11А, справа).

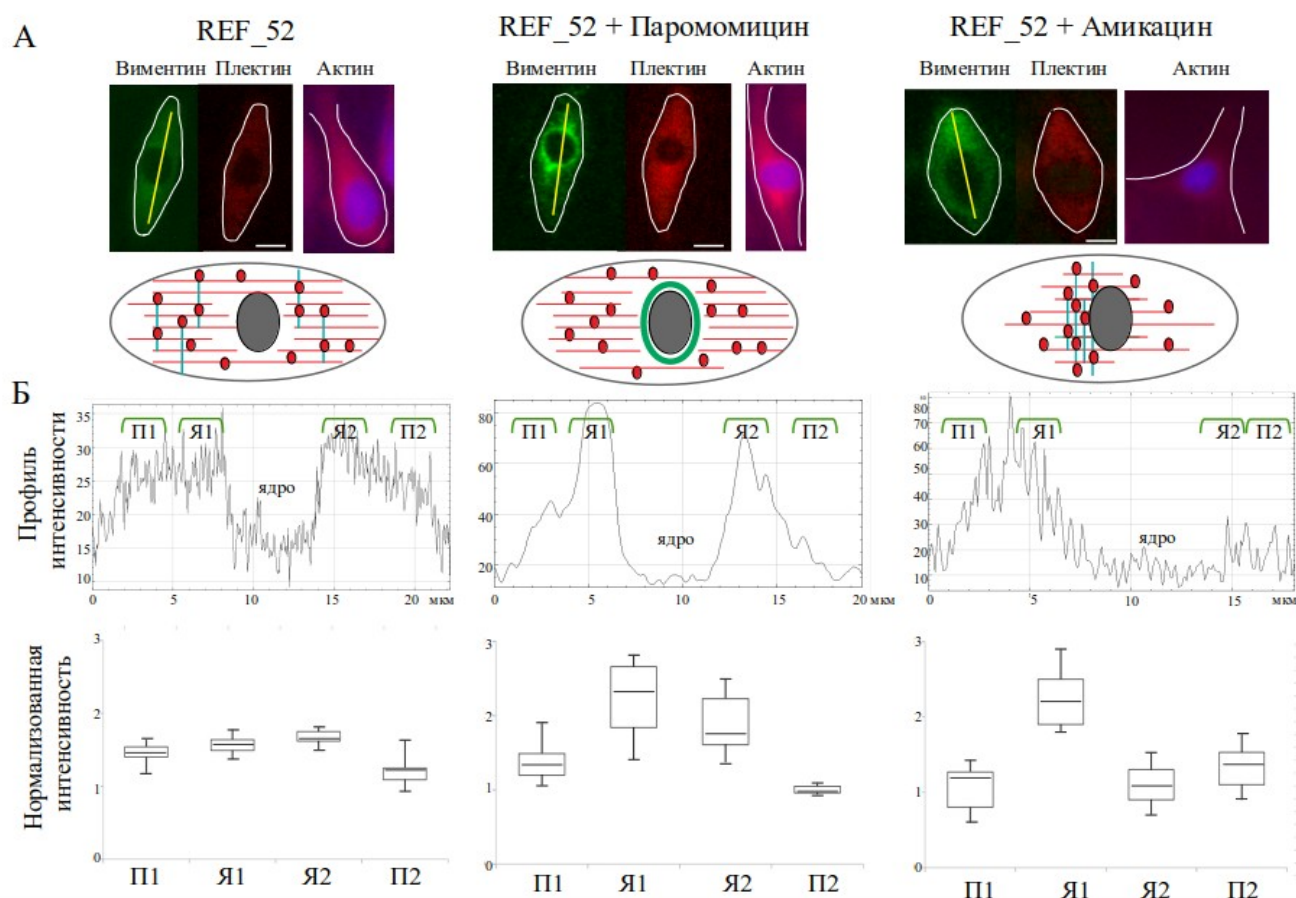


Рисунок 11. (А) Иммунофлуоресценция клеток REF_52 с Паромомицином и Амикацином (окрашивание антителами к виментину (зелёный), плектину (красный), актина фаллоидином (красный) и DAPI (синий). Жёлтой линией обозначен продольный срез клеток; масштабный отрезок 5 мкм. Ниже приведены схемы организации цитоскелета (виментин — зелёный, актин — красный, пектин — красные круги). (Б) Профили интенсивности флуоресцентного сигнала по виментину. Ниже нормализованные значения по регионам клетки (П — периферийная область, Я — околоядерная область) ($n=45$); $p < 0.05$.

Паромомицин и Амикацин снижают жёсткость на лидирующем крае клеток и направленную миграцию, воздействуя через разные механизмы

Добавление к клеткам Амикацина и Паромомицина достоверно снижало жёсткость на лидирующем крае у клеток REF_52 и REF_117 (Рисунок 12), а также приводило к дозозависимому замедлению закрытия раневой поверхности и направленной миграции клеток в рану при увеличивающихся концентрациях малых молекул.

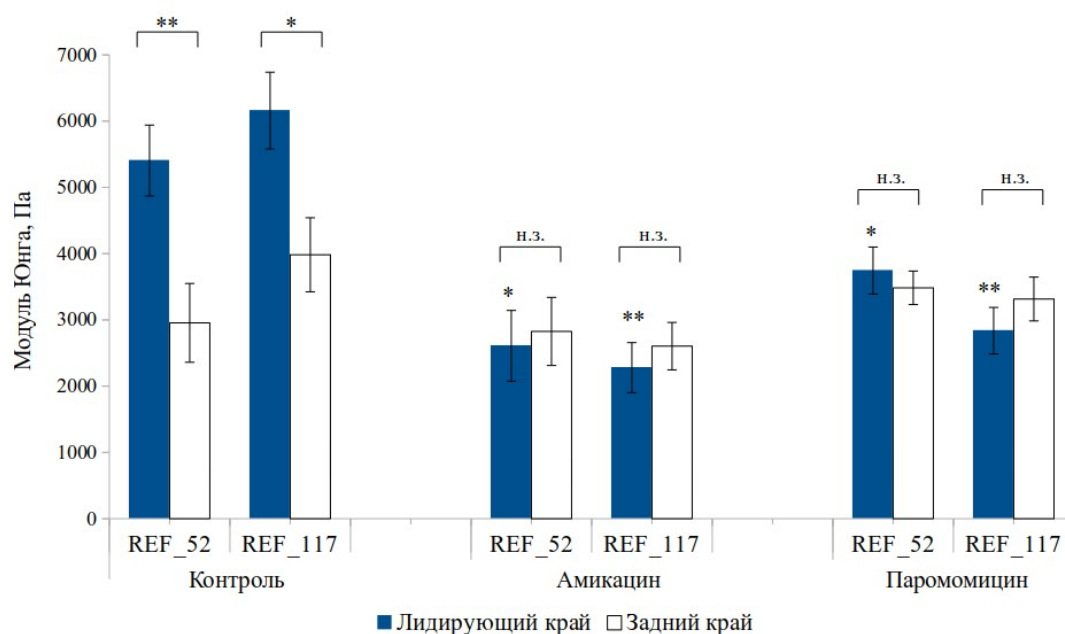


Рисунок 12. Измерение средних значений модуля Юнга (Па) при воздействии Амикацина и Паромомицина на клеточные линии REF_52 и REF_117; ($n=90$); * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, н.з. — не значимо.

Снижение миграции было более выражено при воздействии Амикацина видимо, из-за разборки актинового цитоскелета (Wang *et al.*, 2020). Паромомицин замедлял миграцию клеток за счёт ингибирования взаимодействия виментина с плектином; при концентрации 100 мкМ миграция снизилась более, чем на 50%. Данный эффект был особенно выражен для клеток REF_117 с виментином в виде ULF (снижение миграционных свойств при добавлении 10-50 мкМ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе разработаны биоинженерные подходы к изучению структурно-функциональных свойств цитоскелетных белков септина и виментина на процессы клеточной пролиферации и миграции. Мы подтвердили, что септины являются основополагающим компонентом для организации актиновых филаментов на последних этапах цитокинеза и координируют данный процесс, в частности, через взаимодействие с актин-связывающим белком Hof1. Также мы показали, что виментин независимо от его сборки (полноразмерные филаменты или ULF) определяет направленность клеточной миграции. Таким образом, поиск малых молекул, влияющих на виментиновые и септиновые филаменты, представляет как фундаментальный, так и практический интерес. До сих пор использование малых молекул активно применялось в основном для воздействия на микротрубочки и микрофиламенты. Разработанная нами экспериментальная система по измерению биомеханических свойств на противоположных краях клеток может использоваться для отбора потенциальных ингибиторов, воздействующих на цитоскелет и процесс клеточной миграции.

Методом виртуального скрининга библиотеки соединений *in silico* были отобраны малые молекулы: Процианидин В3, предотвращающий полимеризацию септинов, и Паромомицин, ингибирующий виментин-плектиновое взаимодействие. Было продемонстрировано, что Процианидин В3 замедляет процесс пролиферации раковых клеток, а Паромомицин нарушает направленную миграцию клеток. Найденные соединения достоверно нарушали взаимодействия элементов цитоскелета, что может иметь потенциал для практического применения в лечении заболеваний, в том числе онкологических.

Выводы

- 1) Септины играют ведущую роль в организации актинового цитоскелета у почкующихся дрожжей путём привлечения актин-связывающих белков типа Hof1 для упорядочивания актиновых филаментов в месте деления клеток;
- 2) Процианидин В3 препятствует полимеризации септиновых филаментов и ведёт к преимущественному преобладанию гексамерных форм септина *in vitro*. Процианидин В3 дозозависимо снижает пролиферацию и жизнеспособность клеток рака молочной железы;
- 3) Направленность миграции фибробластов не зависит от степени сборки виментиновых филаментов, а поддерживается за счёт повышенной жёсткости на лидирующем крае клетки за счёт взаимодействий виментин-плектин-актин;
- 4) Паромомицин нарушает взаимодействие виментина с плектином, а Амикацин воздействует на полимеризацию актиновых филаментов. Оба вещества снижают жёсткость на лидирующем крае и направленную миграцию клеток;
- 5) Разработанная модельная система по измерению биомеханических свойств на противоположных краях клеток может использоваться для отбора соединений, воздействующих на цитоскелет и процесс клеточной миграции;
- 6) Разработка биоинженерных подходов к ингибированию септин-септинового и виментин-плектинового взаимодействий представляет практический интерес для разработки лекарственных препаратов, подавляющих пролиферацию и миграцию раковых клеток.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI¹

- 1) **Вахрушева А.В.**, Кудрявцев А.В., Соколова О.С., Шайтан К.В. Процианидин ВЗ — потенциальный ингибитор человеческого септина 9 // Биофизика. — 2021. — V. 66 (5). — P. 1045-1055; IF 1.236, квартиль Q4 (1/0.8).
- 2) Garabedian M.V., Wirshing A., **Vakhrusheva A.V.**, Turegun B., Sokolova O.S., Goode B.L. A septin-Hof1 scaffold at the yeast bud neck binds and organizes actin cables // Molecular Biology of the Cell. — 2020. — V. 31(18). — P. 1988-2001; IF 4.138, квартиль Q1 (2/0.8).
- 3) **Vakhrusheva A.V.**, Endzhievskaya S., Zhuikov V., Nekrasova T., Parshina E., Ovsiannikova N., Popov V.V., Bagrov D., Minin A.A., Sokolova O.S. The Role of Vimentin in Directional Migration of Rat Fibroblasts // Cytoskeleton. — 2019. — V. 76(9-10). — P. 467-476; IF 1.93, квартиль Q3 (1.3/0.9).
- 4) Чемерис А.С., **Вахрушева А.В.**, Деркачева Н.И., Соколова О.С. Регуляция комплексом Arp2/3 преобразований актинового цитоскелета в клетке. Обзор // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2018. — V. 73(1). — P. 1-6; IF 0.77, квартиль Q3 (0.75/0.2).

ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) **Vakhrusheva A.**, Gourinath S., Sokolova O. Structural Investigation of the Complex of Actin with Filamin from Entamoeba Histolytica // Microscopy and Microanalysis. — 2020. — V. 26(S2). — P. 1296-1296; IF 3.414, квартиль Q2 (0.1/0.07).
- 2) **Вахрушева А.В.**, Соколова О.С. Изучение структуры комплексов септин-актин и идентификация малых молекул-ингибиторов септина // Труды XXVIII Российской конференции по электронной микроскопии. — 2020. — Т. 1. — Стр. 41.
- 3) **Vakhrusheva A.V.**, Stanishneva-Konovalova T.B., Sokolova O.S. Interconnection of Actin-binding Proteins and Septins in Asymmetric Cell Division // Microscopy and

¹ В скобках приведён объём публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах

- Microanalysis. — 2019. — V. 25(2). — P. 1340-1341; IF 3.414, квартиль Q2 (0.1/0.07).
- 4) Станишневa-Коновaловa Т.Б., **Вахрушева А.В.**, Соколова О.С. Взаимодействие белка Hof1 с актиновыми филаментами // Труды VI СЪЕЗДА БИОФИЗИКОВ РОССИИ. — 2019. — Т. 1. — Стр. 87-88.
 - 5) **Вахрушева А.В.**, Станишневa-Коновaловa Т.Б., Соколова О.С. Изучение структурных основ асимметричного деления клеток на примере белков HOF1 и септинов // Сборник тезисов XX Зимняя молодёжная школа по биофизике и молекулярной биологии. — 2019. — Стр. 98.
 - 6) **Vakhrusheva A.V.**, Semenyuk P.I., Medvedeva N.V., Minin A.A., Sokolova O.S. Study of vimentin unit-length filaments aggregation in presence of different polymers // International Journal of Biomedicine. — 2019. — V. 9(S1). — P. 15-15; IF 0.654, квартиль Q3.
 - 7) **Vakhrusheva A.**, Zhuikov V., Glukhov G., Popov V., Minin A., Sokolova O. Development of a model system for studying stiffness on the leading edge of fibroblasts by the method of force spectroscopy // FEBS open bio. — 2018. — V. 8(S1). — P. 330; IF 2.21, квартиль Q2.
 - 8) **Vakhrusheva A.**, Zhuikov V., Endzhievskaya S., Minin A., Sokolova O. The AFM Study of Elastic Properties of Rat Fibroblasts, Lacking Vimentin // Microscopy and Microanalysis. — 2018. — V. 24(S1). — P. 1238-1239; IF 3.414, квартиль Q2 (0.1/0.09).
 - 9) **Вахрушева А.В.**, Соколова О.С. Разработка модельной системы для изучения жёсткости на лидирующем крае фибробластов методом наноиндентации // Сборник тезисов конференции «ЛОМОНОСОВ». — 2018. — Стр. 1-2.

БЛАГОДАРНОСТИ

Особую благодарность выражаю Биологическому факультету МГУ, Соколовой О.С., Багрову Д.В., Глухову Г.С., Паршине Е.Ю., Жуйкову В.А., также Минину А.А. (Институт Белка), Ефремову Ю.М. (Сеченовский Университет), Garabedian M.V., Goode B.L. (Brandeis University, USA) за консультации, помощь с предоставлением объектов исследования и за совместную работу, которая помогла раскрыть тему исследования более глубоко.