

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*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

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.б.н., профессор РАН  
Соколова О.С.

Москва — 2022

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>6</b>
Актуальность темы исследования	6
Степень разработанности темы исследования	7
Цель и задачи работы:	8
Научная новизна	9
Теоретическая и практическая значимость	10
Методология исследования	10
Положения, выносимые на защиту	10
Степень достоверности данных	11
Личный вклад автора	11
Связь с государственными программами	11
Апробация диссертации	11
Публикации	12
Структура и объём диссертации	12
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>13</b>
<b>СЕПТИНЫ</b>	<b>13</b>
1.1. Структурная организация септинов	14
1.2.1. Роль ГТФ в полимеризации септинов	16
1.2.2. Способы полимеризации септинов	20
1.2. Функции септинов в клеточных процессах	22
1.3. Септины в онкологии	25
1.4. Вещества, влияющие на структурную организацию септинов	28
<b>ВИМЕНТИН</b>	<b>31</b>
1.5. Структурная организация виментина	31
1.6. Функции виментина и его роль в онкологии	36
1.6.1. Виментин как маркер эпителиально-мезенхимального перехода	37
1.7. Взаимодействия виментина с другими белками	39
1.8. Вещества, влияющие на структурную организацию виментина	45
<b>МЕТОДЫ</b>	<b>48</b>
2.1. Методы молекулярного моделирования и виртуального скрининга	48
2.1.1. Подготовка белковых структур и лигандов	48
2.1.2. Построение структуры по гомологии	49
2.1.3. Построение 3Д-фармакофора	49
2.1.4. Комбинированный виртуальный скрининг на основе фармакофорного скрининга и молекулярного докинга	49
2.1.5. Молекулярная динамика	51
2.2. Экспрессия и очистка Hsp1 и септинового комплекса	52
2.3. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	54
2.4. Культивирование клеточных линий	54
	2

2.5. Связывание белков с лигандами	55
2.6. Иммунофлуоресценция	55
2.7. Wound healing assay (модель раны монослоя)	56
2.8. Измерение клеточной пролиферации и жизнеспособности	56
2.9. Атомно-силовая спектроскопия и измерение модуля Юнга клеток	56
2.10. Статистическая обработка	59
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ</b>	<b>60</b>
3.1. Септины	60
3.1.1. Септины в месте деления клеток способны пространственно организовывать актиновые филаменты, в том числе при участии актин-связывающих белков	60
3.1.2. Виртуальный скрининг соединений, влияющих на полимеризацию септиновых филаментов	64
3.1.2.1. Взаимодействие ГТФазного домена септина с ГТФ	64
3.1.2.2. Комбинированный скрининг библиотеки малых молекул для предотвращения полимеризации септинов	69
3.1.2.3. Анализ комплекса септина 9 с Процианидином В3	75
3.1.3. Влияние Процианидина В3 на структуру септинов	79
3.1.3.1. Процианидин В3 взаимодействует с септинами	79
3.1.3.2. Процианидин В3 препятствует полимеризации септинов	80
3.1.3.3. Процианидин В3 влияет на морфологию клеток и локализацию в них септинов	83
3.1.4. Процианидин В3 снижает пролиферацию и жизнеспособность клеток рака молочной железы	86
3.2. Виментин	88
3.2.1. Роль разных форм виментина в миграции клеток	88
3.2.2. Виртуальный скрининг соединений, влияющих на взаимодействие виментина с плектином	94
3.2.2.1. Моделирование структуры комплекса виментин-плектин	94
3.2.2.2. Комбинированный скрининг библиотеки малых молекул для ингибирования взаимодействия виментина с плектином	100
3.2.3. Влияние Паромомицина и Амикацина на структурно-функциональные свойства виментина	106
3.2.3.1. Взаимодействие виментина с Паромомицином и Амикацином	106
3.2.3.2. Микроскопия виментиновых филаментов и их локализация в клетке	107
3.2.4. Влияние Паромомицина и Амикацина на миграционные свойства	110
3.2.4.1. Паромомицин и Амикацин снижают жёсткость на лидирующем крае	110
3.2.4.2. Паромомицин и Амикацин снижают миграционные свойства клеток	112
<b>ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>115</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>127</b>
<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>128</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ</b>	<b>129</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>130</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АСД** — актин-связывающий домен  
**АСМ** — атомно-силовая микроскопия  
**БСА** — бычий сывороточный альбумин  
**ВА** — Витаферин А  
**ГТФ** — гуанозинтрифосфат  
**ГДФ** — гуанозиндифосфат  
**ДМСО** — диметилсульфоксид  
**ДСН-ПААГ** — полиакриламидный гель, содержащий додецилсульфат натрия  
**ИПТГ** — изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид  
**МЭП** — мезенхимально-эпителиальный переход  
**ПФ** — промежуточные филаменты  
**СКО** — среднеквадратичное отклонение  
**СКФ** — среднеквадратичное колебание  
**ФСБ** — фосфатно-солевой буфер  
**ЭМП** — эпителиально-мезенхимальный переход  
**ЯМР** — ядерно-магнитный резонанс  
**ABD** — actin-binding domain  
**ARTS** — Apoptosis Related protein in TGF- $\beta$  Signaling pathway, апоптоз-ассоциированный белок в TGF- $\beta$  сигнальном пути  
**BPAГ1e** — bullous pemphigoid antigen 1e, буллёзный пемфигоидный антиген 1e  
**BSA** — bovine Serum Albumin, бычий сывороточный альбумин  
**CDC** — cell division control (protein)  
**CDK1** — cyclin-dependent kinase 1, циклин-зависимая киназа 1  
**CENP-E** — centromere-associated protein E, центромера-ассоциированный белок E  
**COX-2** — cyclooxygenase-2, циклооксигеназа-2  
**CPPU** — N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea  
**СТЕ** — C-terminal extension, С-концевое удлинение  
**cyPG** — cyclopentenone prostaglandins, циклопентеноновый простагландин  
**ДВВ** — dibromobiman, дибромобиман  
**DMEM** — Dulbecco's Modified Eagle Medium, среда, модифицированная по способу Дульбекко  
**ФАК** — focal adhesion kinase, киназа фокальных контактов  
**ФСФ** — forchlorfenuron, форхлорфенурон  
**FDA** — Food and Drug Administration, Управление по контролю за продуктами и лекарствами  
**HE4** — human epididymis protein 4, белок 4 придатка яичка человека  
**HER2** — human epidermal growth factor receptor 2, рецептор 2 эпидермального фактора роста человека  
**HIF-1 $\alpha$**  — hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , индуцируемый гипоксией фактор-1 $\alpha$   
**HNE** — 4-Hydroxynonenal, 4-гидроксиноненал  
**HTVS** — high-throughput virtual screening, виртуальный скрининг с высокой пропускной способностью  
**IAP** — Inhibitor of Apoptosis Proteins, ингибитор апоптозных белков

**IC50** — half maximal inhibitory concentration, концентрация полумаксимального ингибирования

**IDPN** —  $\beta,\beta'$ -iminodipropionitrile,  $\beta,\beta'$ -иминодипропионитрил

**iNOS** — nitric oxide synthase, синтаза оксида азота

**MACF1a** — microtubule actin crosslinking factor 1, фактор сшивания актина с микротрубочками 1

**MAP4** — microtubule-associated protein 4, ассоциированный с микротрубочками белок 4

**MAPK** — mitogen-activated protein kinase, митоген-активированная протеинкиназа

**MDR** — multiple-drug resistance, множественная лекарственная устойчивость

**MM-GBSA** — molecular mechanics with generalised Born and surface area solvation, свободная энергия связывания, вычисленная по обобщённому методу Борна

**MLL** — mixed lineage leukemia, лейкоз смешанного происхождения

**MMP** — matrix metalloproteinase, матриксная металлопротеиназа

**MPF** — maturation-promoting factor, фактор, способствующий созреванию

**NF- $\kappa$ B** — nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор, усилитель каппа-легкой цепи активированных В-клеток

**PAK1** — P21-(RAC1)-Activated Kinase 1, P21-(RAC1)-активированная киназа 1

**PBR** — polybasic region, мультиосновная область

**PBS** — Phosphate-Buffered Saline, фосфатно-солевой буфер

**PBST** — Phosphate Buffered Saline with Tween 20, фосфатно-солевой буфер с Твином 20

**PCNA** — proliferating cell nuclear antigen, ядерный антиген пролиферирующих клеток

**PGA1** — prostaglandin A1, простагландин A1

**PI3K** — phosphoinositide 3-kinase, фосфоинозитид-3-киназа

**PIP2** — phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат

**PKC** — protein kinase C, протеинкиназа C

**REF** — rat embryonic fibroblasts, эмбриональные фибробласты крысы

**ROCK** — Rho-associated kinase, Rho-ассоциированная киназа

**PRDs** — Plakin Repeat Domains, повторяющиеся плакиновые домены

**SHS** — seventh homolog of septin

**SEPT** — septin, септин

**SIM** — Structured Illumination Microscopy, микроскопия структурированного освещения

**SP** — standard precision, стандартная точность

**SPR** — sporulation-regulated protein

**SUE** — septin unique element, септиновый уникальный элемент

**TIRF** — total internal reflection fluorescence, флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения

**ULF** — unit-length filament, единичный филамент

**VEGF** — Vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

**XP** — extra precision, экстра точность

**15d-PGJ2** — 15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2, 15-дезоксидельта-12,14-простагландин J2 (15d-PGJ2)

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Раковые метастазы вносят более чем 90% вклад в смертность, по сравнению с первичными опухолями [1]. Основными характеристиками метастатических клеток являются их повышенная способность к миграции и пролиферации [2]. 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 [3-7]. ЭМП является одной из основных гипотез появления раковых метастазов, в частности за счёт реорганизации цитоскелета [3]. Повышенная экспрессия виментина также коррелирует с количеством метастазов в лимфатических узлах и неблагоприятным прогнозом при плоскоклеточной карциноме полости рта [8], аденокарциноме лёгкого [9].

Нарушение экспрессии септинов также часто ассоциировано с различными онкологическими заболеваниями [10]. Септин 9 принимает участие в ЭМП и прогрессии метастатических клеток [11-13], коррелирует с плохим прогнозом при глиоме [14], раке молочной железы [15, 16], яичников [17, 18] и других типов рака [19, 20], также является предиктивным маркером колоректального рака и его метастазирования [21].

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 [11, 12, 14, 15, 22-24]. Помимо этого, септины важны для сборки и работы сократительного кольца у делящихся эукариотических клеток [25]. Нарушение функции или удаление разных типов септинов приводит к дефектам в процессе цитокинеза [26-30]. Показана важность септина 9 для завершения последних стадий цитокинеза и разделения клеток [31].

Структурная динамика септинов крайне важна для их многофункциональности и функционирования. Известные соединения, воздействующие на септиновые филаменты, CPPU (FCF — форхлорфенурон) и его модифицированные аналоги UR214-1, UR214-7 и UR214-9 [32], приводят к стабилизации полимерных структур септинов [33], снижению скорости их диссоциации и накоплению септиновых агрегатов, приводящих в итоге к митотическим дефектам [34, 35]. Помимо этого, CPPU имеет и другие неспецифические мишени в клетке [36].

Стоит отметить, что олигомерные формы септинов сохраняют функциональность [53] и могут связываться с актиновыми филаментами [37], мембранными компонентами клетки [38], самособираться в кольцевые структуры [37] 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 [39, 40].

Среди малых молекул, взаимодействующих с виментиновыми филаментами, наиболее полно исследован Витаферин А (ВА), стероидный лактон из растения *Withania somnifera* [41]. ВА связывается не только с центральным доменом виментина [42-49]. Тем не менее, он индуцирует формирование виментиновых агрегатов, вызывающих впоследствии апоптоз клеток [50]. Схожее воздействие показано для синтетического вещества FiVe1 [51] и Симвастатина [52], 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 В3, 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. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причём вклад соискателя был определяющим.

- 1) **Вахрушева А.В.**, Кудрявцев А.В., Соколова О.С., Шайтан К.В. Процианидин В3 — 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).

### 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.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### СЕПТИНЫ

Изначально септины были обнаружены в почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* в виде мембрано-ассоциированных филаментов, влияющих на клеточную полярность и деление клеток [53]. С помощью электронной микроскопии у почкующихся дрожжей были идентифицированы 10-нм филаменты, окружающие место разделения материнской и дочерней клеток [54]. Позднее это было подтверждено с помощью иммунофлюоресценции [55]. Названия основных четырёх дрожжевых септинов (Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12) происходят от наименования их генов — CDC (Cell division control protein). Специфичные септины дрожжей именуется также согласно соответствующим генам: Shs1 — ген SHS1 (Seventh homolog of septin 1), Spr3 и Spr28 — гены SPR3 и SPR28 (Sporulation-regulated protein 3 и 28). Установлено, что септиновое кольцо на границе материнской и дочерней клеток дрожжей формируется путём полимеризации пяти септинов Cdc3p, Cdc10p, Cdc11p, Cdc12p и Shs1p [56]. Процесс образования септинового кольца регулируется Rho-зависимой ГТФазой Cdc42p [57]. Два других дрожжевых септина Spr3p и Spr28p экспрессируются во время споруляции [58].

У млекопитающих известны 13 паралогичных генов, кодирующих септины (SEPT1-SEPT14, SEPT13 — псевдоген SEPT7P2). На основе схожести последовательностей септины млекопитающих разделяют на 4 группы (Таблица 1) [59, 60]. Названия септиновых белков млекопитающих также соответствуют наименованиям генов. Далее сокращение “SEPT” и “Cdc” будет использоваться для обозначения белков септинов млекопитающих и дрожжей, соответственно.

Таблица 1 — Классификация септинов млекопитающих

Наименование группы септинов	Септины млекопитающих
SEPT2	SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5
SEPT6	SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14
SEPT7	SEPT7
SEPT3 (в некоторых источниках SEPT9)	SEPT3, SEPT9, SEPT12

## 1.1. Структурная организация септинов

Септины являются ГТФ-связывающими белками, структурно и эволюционно относящимися к Септин-подобному семейству, суперсемейству TrmE-Era-EngA-Septin-подобных белков, классу TRAFAC, суперклассу P-loop (Ф-петлевых) ГТФаз [62]. Ф-петлевые ГТФазы имеют как минимум пять консервативных мотивов (G1-G5) в ГТФазном домене [63]. Мотив G1 (Walker A) формирует подвижную петлю, которая взаимодействует с  $\alpha$ -фосфатной группой нуклеотида. Мотив G2 консервативен у отдельных ГТФазных семейств. Мотив G3 (Walker B) содержит гидрофобные остатки, а также координирует ионы магния и может взаимодействовать с  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатными группами ГТФ. Мотив G4 важен для специфического связывания гуанинового основания ГТФ. Мотив G5 характерен не для всех членов ГТФазного класса.

В ГТФ-связывающем домене септинов представлены 3 мотива: G1 (GxxxxGK), G3 (DxxG) и G4 (NKxD). N-концевая часть ГТФазного домена септинов содержит мультиосновный участок (polybasic region — PBR) для связывания с фосфолипидами мембран. Так, мутанты всего по двум аминокислотам в данном регионе теряли способность связывать липиды [64]. С-концевая часть ГТФазного домена представлена консервативной последовательностью “уникального септинового элемента” (septin unique element = SUE) длиной 53 аминокислотных остатка, однако только 6 аминокислот являются консервативными для септинов. С-концевая последовательность чаще всего формирует спиральную структуру для взаимодействия септинов между собой (Рисунок 1А) [65]. Изображение структуры септина со связанным ГТФ- $\gamma$ -S представлено на Рисунке 1Б.

В организме человека септины собираются в гексамеры SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 [61] или октамеры SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 [60], из которых формируются филаменты (Рисунок 1В). Показана возможность септинов *in vitro* формировать филаменты и из гексамерных комплексов [61].

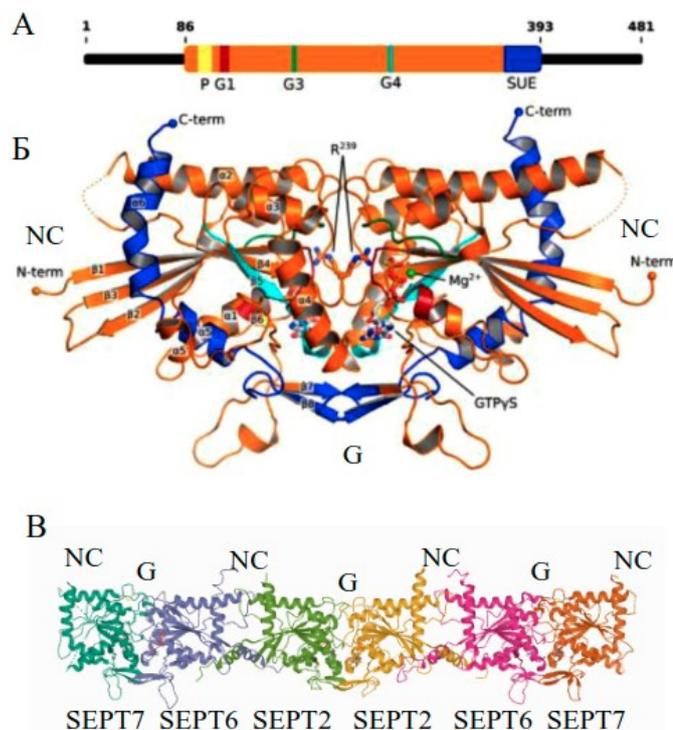


Рисунок 1. (А) Схематическое изображение доменной организации септина с указанными положениями остатков. Септины содержат PBR (P, жёлтый); ГТФазный домен (оранжевый), содержащий три из пяти консервативных мотивов (G1 — красный, G3 — зелёный, G4 — голубой) и SUE — тёмно-синий). (Б) Структура димерного септина (из *Chlamydomonas reinhardtii*) со связанной структурой ГТФ-γ-S. Консервативные мотивы показаны в соответствии с цветовым кодом, установленным под (А). Иллюстрация адаптирована из публикации [122]. (В) Гексамерный комплекс SEPT2-6-7 (PDB ID 7M6J); G — G-интерфейс, NC — NC-интерфейс.

Основные септиновые комплексы являются тетра-, гекса- или октамерными, из которых формируются уже более высокоолигомерные структуры, такие как филаменты, сетки и кольца [37, 66]. Длина основной септиновой субъединицы у дрожжей составляет 32 нм с шириной 7-9 нм и представляет собой гетерооктамер из 4 различных мономеров: Cdc11–Cdc12–Cdc3–Cdc10–Cdc10–Cdc3–Cdc12–Cdc11 [67, 68]. В тоже время есть данные, демонстрирующие другой порядок соединения септинов в филаменты: Cdc3p–Cdc10p–Cdc11p–Cdc12p [69]. В работе [70] отмечено, что септины без Cdc10 или Cdc11 не были способны собираться в длинные филаменты, что, соответственно, препятствовало сборке септинового кольца у делящихся клеток.

Различные септиновые комплексы SEPT3/5/7 [71], SEPT4/5/8 [59], SEPT5/7/11 [72], SEPT7/9b/11 [73], SEPT2/6/7/9 [74], SEPT2/6/7 [37] были выделены и очищены, а структура комплекса SEPT2/6/7 определена с помощью электронной микроскопии и рентгеновской кристаллографии [61]. Также получены различные димерные комплексы септинов SEPT2-SEPT6, SEPT7-SEPT3, SEPT2-SEPT11, SEPT2-SEPT8 [75] и мономерные субъединицы SEPT9, SEPT3 [76], Cdc11 [77] с помощью рентгеновской кристаллографии. Также недавно была впервые опубликована структура септинового гексамера SEPT2-SEPT6-SEPT7, полученная с помощью крио-электронной микроскопии с разрешением 3.6 Å [78].

### 1.2.1. Роль ГТФ в полимеризации септинов

Последовательная ГТФ-зависимая олигомеризация септинов происходит при помощи двух интерфейсов взаимодействия. Первый включает сайт связывания нуклеотида (G-интерфейс), второй интерфейс состоит из N- и C-концевых спиралей, прилегающих к сайту связывания нуклеотида с обеих сторон (NC-интерфейс) (Рисунок 1Б, В). В септиновом комплексе оба интерфейса чередуются друг с другом (Рисунок 1В) [79, 80].

Септины с микромолярной аффинностью связывают ГТФ и гидролизуют его [69]. Мутации, нарушающие ГТФ-связывающую активность (G47V, Q125L, S51N у аналога септинов млекопитающих белка Nedd5/SEPT2), приводили к невозможности формирования филаментных структур. Мутантные белки формировали агрегаты или диффузно располагались в цитоплазме [27], что подтверждает важность связывания и гидролиза ГТФ для формирования септиновых филаментных структур.

Связывание ГТФ вызывает одновременные конформационные изменения как в G-, так и в NC-интерфейсе септинов. Предполагается, что ГТФ вызывает более плотное связывание между септиновыми субъединицами. На примере септина 2 ниже выделены ключевые аминокислотные остатки, связывающие ГТФ. Так, аминокислотный остаток Asp185 из G4 мотива AKAD образует двойную

водородную связь с гуаниновым основанием, обеспечивая таким образом специфичность к ГТФ, а не АТФ. Помимо этого, гуаниновое основание взаимодействует с Arg256 и амидной и карбонильной группами главной цепи Gly241 септиновой субъединицы. Карбонильная группа главной цепи Thr186 и карбоксильная группа боковой цепи Glu191 со стороны другой субъединицы септинов образуют дополнительные контакты с гуаниновым основанием и рибозой, соответственно [80].

В присутствии ГТФ образуется связь, стабилизирующая G-интерфейс (на примере септина 2): Asp107 (со стороны одной субъединицы септина) — His158 и Glu202 (со стороны второй субъединицы септина). Остатки Lys50 и Ser51, расположенные на Ф-петле, координируют  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфаты ГТФ и ион  $Mg^{2+}$ , соответственно. Остаток Thr52 образует водородную связь с  $\alpha$ -фосфатом ГТФ. Аминокислота Thr78 также координирует ион  $Mg^{2+}$  и образует водородную связь с  $\gamma$ -фосфатом ГТФ [80].

Анализ структур со связанными ГТФ или ГДФ показали следующие различия: у структуры с ГТФ  $\alpha$ -спирали остаются практически неизменными, однако центральные  $\beta$ -стрэнды (1, 2, 3) отклоняются на  $\approx 20^\circ$ , что приводит к дестабилизации NC-интерфейса и конформации, характерной для связанного ГДФ. Таким образом,  $\gamma$ -фосфат ГТФ является движущей силой для торсионных изменений центральных  $\beta$ -стрэндов [80].

Помимо консервативных G (G1, G3, G4) мотивов в структуре септина выделяют два основных “переключателя”: область switch I, длинная петля, соединяющая  $\alpha$ -спираль 1 с  $\beta$ -стрэндом 2 и участвующая в формировании G-интерфейса, и область switch II, содержащая G3 мотив и вовлечённая в процесс гидролиза ГТФ и поддержание стабильности G-интерфейса (Рисунок 2А).

Изменение конформации треонина в области switch I является индикатором гидролиза ГТФ. Аминокислотные остатки Thr78 совместно с Gly104 из области switch II запускают универсальный механизм “нагруженной пружины”. При присоединении ГТФ аминокислотные группы главной цепи данных остатков, Thr78 и Gly104, образуют водородные связи с  $\gamma$ -фосфатом ГТФ. Когда  $\gamma$ -фосфат ГТФ

отщепляется, то два switch-региона “расслабляются” в ГДФ-специфичную конформацию (Рисунок 2Б), что отражается на изменении конформационного состояния, отклонении  $\beta$ -стрэндов и дестабилизации NC-интерфейса [81].

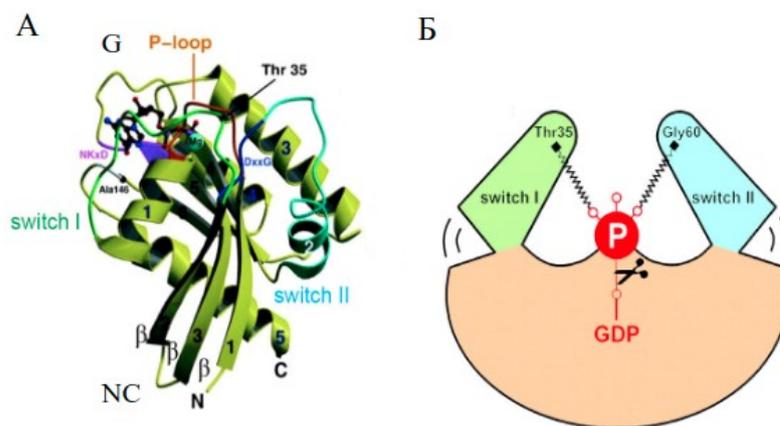


Рисунок 2. (А) ГТФазный домен септина с отображением основных консервативных элементов, а также switch регионов (зелёный и бирюзовый); G — G-интерфейс, NC — NC-интерфейс. (Б) Механизм “нагруженной пружины”: в присутствии ГТФ регионы switch I и II закорены на  $\gamma$ -фосфат ГТФ, после его отщепления данные регионы “расслабляются” и конформация переходит в характерную для ГДФ (Thr35 соответствует Thr78, Gly60 — Gly104 для септина 2). Иллюстрация адаптирована из публикации [81].

Мутация в аминокислотном остатке Thr78 (у септина 2), выполняющем каталитическую функцию, снижала гидролиз ГТФ [81]. Аналогично в септине 12, участвующего в компарментализации у сперматозоидов, аминокислотные замены Thr89Met и Asp197Asn в ГТФазном домене препятствовали связыванию и гидролизу ГТФ, формированию филаментов и, как следствие, к дефектным сперматозоидам и infertility [82].

Показано, что четыре типа дрожжевых септинов, Cdc3p, Cdc10p, Cdc11p, Cdc12p, связывают ГТФ в соотношении 27%, 18%, 9%, 46%, соответственно. Мутации данных септинов в районе Ф-петли уменьшали связывание ГТФ; мутации в G4 мотиве препятствовали связыванию ГТФ *in vivo*. Мутантные септины, не способные связывать ГТФ, меняли свою локализацию в клетке и не формировали полноценные филаментные структуры, что влияло на взаимодействие со септин-ассоциированными белками [68].

Стоит отметить, что обмен ГТФ у септинов медленный [83], таким образом они являются более стабильными цитоскелетными структурами, по сравнению с микротрубочками и микрофиламентами [25, 84]. Оценивается, что в среднем на септиновый полипептид приходится 1 моль ГТФ [69, 83]. Низкий уровень гидролиза ГТФ у *S. cerevisiae* подтверждает не только полимеризующую, но и стабилизирующую функцию нуклеотидов. Так в работе [85] было показано, что и ГТФ, и нерасщепляемый аналог ГТФ (ГТФ- $\gamma$ -S) способствовали сборке септиновых филаментов, состоящих только из рекомбинантного септина 2. Однако при снижении концентрации нуклеотидов до 0.05 мкМ происходила разборка филаментов. Предполагается, что связывание ГДФ у септинов обеспечивает стабилизацию и замедленную скорость диссоциации филаментных структур [86]. Также о структурной роли нуклеотидов свидетельствует стабилизация G-интерфейса между двумя септиновыми субъединицами в присутствии ГДФ [86].

Однако не все септины способны гидролизовать ГТФ. В частности, неспособность дрожжевых септинов Cdc3, Cdc11 расщеплять ГТФ предположительно связана с отсутствием треонинового остатка (Thr78) в регионе switch I, важного для гидролиза ГТФ [80]. Тем не менее, показано, что септины Cdc10 и Cdc12 имеют возможность связывать и гидролизовать ГТФ, а их мутанты Cdc10 (S43V) и Cdc12 (T48N) теряли такую способность, что приводило к невозможности формирования филаментных структур и септинового кольца на границе материнской и дочерней клеток и, соответственно, вело к нарушениям клеточного цикла [83, 87].

Среди септинов млекопитающих группа SEPT6 (септины 6, 8, 10, 11, 14) не имеет возможности гидролизовать ГТФ [80, 86]. Для септинов 2, 3, 7, 9 такая функция была зафиксирована [88-90]. В частности, септин 9 показал наибольшую скорость гидролиза ГТФ с каталитической константой равной 0.064/мин. У септина 2 она составляла 0.014/мин, у септина 7 была самая медленная (0.006/мин) [86]. Это подтверждается кристаллографическими данными, где септин 6 содержит в активном сайте ГТФ, а септины 2 и 7 — ГДФ [61].

Гетерогексамерные комплексы септинов содержат и ГДФ, и ГТФ в соотношении 2:1 (SEPT2/6/7), 3:1 (Cdc3/10/11/12), 4:1 (Cdc3/11/12/10), соответственно [61, 69].

Таким образом, когда септин не имеет гидролитической функции (Thr замещён другим остатком или находится на большом расстоянии от сайта связывания ГТФ), то ГТФ выполняет стабилизирующую функцию, а именно  $\gamma$ -фосфат ГТФ фиксирует G-интерфейс через область switch II. В то же время, NC-интерфейс остаётся доступным для присоединения других септиновых субъединиц [81].

Таким образом, предполагается, что септиновые субъединицы, имеющие способность гидролизовать ГТФ, претерпевают изменения как в G-, так и в NC-интерфейсах, присоединяя новые субъединицы с двух сторон. Септиновые субъединицы, не имеющие гидролитической функции, также могут связывать ГТФ, что ведёт к конформационным изменениям только в NC-интерфейсе, но стабилизирует G-интерфейс.

### 1.2.2. Способы полимеризации септинов

Формирование септиновых филаментов важно для выживания клеток. Невозможность формировать филаменты приводила к неправильной локализации септинов у плазматической мембраны и гибели клетки [91]. Сборка и разборка септинов зависит от множества клеточных факторов и сигнальных молекул, таких как циклин-зависимые киназы, малые ГТФазы Cdc42p, регуляторы Cdc42p, РАК-подобные киназы, протеиновые фосфатазы. Описаны различные механизмы сборки септиновых филаментов: самосборка септинов в различные полимерные формы, сборка на актиновых филаментах, в частности через белок-посредник анилин [92], сборка с помощью компонентов фосфолипидной мембраны.

На примере дрожжевых септинов было показано, что они взаимодействуют через PtdInsP2 (PIP2) с плазматической мембраной. В отсутствие субъединиц септинов Cdc11 или Cdc10 и при высокой концентрации соли, но в присутствии PIP2 септины формировали филаментные структуры, в том числе через нестандартные взаимодействия Cdc12-Cdc12 и Cdc3-Cdc3 [38]. Подобные

взаимодействия с RIP2 были показаны и для септинов млекопитающих [64].

Связывание септинов с ГТФ препятствует их связыванию с RIP2, так как их сайты расположены рядом; это влияет на локализацию септинов и их функции в процессе цитокинеза. Однако, связывание с ГДФ не препятствовало взаимодействию септинов с RIP2 и формированию длинных филаментов, что подчёркивает роль либо конформационных изменений, происходящих при связывании ГТФ, либо определяющую роль  $\gamma$ -фосфата в этом процессе [64].

Септины могут самособираться в кольцевые структуры *in vitro* и *in vivo*, без участия ГТФ и других белков цитоскелета, таких как актин. Считается, что эта форма является наиболее энергетически выгодной для септинов и служит их “сохраняющим пулом” в цитоплазме, из которого берутся септины для формирования других более сложных структур. Однако для эффективной филаментной сборки септинов важно наличие вспомогательных компонентов, в частности актина [37].

*In vitro* септины собираются в гетерооктамеры. При высокой ионной силе (300 мМ моновалентной соли) комплексы дрожжевых септинов остаются в виде гетерооктамеров [67] и начинают полимеризоваться при снижении концентрации соли (до 50 мМ KCl). Стоит отметить, что концентрация NaCl ниже 150 мМ приводила к полимеризации отдельных филаментов, в то время как диапазон 50-100 мМ характерен для формирования пучков. Высокая концентрация соли ( $\geq 150$  мМ) предотвращает полимеризацию, маскируя электростатические контакты септинов, необходимые для формирования филаментов [67].

При концентрации септинов выше 0,1 мг/мл образование филаментов происходило независимо от температурных условий (тестировалась и комнатная температура, и +4<sup>0</sup> градуса) и наличия ГТФ. Присутствие нуклеотидов стимулировало формирование филаментов. При этом сам факт связывания нуклеотидов (ГДФ или ГТФ) влиял сильнее, чем гидролиз ГТФ [69].

*In vitro* септиновые филаменты часто образуют параллельные “рельсоподобные” структуры на расстоянии друг от друга в 15-25 нм, которые предположительно соединяются через С-концевые удлинения (СТЕ — C-terminal

extension) субъединиц у соседних филаментов. Для дрожжей отмечена важность именно Cdc11-Cdc11 взаимодействий для полимеризации [67].

## **1.2. Функции септинов в клеточных процессах**

Несмотря на то, что септины являются консервативными компонентами сократительного кольца у всех эукариот, некоторые особенности их функционирования могут быть выделены у дрожжей и млекопитающих. Формирование септинового кольца у дрожжей происходит намного раньше, чем у млекопитающих, а именно в G1 фазе клеточного цикла [93]. Септины необходимы для привлечения миозина II, MyoP, в место будущего формирования дочерней клетки. Сократительное актин-миозиновое кольцо образуется в анафазе посредством привлечения септинами F-актина, гомологичных формину белков (Bnr1p, Bni1p), IQGAP (Cyk1p) и других. Септины у дрожжей также выполняют функцию каркаса для заякоривания хитин-синтаз, формирующих впоследствии септу [93].

Структурная динамика септинов сильно варьирует в зависимости от стадии клеточного цикла. Так, у дрожжей в конце G1 фазы клеточного цикла септины образуют кольцо, обладающее высокой степенью ремоделирования и локализующееся у предполагаемого места формирования дочерней клетки. После появления отпочковывающейся клетки в S фазе септиновое кольцо является уже стабильной структурой, что, вероятно, связано с фосфорилированием септинов протеиновыми киназами Cla4 и Gin4 и присоединением ГТФ к септинам Cdc10 и Cdc12 [94]. В фазах G2/M септиновое кольцо вытягивается в виде песочных часов, постепенно разделяясь на две клетки. В начале цитокинеза происходит снижение стабильности септиновых структур, их дефосфорилирование, они становятся более восприимчивыми к ремоделированию. В ходе цитокинеза идёт разделение септиновой структуры в виде песочных часов на два септиновых кольца для материнской и дочерней клеток, которые после разделения двух клеток разбираются и частично деградируют [95].

У млекопитающих септины играют основную роль в анафазе и на

последних этапах цитокинеза, когда идёт формирование сократительного кольца в экваториальной плоскости делящихся клеток и их разделение. Сигналом для старта цитокинеза является активация комплексом ECT2/Pebble у веретена деления киназы Rho A, которая затем взаимодействует с белком анилином и рекрутирует его в область формирования сократительного кольца [96]. Анилин, в свою очередь, через N-конец присоединяет формины, актин и миозин II для полимеризации актина и организации сократительного кольца, необходимого для слияния мембран и отделения дочерней клетки от материнской [93, 97]. Своим C-концом анилин взаимодействует с киназой Rho A, PIP2 и септинами, которые участвуют в работе актин-миозинового сократительного кольца, формировании перетяжки и завершающем этапе разделения клеток [96].

Предполагается, что септины принимают участие в привлечении и формировании изогнутой и плотно упакованной сети актиновых филаментов в сократительном кольце [93]. Клетки, нокаутные по септинам, имеют дезорганизованные актиновые филаменты, которые почти не упакованы в пучки и не формируют изогнутых структур [25]. Нарушение локализации септинов в области перетяжки приводит к митотической катастрофе и гибели клеток [98]. Разные септины контролируют разные этапы цитокинеза: дефицит септинов 2, 7 и 11 приводит к нарушению ранних стадий, а отсутствие септина 9 затрагивает последние этапы разделения клеток [31]. Таким образом, септины важны для формирования, стабилизации и сокращения сократительного кольца во время цитокинеза.

Помимо этого, септины являются белковым каркасом для посадки различных ферментов (например, хитин-синтаз у дрожжевых клеток *S. cerevisiae*), сигнальных эффекторов и других белков [95]. Стоит отметить, что септины в виде коротких олигомерных структур, рассредоточенных по клетке, также могут служить местами связывания для других белков [26]. Также септины являются диффузионным барьером, пока окончательная перегородка между клетками не сформируется [99-101]. В результате, септины связывают и организуют в пространстве и времени различные клеточные компоненты, необходимые для

цитокинеза.

В интерфазе и постмитотических клетках септины в виде филаментных образований солокализируются с цитоплазматическими фибриллярными и гранулярными структурами, в большей степени с актином. В клетках эмбриональных фибробластов крысы (REF52) филаменты из SEPT7-SEPT9b-SEPT11 были локализованы вдоль актиновых стресс-фибрилл [73]. Блокирование полимеризации актина влияет на расположение септинов [27]. Добавление цитохалазина, нарушающего структуру актиновых филаментов, приводило также к дезорганизации септиновых филаментов и стресс-фибрилл. Тем не менее, данный эффект был обратим; после отмывки цитохалазина солокализация септинов с актиновыми филаментами восстанавливалась [27].

Отмечена роль септинов в сборке и стабилизации актиновых филаментов, особенно в околядерной области. Показано, что септин 9 напрямую взаимодействует и защищает актиновые филаменты от деполимеризации [102]. Нокдаун септина 9 приводит к снижению актиновых структур и их преимущественной локализации у кортикального слоя клетки, в то время как повышение экспрессии септина 9 значительно увеличивает количество стресс-фибрилл [103].

Роль линкера-адаптера между септинами и актином во время цитокинеза отводится белку анилину, гомологу Mid2p у дрожжей [37]. В течение интерфазы данную роль предположительно выполняют белки семейства BORG, такие как Cdc42EP3, Cdc42EP5, связывающиеся с Cdc42 и димерами SEPT6-7 и/или тримерами SEPT2-6-7 и вызывающие также реорганизацию последних [23, 104, 105]. Септины могут и напрямую связывать актиновые филаменты [25].

Помимо этого, отмечается взаимодействие септинов с микротрубочками и их функция в позиционировании, направленности и моделировании динамики микротрубочек [84, 106]. Так, удаление септинов вызывало стабилизацию микротрубочек путём взаимодействия MAP4 с микротрубочками, которое ингибируется в присутствии септинов [26].

Септины активно участвуют в клеточной миграции и поддержании формы

клеток. Нокдаун септинов (SEPT1, SEPT6, SEPT7, SEPT9) у Т-лимфоцитов приводил к появлению дополнительных выступов на лидирующем крае, удлинению заднего уropода клеток и значительному изменению их морфологии [107]. Так как септины часто локализуются на мембране, взаимодействуя с другими компонентами цитоскелета, то они вносят значительный вклад в формирование клеточного каркаса. Уменьшение клеточной жёсткости вследствие нокдауна септинов способствовало увеличению миграции, но клетки становились менее координированными в поддержании направления перемещений [107]. Уменьшение экспрессии септина 1, локализуемого в ламеллоподиях, ингибировало распространение линии DJM-1 плоскоклеточного рака [108]. Снижение экспрессии септина 14 в кортикальных нейронах подавляло их миграцию [109]. Повышение экспрессии изоформы 1 септина 9 способствовало увеличенной подвижности опухолевых клеток, перестройке цитоскелета и формированию фокальных контактов через активацию Rho/ROCK и FAK, опосредующих сигнальные пути [103].

Роль септинов также выявлена в процессах экзоцитоза, в формировании нейрофибрилярных сплетений при болезни Альцгеймера и при болезни Паркинсона [110]. Септины обнаружены в сперматозоидах, где выполняют роль в компарментализации и формировании мембранного кольца, необходимого для правильного функционирования сперматозоидов [111]. Септины участвуют в эмбриогенезе, в работе сердечно-сосудистой, иммунной, нервной, репродуктивной, мочевой и пищеварительной, дыхательной, эндокринной и покровной системах [22].

### **1.3. Септины в онкологии**

Во многих исследованиях показано, что септины значительно меняют свою экспрессию при разных типах онкологии [10]. При этом часть из них выступает в качестве супрессоров опухолевых процессов, а часть, наоборот, являются онкогенными. При раке яичников, молочной и поджелудочной железы наблюдается повышенная экспрессия септинов 2, 7 и 9, что коррелирует с худшей

выживаемостью таких пациентов [112]. Показано, что септины могут увеличивать резистентность к онкологическим лекарственным препаратам, направленных на ингибирование HER2 (human epidermal growth factor receptor 2; (ErbB2), путём прямого взаимодействия септинов с данным рецептором [113].

В течение метафазы септин 2 локализуется у метафазной пластинки, взаимодействуя с белком CENP-E у кинетохоров, и контролирует правильное прикрепление хромосом к веретену деления. Также он важен во время анафазы при расхождении хромосом. Было показано, что недостаточная экспрессия септина 2 приводила к нарушению цитокинеза и появлению анеуплоидии, характерной для раковых клеток [28]. При этом нокадаун септина 2 вызывал уменьшенную экспрессию HER2, HE4 и снижал жизнеспособность раковых клеток [32].

Короткая сплайсоформа изоформы 2 септина 4 (или ARTS - апоптоз-ассоциированный белок в TGF- $\beta$  сигнальном пути) и септина 11 обладают онкосупрессивными свойствами. Экспрессия белка ARTS, имеющего проапоптотические свойства путём связывания с IAPs (ингибитором апоптозных белков) значительно снижается при лейкемии. Другие изоформы (1 и 3) септина 4 имеют повышенную экспрессию при колоректальном раке. Их подавление приводит к остановке роста опухолевых клеток и аресту в G2 фазе. Так как данные сплайсоформы в норме не экспрессируются в кишечнике, то рассматривается их использование в качестве диагностических маркеров или мишеней для лечения рака толстой кишки [110].

Септин 9 в большей степени является онкогеном, хотя его онкосупрессорные свойства также зафиксированы. Показано, что септин 9 имеет повышенную экспрессию при раке молочной железы [15, 16], раке яичников [17, 18], раке головы и шеи [19, 20], раке простаты [114] и других типах рака. Изоформа 1 септина 9 ассоциирована и высоко коррелирует с раком молочной железы, а метилированная изоформа 2 септина 9 служит биомаркером колоректального рака [10]. Высокая экспрессия изоформы 1 септина 9 при ЭМП является отличительной чертой эпителиального типа рака [15]. Помимо этого,

увеличенная экспрессия изоформы 1 септина 9 коррелирует с резистентностью раковых клеток к лекарственному препарату паклитаксел (таксол), воздействующего на микротрубочки [115].

При гематологических онкологиях септины (SEPT5, SEPT6, SEPT9, SEPT11) часто объединяются с геном MLL (mixed lineage leukemia) путём хромосомных транслокаций, образуя химерные белки. При этом доля септинов, по сравнению с другими белками, которые также образуют химерные белки с MLL, самая большая. Известно, что химерный белок MLL-септин образуется с помощью N-концевой части септина и затрагивает большую часть ГТФазного домена, что соответственно нарушает септин-септиновые взаимодействия и образование филаментов.

Помимо этого, септины опосредуют повышенную миграцию, в частности, клеток почечного эпителия через взаимодействие с актиновыми стресс-фибриллами на лидирующем крае клеток. Удаление септинов приводило к уменьшению периферических фокальных контактов. Данный фенотип также характеризовался дезорганизованной сетью актина [116]. Показано, что септин 9 “сшивал” актиновые филаменты и увеличивал мезенхимально-подобную миграцию клеток почечного эпителия, в то время как нокдаун септина 9 снижал миграцию. Таким образом, септины могут способствовать повышенной эпителиальной подвижности путём сшивания ламеллярных стресс-фибрилл и обеспечения стабильности фокальных контактов [116]. Роль септинов отмечается также при нейрональной и амебoidalной миграции Т-клеток [107, 109].

Нокдаун септинов 2 и 7 приводил к снижению клеточной инвазии раковых клеток и влиял на их механочувствительность [23]. В другой работе отмечается, что клетки с нокдауном по септинам 2 и 7 имели значительное снижение клеточной пролиферации, миграции и инвазии, высокую вероятность апоптоза. В то же время, повышенная экспрессия данных септинов приводила к увеличению миграционной подвижности, пролиферации и инвазии клеток, как предполагается, через активацию сигнального пути MEK/ERK [24]. Аналогичные результаты показаны при подавлении септина 9 и его оверэкспрессии,

соответственно [15].

Нарушение процесса цитокинеза делает клетки более канцерогенными [117]. Тем не менее, воздействие на процесс цитокинеза часто является и одним из подходов для лечения раковых опухолей. Например, применение ингибиторов киназы Аврора приводит к полиплоидности опухолевых клеток, а впоследствии к их уничтожению через апоптоз. Таким образом подавляется рост опухолей, что было показано как *in vitro*, так и *in vivo* [118].

#### **1.4. Вещества, влияющие на структурную организацию септинов**

Для септинов известен только один класс ингибиторов — форхлорфенуроны (CPPU — N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea или FCF), синтетические растительные цитокинины, которые активно используются в сельском хозяйстве для стимулирования роста фруктов [119]. Также они показали эффективность в ингибировании пролиферации, миграции и инвазии раковых клеточных линий человека *in vitro* [24, 120] и *in vivo* [121].

Предполагается, что CPPU связывается с нуклеотид-связывающим сайтом септинов (SEPT2, SEPT3, SEPT7), взаимодействуя с G1 мотивом GxxxxGKS/T на Ф-петле и ГТФ-специфичным мотивом AKAD (G4). CPPU показал более предпочтительное связывание с септинами 2 и 3 (энергия связывания около -6 ккал/моль). У септина 2 CPPU образовывал водородные связи с Lys183 одной септиновой субъединицы (протомер А) и с Glu191 другой септиновой субъединицы (протомер В), а также ряд более слабых водородных связей с Pro155, Gly157, Glu191 (протомер В). Также CPPU взаимодействовал через галогеновую связь атома хлора с Thr186 на протомере В и с Gly241 (протомер А), которые в отсутствие ингибитора связывают гуаниновое основание и рибозу (Glu191, протомер В) [33]. Таким образом, CPPU занимал место связывания нуклеозидной группы.

У септина 3 ключевые аминокислотные остатки, взаимодействующие с CPPU, соответствовали таковым у септина 2 (Pro155, Thr186 — септин 2 и Pro186, Thr211 — септин 3) и септина 7 (Gly49, Thr52, Asp185, Arg256, Glu191, Gly241 —

септин 2 и Gly43, Thr46, Asp178, Arg246, Glu184, Gly231 — септин 7), что предполагает схожий сайт связывания CPPU у септинов 2, 3 и 7. Предполагается, что CPPU оказывает стабилизирующее действие на септины, взаимодействуя с сайтом связывания ГТФ и предотвращая его связывание и гидролиз, при этом стабилизируя соседние субъединицы [33].

При микромолярной концентрации  $IC_{50}=20-60$  мкМ (выше 50 микромоль отмечается цитотоксическое действие) соединение CPPU ингибировало рост раковых клеток, а также опухолей у мышей. Было отмечено воздействие CPPU на септин 7 и важность иона хлора у CPPU для связывания в ГТФазном сайте септинов [121]. В работе [34] показано, что соединение CPPU действует *in vitro* специфично на септины млекопитающих SEPT2/6/7, не влияя на полимеризацию актина и тубулина. CPPU предположительно снижает скорость диссоциации септиновых филаментов с образованием длинных и толстых септиновых пучков. Применение CPPU ведет к уменьшению миграционной способности клеток и появлению обратимых митотических дефектов. Однако, в другой работе [36] было показано, что соединение CPPU действовало не специфично, влияя на функции и морфологию митохондрий при более низкой концентрации, по сравнению с используемой для ингибирования септинов. Таким образом, предполагается, что уменьшение пролиферации клеток под воздействием CPPU может быть обусловлено различными механизмами [36].

Было также показано воздействие CPPU на маркер карциногенеза HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ). CPPU снижал экспрессию и вызывал деградацию HIF-1 $\alpha$ , уменьшая таким образом онкогенность [120]. Предполагается, что увеличение экспрессии септина 9 ведёт к взаимодействию с HIF-1 $\alpha$ , подавляя его убиквитинирование и деградацию [114]. Похожий механизм защиты септинов от убиквитинирования и нарушение этого эффекта при взаимодействии с CPPU были показаны и для HER2 (ErbB2), играющего важную роль в выживании клеток при раке желудка [113].

Таким образом, CPPU ингибирует динамику септинов и нарушает их сборку [34]. Показано, что CPPU влияет на филаментную организацию и клеточную

локализацию, в частности септина 9, приводя к нарушениям митоза. Применение CPPU также влияло на клеточную морфологию клеток (потеря вытянутой формы и приобретение более округлой), но при этом не затрагивало экспрессии септинов [24]. Для почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* соединение CPPU оказывало сходный эффект и влияло на локализацию и морфологию септинов, в итоге ингибируя деление дрожжевых клеток [35]. CPPU имеет короткий период полувыведения, приводит также к небольшому системному воспалению и оказывает цитотоксический эффект [121].

В связи с потенциалом применения данного соединения были разработаны его аналоги — UR214-1, UR214-7 и UR214-9, которые оказались более эффективными относительно снижения жизнеспособности и пролиферации клеточных линий рака яичников и рака эндометрия. Аналоги CPPU также подавляли экспрессию HER2 и HE4 (human epididymis protein 4) в меньшей концентрации, чем CPPU, что предполагает их потенциальное использование для лечения гинекологических типов рака [32].

Наиболее активным оказалось соединение UR214-9 со встроенными атомами фтора на фенольном кольце и хлора в положении С-6 на пиридиновом кольце. Полученное соединение приводило к дезорганизации септинов 2/9 и их локализации на периферии раковых клеток, при этом оно не влияло на уровень экспрессии септинов. Молекулярный докинг соединения UR214-9 в димерный комплекс SEPT2-SEPT2 показал, что UR214-9 имеет большую энергию связывания (-8,59 ккал/моль), чем CPPU (-7,21 ккал/моль) [112].

Помимо этого, соединение UR214-9 воздействовало на ось HER2/STAT-3 и *in vivo* замедляло рост HER2+ ксенотрансплантатов рака молочной, поджелудочной железы и яичников через повышение чувствительности клеток к действию противоопухолевого препарата “Герцептин”, направленного на подавление HER2, так как большинство пациентов с HER2+ раком молочной железы являются резистентными к лечению “Герцептином”. Таким образом, дестабилизируя структуру септина 2, удалось повысить восприимчивость клеток к этому препарату [112].

## **ВИМЕНТИН**

### **1.5. Структурная организация виментина**

Виментин относится к семейству промежуточных филаментов (ПФ), белки которого характеризуются образованием филаментных структур с диаметром около 10 нм, что позволяет им занимать промежуточное положение между микрофиламентами и микротрубочками. Среди промежуточных филаментов классически выделяют 5 типов: тип 1 — кислые кератины, тип 2 — основные кератины, тип 3 — мезенхимальные белки, такие как виментин, десмин, глиальный фибриллярный кислый белок и периферин, тип 4 — нейрофиламенты, тип 5 — ламины [123].

Общая структура промежуточных филаментов представлена на Рисунке 3А и состоит из неспиральных участков на N-конце (“голова”) и С-конце (“хвост”), которые фланкируют центральный альфа-спиральный домен, состоящего из гептадных повторов гидрофобных аминокислот (a, b, c, d, e, f, g, среди которых a и d неполярны) и играющего основную роль во время самосборки виментина. Центральный домен подразделяется на следующие части: 1А, 1В, 2А, 2В, разделённые короткими неструктурированными линкерами: L1 между 1А и 1В, L1-2 между сегментами 1 и 2, L2 между 2А и 2В. Данные линкеры часто содержат пролин или глициновые аминокислотные остатки. Центральный домен виментина состоит из 310 аминокислот и имеет длину около 46 нм [124].

Гептадные повторы гидрофобных аминокислот, а также периодическое распределение кислых и основных остатков, чередующихся примерно через 9,5 остатков, способствуют образованию и стабилизации параллельных димеров, представляющих собой левозакрученную спираль, состоящую из двух правозакрученных. Далее димерные спирали объединяются “голова-к-хвосту” в антипараллельные тетрамеры (стадия протофиламента), которые являются наименьшими стабильными единицами виментина в растворе. Тетрамеры, в свою очередь, собираются в октамеры. Четыре октамера образуют, так называемую, ULF-субъединицу, которая является полноценным филаментом по диаметру, но

не по длине. Далее ULF соединяются в продольном направлении, образуя филамент (Рисунок 3Б) [124, 125].

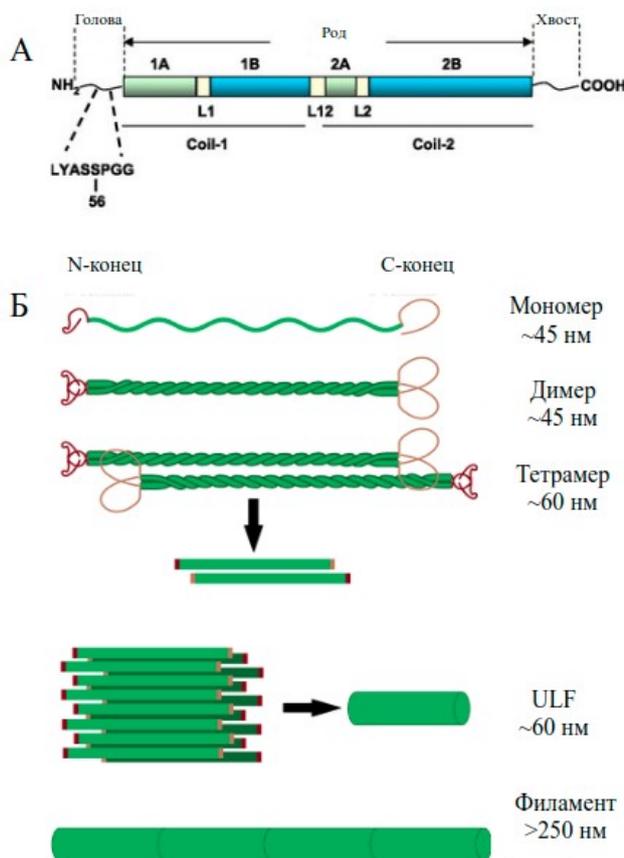


Рисунок 3. (А) Схема организации виментина. (Б) Схема сборки виментиновых филаментов. Иллюстрации адаптированы: [126, 127].

Для выяснения роли каждой части виментина получали его различные варианты: без “головой” или “хвоста” с помощью генно-инженерных методов [128]. В случае человеческого виментина “голова” оканчивалась на аминокислоте Gln82, а “хвост” — на Ile411. Опыты, основанные на различии в седиментационных свойствах разных форм виментина, показали, что “голова” виментина ответственна вероятно, за образование высоко-олигомерных структур. Форма виментина без “головой” приводила к образованию агрегатов, без филаментно-подобной структуры. “Хвостовая” же часть виментина влияла на диаметр филаментов, увеличивая его до 3 нм, однако не влияя на полимеризацию в продольном направлении (end-to-end). Таким образом, “хвост” оказывал преимущественное влияние именно на латеральную сборку филаментов.

Введение мутаций в центральный домен приводило к нарушению структуры виментиновых филаментов [124].

Динамика и регуляция сборки виментиновых филаментов осуществляется преимущественно с помощью фосфорилирования протеиновыми киназами и дефосфорилирования протеиновыми фосфатазами. У виментина, в области “головного” домена связываются различные киназы, такие как протеиновая киназа А, протеиновая киназа С, цАМФ-зависимая киназа и другие [124]. Особенная роль отводится сайту виментина Ser72, фосфорилируемого Aurora-B киназой [129, 130].

Митоз-опосредованная реорганизация виментиновых филаментов регулируется путём фосфорилирования. Перед входом клетки в первые фазы митоза сети промежуточных филаментов подвергаются деполимеризации. В частности, разборка виментина регулируется через фосфорилирование каталитическим компонентом MPF (maturation-promoting factor) — p34cdc2 [131]. Во время ранних фаз митоза (прометафаза-метафаза) сайт виментина Ser55 специфично фосфорилируется Cdk1, что рекрутирует киназу Plk1 для сайта Ser82. В анафазе Aurora-B и Rho-киназы фосфорилируют виментин во время формирования разделительной перегородки в процессе цитокинеза для правильного перераспределения виментиновых филаментов между разделяющимися клетками [129, 130].

Виментиновые мутанты по упомянутым выше сайтам фосфорилирования формируют так называемые “мосты” из виментиновых филаментов, которые протягиваются из одной клетки в другую и препятствуют их правильному разделению, что ведёт к многоядерности [128, 129].

В сборке виментиновых филаментов большую роль также принимают микротрубочки. Предшественники филаментов в виде виментиновых субъединиц перемещаются на периферию, где собираются в короткие, а затем и длинные фибриллы. Эти виментиновые субъединицы солокализуются на периферии с микротрубочками. Помимо этого, само перемещение виментиновых субъединиц контролируется сетью микротрубочек. Обработка нокодазолом влияла на

распределение виментиновых субъединиц, которые локализовались преимущественно в перинуклеарном пространстве и не собирались в филаменты [132, 133]. Тем не менее, какая-то часть коротких виментиновых филаментов детектировалась на периферии и после обработки нокодазолом [133]. В перемещении виментиновых субъединиц и поддержании виментиновой сети отмечается также роль кинезина. Применение антител к кинезину влияло на сборку виментиновых филаментов, а также вызывало их ретроградное перемещение от периферии к ядру клетки [132, 134].

Сборка виментина *in vitro* происходит путем увеличения концентрации соли (NaCl). Изначально виментин находится преимущественно в форме тетрамеров размером 3x48 нм. После диализа против раствора 50 mM NaCl (pH 8,5) (минимальная необходимая ионная концентрация для активации сборки филаментов) происходит полимеризация виментина в короткие формы (длиной около 60-70 нм). Диализ против раствора 170 mM NaCl (pH 7,0) позволяет образовывать филаменты до нескольких микрометров. Повторный диализ в 50 mM NaCl (pH 8,5) разбирает длинные филаменты снова до коротких, но более гетерогенных [135].

Влияние ионной силы на кинетику сборки виментиновых филаментов было оценено с помощью методов статического и динамического рассеяния света, а также сканирующей электронной микроскопии. Низкая концентрация соли (10 mM KCl) не давала латерального или продольного удлинения виментина в течение часа, в то время как 50-200 mM соли увеличивали сборку филаментов пропорционально увеличению концентрации соли. Таким образом, очищенный виментин в денатурирующих условиях присутствует в виде мономеров с молекулярной массой =  $5.4 \times 10^4$  г/моль, формирующих впоследствии димеры, затем тетрамеры с массой =  $2.15 \times 10^5$  г/моль в физиологическом, но низко-солевом буфере. Добавление моновалентной соли, такой как KCl или NaCl, запускает сборку ULF-частиц в течение секунд-минут. Полимеризация ULF в полноразмерные филаменты длится в диапазоне минут-часов. Полимеризация промежуточных филаментов, помимо концентрации соли, также зависит от

концентрации белка и температуры [136].

Стоит отметить роль цистеинового остатка Cys328 в процессах организации виментиновых филаментов. Расчёт эмпирического значения  $pK_a$  цистеинов с учётом их соседних остатков (Glu329 и Asp33) равнялся 8,5, что свидетельствует об отсутствии у данных цистеинов каталитической функции, так как в этом случае их  $pK_a$  был бы намного ниже (4,5-6). Следовательно, виментин не участвует в формировании тиолятов, а реактивность Cys328 зависит только от его экспонирования наружу. Также анализ молекулярной поверхности вблизи Cys328 не выявил какого-либо сайта для специфического связывания молекул [137].

Цистеин 328 является мишенью для множества различных окислительных модификаций. Он важен для реорганизации виментиновых филаментов в ответ на действие оксидантов и электрофильных молекул [138], таких как 15d-PGJ2, PGA1 или HNE, вызывающих перинуклеарную конденсацию виментина в виде коротких филаментов. Виментин с мутацией C328S обладал сниженной восприимчивостью к электрофильным молекулам, что, соответственно, приводило к меньшей концентрации виментина в околядерной области [138].

Помимо этого, Cys328 важен для формирования виментиновых филаментов. Так, мутанты C328S и C328A были представлены в клетках только в виде точечных структур или агрегатов, в то время как виментин дикого типа формировал филаментные структуры. Добавление электрофилов HNE, PGA1 к виментину дикого типа вызывало разборку филаментов, приводя к появлению виментиновых “точек”, а на мутантные формы виментина электрофилы не оказывали влияния. В то же время, виментиновая сеть формировалась и в том, и в другом случае, но у мутантных виментинов данный процесс был более продолжительным по времени. Стоит отметить, что обмен виментиновыми субъединицами у мутантов происходил быстрее, когда как виментин дикого типа был более стабилен. Таким образом, мутация C328S оказывала защитное действие для виментинового цитоскелета от дезорганизирующего действия оксидантов и электрофилов, в то же время она затрудняла структурную динамику виментина и осуществление его функций в клетке [138].

Добавление дибромобимана (DBB), вещества, сшивающего соседние тиольные группы, приводило к образованию виментиновых олигомеров в случае дикого виментина, но не в случае мутантного виментина по цистеину, что может указывать на участие Cys328 в формировании виментин-виментиновых взаимодействий. Тем не менее, образование дисульфидной связи между виментинами доказано не было. Было предположено, что связь между цистеинами соседних виментиновых субъединиц осуществляется не напрямую, а металл-опосредованно [138].

Инкубирование виментина с различными солями металлов, показало, что микромолярные концентрации цинка защищали виментин от модификаций йодоацетамидом и позволяли виментину осуществлять полимеризацию. В клетках цинк тесно ассоциирован с виментином, а его недостаток ведёт к диссоциации филаментов. В человеческих фибробластах, мутантных по цинк-специфическим транспортёрам, виментин имел повышенную растворимость, диффузное и малочисленное расположение, а также склонность к разборке. Однако, данные эффекты нивелировались добавлением цинка. Таким образом, можно заключить, что цинк играет важнейшую роль, взаимодействуя с виментином и способствуя его латеральной полимеризации [138].

### **1.6. Функции виментина и его роль в онкологии**

Виментин участвует в позиционировании мембранных органелл [139, 140], в процессах клеточной миграции [141] и адгезии путём увеличения размера и силы фокальных контактов [142, 143]. Так, в фибробластах без виментина жёсткость клеток снижалась на 40%, помимо этого нарушалась направленность миграции, хемотаксис и в целом механическая стабильность клеток [144].

Виментин формирует ответ на механический стресс. Было показано, что клетки с повышенным содержанием виментина более плоские [145], по сравнению с эпителиальными клетками, экспрессирующими преимущественно кератин. Высота клетки над субстратом является одним из определяющих факторов реакции клетки при напряжении сдвига (shear stress). Таким образом, более плоские клетки с повышенным содержанием виментина могут лучше

противостоять механическому стрессу извне [146, 147]. Данное свойство помогает выживать раковым клеткам, так как они подвергаются сильному воздействию при миграции из первичного сайта опухоли во вторичный [148, 149].

У раковых клеток в целом отмечается меньшая жёсткость, по сравнению с нормальными клетками [150]. Однако, в ряде работ показано увеличение жёсткости раковых клеток в процессе инвазии за счёт повышенной сократимости актин-миозиновой системы [151]. Также для солидных опухолей характерна повышенная жёсткость, в среднем в 1,5 раза превышающая окружающие ткани, что необходимо для эффективной инвазии и противостоянии механическому стрессу [152]. Тем не менее, основную роль в жёсткость клетки вносит ядро [153], которое у раковых клеток более “мягкое” ввиду необходимости его деформирования для миграции через плотные ограниченные пространства внеклеточного матрикса [154-156]. Также отмечаются различия в модуле Юнга, характеризующего упругость, у разных типов мигрирующих клеток: так у клеток с ламеллоподиями он составляет около 400 Па, а у клеток с лобоподиями — 2200 Па [143].

Таким образом, для метастазирования клеток становится важна подвижность и гибкость цитоскелета, которая может обеспечиваться как раз за счёт уникальных свойств виментина. В отличие от кератина, который становится жёстче в ответ на приложенную силу, виментин остаётся не связанным в пучки и гибким [157]. Также виментин более динамичен в плане обмена субъединицами, чем кератин [158]. Работы по блокированию гибкости и адаптационных свойств виментина путём использования Симвастатина приводили к формированию виментиновых пучков, что блокировало пролиферацию раковых клеток, так как деградация и реорганизация виментиновых филаментов важны для клеточного деления [52, 131].

#### 1.6.1. Виментин как маркер эпителиально-мезенхимального перехода

В изучении преобразований раковых клеток основная роль отводится ЭМП. Данный процесс изначально важен на этапах эмбриогенеза, но задействуется и

при таких патологических состояниях как метастазирование и фиброз [159-161]. При ЭМП происходит изменение морфологии и увеличение подвижности миграции. Эпителиальные клетки теряют апикально-базальную полярность и обширные контакты с расположенными рядом клетками и базальной мембраной, их форма становится более вытянутой, с хорошо обозначенной полярностью, образуются филоподии и появляется высокая степень подвижности [162]. Помимо этого, клетки, ушедшие в ЭМП, не только становятся более инвазивными, но и таким способом избегают апоптоза [161, 163]. Переключение экспрессии кератина на виментин является классическим маркером ЭМП [162].

Существует и обратный мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП), необходимый на ранних стадиях развития (формирование сомитов, целомической полости), он также характерен для образования вторичных метастазов. Во время МЭП экспрессия виментина снижается, как и подвижность, а клетки приобретают характеристики эпителиальных клеток [164].

Экспрессия и структура виментиновых филаментов определяет морфологию клетки. Для эпителиальных клеток характерна округлая форма, с небольшим содержанием виментина в нефиламентном состоянии или в виде коротких филаментов. Напротив, при повышении экспрессии виментина прослеживается преобладание именно филаментных форм виментина, образующих сети, а также вытянутая форма клетки, характерная для мезенхимального фенотипа. При увеличении экзогенного виментина путём добавления в клетки рекомбинантной формы виментина или путём трансфекции виментиновой кДНК, клетки претерпевали изменения своей формы и меняли её с более округлой на вытянутую. Также у клеток с повышенной экспрессией виментина увеличена скорость миграции, но снижена способность к адгезии [145].

Добавление веществ, влияющих на структуру микротрубочек и, следовательно, на организацию и распределение виментиновых филаментов, а также подавление экспрессии виментина вело к изменениям формы клеток на округлую. Таким образом, сборка виментина в филаменты может являться

маркером и/или условием как изменения формы клетки, так и увеличения её миграционной способности во время ЭМП [145].

Виментиновые филаменты являются основными при мезенхимальной миграции, связанной с ЭМП, но также могут контролировать амебоидный [165, 166] и коллективный [167] типы миграции в раковых клетках. Стоит отметить, что наиболее подвижные раковые клетки переключают тип миграции с мезенхимального на амебоидный [168-172].

Помимо этого, виментин помогает раковым клеткам не только передвигаться, но и выживать [148, 156], так как он регулирует механическую устойчивость клеток и обладает рядом уникальных свойств, таких как повышенная устойчивость к растяжению [173], высокая адаптационная способность к быстрым перестройкам [174]. Таким образом, способность виментина формировать пучки/филаменты может потенциально использоваться для регуляции мезенхимального и амебоидного способов передвижения, а также выживания раковых клеток, что подчёркивает роль виментина в качестве терапевтической мишени у пациентов с онкологическими заболеваниями [7, 175].

### **1.7. Взаимодействия виментина с другими белками**

Являясь цитоскелетным каркасным белком, виментин взаимодействует с широким спектром клеточных компонентов, включая белки цитоскелета [176, 177], различные ферменты [178-180] и другие макромолекулы [181, 182]. Виментин важен для сокращения клетки при миграции, он образует взаимодействия с белком несприн-3, актомиозиновой системой и ядром и проталкивает таким образом ядро в переднюю часть клетки при миграции [143].

Отмечается важность взаимодействия виментина с филамином А в процессах адгезии и миграции клеток. Нокдаун виментина и филамина А в фибробластах снижал степень клеточных выростов на 50%, что предположительно говорит о наличии у них общего сигнального пути [183]. Филамин опосредует реорганизацию виментинового цитоскелета как напрямую, так и через регуляцию его фосфорилирования протеинкиназой С (PKC), что

влияет на транслокацию виментина к клеточной мембране и, соответственно, на распластывание клеток на поверхности [183]. В другой работе отмечалась роль киназы PAK1, которая через ассоциацию с филамином А фосфорилировала виментин и способствовала сборке его филаментов и увеличению клеточных выростов, важных для миграции [184]. Отсутствие филамина А приводило к уменьшению виментиновых филаментов, что указывает на роль филамина А в процессе сборки виментина [184]. Это также подтверждается сококализацией филамина А и виментина в мезенхимальных и раковых клетках [185].

Отмечается, что экспрессия интегринов  $\beta 1$  зависит от РКС-зависимого фосфорилирования виментина [186]. В клетках без филамина А экспрессия интегринов  $\beta 1$  также снижена, что предполагает сорегуляцию экспрессии интегрина  $\beta 1$  как через филамин А, так и через виментин. Соответственно, виментин-филаминовое взаимодействие важно также для процессов адгезии [183], клеточного сигналинга [187, 188] и формирования механической устойчивости клеток [187, 188].

Взаимодействие актиновых структур и промежуточных филаментов играет ключевую роль в процессах миграции и распространения культивируемых фибробластов [189]. Вследствие этого важным цитолинкером виментина с актиновым цитоскелетом является белок-адаптер плектин (около 500 кДа) из семейства плакинов [190, 191]. Помимо плектина к семейству плакинов относятся десмоплакин (важный компонент десмосом), энвоплакин, периплакин, эпиплакин, BPAG1e (bullous pemphigoid antigen 1e) и MACF1a (microtubule actin crosslinking factor 1) [192].

Плектин экспрессируется в большом разнообразии клеток и тканей, включая кожу и поперечно-полосатые мышцы; присутствует в гемидесмосомах, присоединяя промежуточные филаменты к цитоплазматическим доменам трансмембранных гликопротеинов, например, к интегринам [193]. Также плектин участвует в присоединении промежуточных филаментов к ядру и некоторым другим органеллам [194]. Плектин связывает промежуточные филаменты с микротрубочками и актиновыми филаментами, а также мембранными

компонентами [133]. Показано, что комплексы плектина с виментином преобладают на периферии клетки [133].

На Рисунке 4 представлена общая структура плакинов, среди которой можно выделить основные консервативные части: АСД (актин-связывающий домен), Plakin (Плакин) домен (состоящий из 4-8 спектриновых повторов), центральный домен, Plakin Repeat Domains (PRDs). Все PRD домены состоят из 4,5 копий-повторов по 38 аминокислот и имеют глобулярную структуру с уникальной укладкой. PRDs выделяют трёх типов: А, В и С. Домены В и С соединяются длинным, но достаточно консервативным линкером для всех типов семейства плакинов со сходством до 70%.

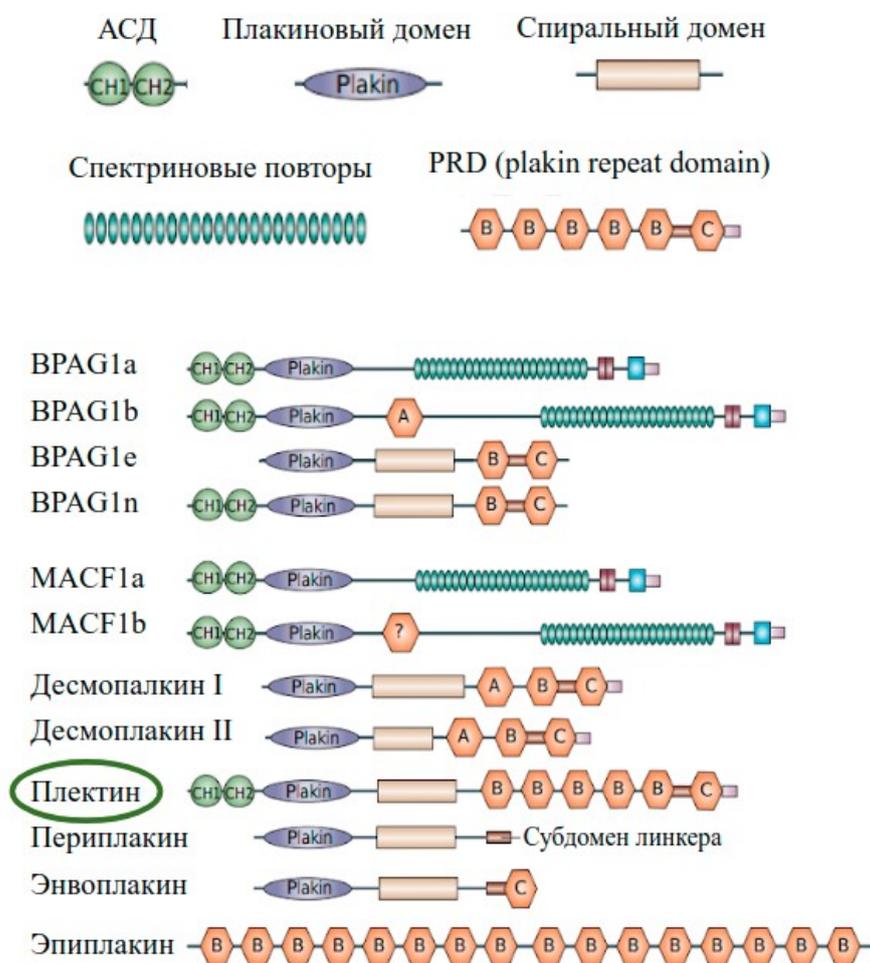


Рисунок 4. Классификация и общая структура семейства плакинов. Иллюстрация адаптирована из [192].

По структуре плектин имеет высокую гомологию с десмоплакином, но в отличие от последнего включает также АСД на N-конце. Количество PRDs у

плектина достигает 6 единиц, из которых первые пять относятся к В типу, а шестой — к С, пятые и шестой PRDs соединены линкером.

Данные по месту связывания плектина с виментином остаются неоднозначными. Показано, что взаимодействие виментина с плектином происходит в районе пятого PRD (4067-4247 аминокислоты) и его линкера (4248-4379 аминокислоты) со стороны плектина и части сегмента 1В (151-247 аминокислоты) центрального домена со стороны виментина [195, 196]. В более ранней работе [197] также указывается на специальный плектиновый сайт для связывания промежуточных филаментов, расположенный именно на 5 PRD домене плектина. Более того, показано, что этот домен может дозозависимо ингибировать сборку промежуточных филаментов *in vitro*, а также вызывать разборку уже собранных филаментов [197].

Ранее была установлена последовательность в 50 аминокислот на 5 домене PRD плектина (4262-4316), являющаяся уникальным сайтом связывания как для виментина, так и для цитокератиновых промежуточных филаментов [198]. Данный сайт, по всей видимости, является функциональным мотивом сигнала ядерной локализации, так как ядерный импорт цитоплазматических белков происходил при связывании с данной последовательностью [198]. Среди этого мотива с помощью сайт-направленного мутагенеза был выявлен специфический кластер из четырёх основных аминокислот Arg4277-Arg4280 (4274-4277), которые необходимы для связывания промежуточных филаментов. Тем не менее, выделенный участок в большей мере соответствует последовательности линкера, соединяющего пятый PRD домен с шестым [198].

Как было упомянуто ранее, белки семейства плакинов имеют сходную структуру, что может дать дополнительные данные о взаимодействиях с промежуточными филаментами. В частности для десмоплакина, состоящего из трёх типов PRDs — А, В и С, где А и В соединены коротким линкером из 4 аминокислот, а В и С — более длинным, состоящим из 154 аминокислотных остатков, была решена структура доменов А и В (PDB ID 5DZZ).

Домен В является более основным ( $pI = 4,7$ ), чем домен А ( $pI = 9$ ), на его

поверхности присутствует положительно-заряженная выемка, которая, предположительно, является сайтом связывания промежуточных филаментов. Данная выемка, предположительно связывающая промежуточные филаменты, составляет в ширину около 10-15 Å и в длину около 22-26 Å. Расположение выемки приходится между двумя половинами PRD, где с одной стороны находятся повторы 1 и 2, а с другой — повторы 3 и 4 [199].

Как упоминалось ранее, линкеру между В и С доменами также отводится большая роль в связывании промежуточных филаментов, как и В домену, но его структура неизвестна. Вследствие этого она была построена с помощью методов предсказания вторичной структуры и на основе кристаллической структуры гомологичного цитолинкера периплакина (PDB 4Q28). Построенная структура показала, что N-конец линкера (около 100 аминокислот) структурирован, в то время как С-конец, богатый сериновыми остатками, не является структурированным. Упорядоченная часть структуры линкера содержала два PR-подобных мотива, из которых состоят также и PRDs домены. PR-подобный мотив состоит из β-шпильки (хотя предсказание вторичной структуры показало возможность формирования второй β-складки), за которой следует 3 антипараллельных α-спирали [200]. Однако, исследование взаимодействия домена В десмоплакина с добавленными 114 аминокислотами линкера, построенного на основании предсказания и структуры периплакина, с промежуточными филаментами не показало более сильного связывания, по сравнению с индивидуальным доменом [200].

Другие представители семейства плакинов, такие как периплакин и энвоплакин, также показали способность самостоятельно связываться с промежуточными филаментами, в частности с виментином, хотя они не имеют PRD типа В, но имеют гомологичный консервативный линкер, что подчёркивает возможную роль именно линкера в связывании промежуточных филаментов [201]. В исследовании [202] продлённый линкер периплакина с добавленными 62 аминокислотами показал связывание с виментином. Также недавно была обозначена роль аминокислотных остатков Asp176 и Glu187 виментина в

связывании с линкером периплакина [203].

Энвоплакин имеет единственный PRD домен, который предположительно распознаёт промежуточные филаменты, но данный механизм пока неизвестен. Структура данного PRD была решена с помощью рентгеноструктурного анализа (PDB 4QMD), где была также выявлена положительно-заряженная выемка, образованная следующими аминокислотными остатками Arg1876, Arg1895, Lys1901, Arg1914, Arg1952, Lys1994 [204]. С помощью ЯМР были охарактеризованы взаимодействия энвоплакина с тетрамерным виментином. Предположительно, четыре из пяти повторов PRD энвоплакина узнают негативно-заряженные участки на виментине [204].

Для выяснения роли отдельных аминокислотных остатков в связывании был проведён сайт-направленный мутагенез. Мутации Lys1901 и Arg1914 в энвоплакине приводили к нарушению взаимодействия с виментином. Исследование с помощью поверхностного плазмонного резонанса укороченной формы виментина 99-249 с PRD доменом энвоплакина также подтвердило снижение аффинности у мутантных белков энвоплакина (K1901E, K1914E), по сравнению с нативным белком [204].

Структурные модели комплексов энвоплакина и виментина показали, что аминокислотные остатки выемки Arg1895, Lys1901, Arg1914, Arg1952 и Lys1994 играют основную роль в связывании центрального домена виментина. Для моделирования были взяты как мономерные, так и димерные формы виментина. Модель с наилучшей энергией связывания была характерна при комплексе энвоплакина с последовательностью виментина Asn102-Leu138, которая выявила участие следующих остатков со стороны виментина: Lys104, Asn111, Asp112, Asp119, Lys120 из цепи А, Glu106, Arg113, Glu125 из цепи В (PDB 3G1E). Узнавание энвоплакина нарушалось при мутациях Asp112 или Asp119 в виментине [204].

## 1.8. Вещества, влияющие на структурную организацию виментина

Одним из наиболее изученных веществ, влияющего на виментин, является стероидный лактон Витаферин А (ВА), полученный из древнего аюрведического растения Ашваганда (*Withania somnifera*). Из корней данного растения изготавливают биологически-активный препарат, обладающий свойствами афродизиака, седативным и омолаживающим воздействием [41]. Было показано, что ВА связывается с виментином и влияет на распределение виментиновых филаментов. С помощью биохимических исследований и молекулярного моделирования определено, что ВА связывается ковалентно с Cys328 в 2В регионе  $\alpha$ -спирального центрального домена виментина [42].

ВА индуцирует апоптоз клеток, вызывая коллапс виментиновой сети и формируя виментиновые перинуклеарные агрегаты. Тем не менее, было показано, что предполагаемый сайт связывания ВА — Cys328 — вероятно, не является единственным, так как мутанты по данному сайту также приводили к описанному выше воздействию ВА на виментин и клетки [50].

В тоже время показано, что ВА не является специфичным по отношению к виментину. ВА также ингибирует транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B через связывание с Cys179 киназы IKK $\beta$ , необходимой для последующей ядерной транслокации фактора NF- $\kappa$ B [43, 48, 49]. Помимо этого, ВА вызывал перинуклеарную агрегацию ещё нескольких типов промежуточных филаментов, таких как периферин, нейрофиламенты, кератины [45]. ВА влиял на организацию микротрубочек и актиновых микрофиламентов [44, 50]. В связи с этим остаётся актуальной задачей поиск более специфичных ингибиторов.

Виментин является мишенью для тиол-реактивных веществ, которые меняют его организацию [205, 206]. Реактивный липид циклопентеноновый простагландин (сyPG), продуцируемый в повышенных количествах при воспалении или оксидативном стрессе и взаимодействующий ковалентно со сигнальными белками, транскрипционными факторами и их регуляторами по цистеиновому остатку [207], также связывается и с виментином по Cys328 и вызывает реорганизацию виментиновой сети [208, 209].

Соединение  $\beta,\beta'$ -иминодипропионитрил (IDPN) вызывало не только диссоциацию виментиновых филаментов, но и их агрегацию [210]. Также отмечалась общая цитотоксичность данного соединения и его воздействие на форму клетки вследствие её открепления от субстрата [211].

Вещество, получаемое из чеснока, ajoene (E/Z- 4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene-9-oxide) как потенциальное противоопухолевое вещество было также исследовано на предмет взаимодействия с виментиновыми филаментами [137]. Ajoene разрушал сеть виментиновых филаментов в клетках через S-тиолирование цистеинового остатка виментина. Помимо этого, ajoene вызывал повышенную экспрессию виментина, что неблагоприятно ввиду и так повышенной экспрессии виментина у большинства раковых клеток [137]. Тем не менее, увеличенная экспрессия виментина не приводила к увеличению формирования виментиновых филаментов и усилению клеточной миграции [212]. Таким образом, ajoene в целом ингибировал инвазию и миграцию раковых клеток, но воздействовал не только на структуру виментина, но и на транскрипционные процессы, а также тиолировал другие клеточные белки, что указывает на неспецифичность его действия по отношению к виментину [137].

В исследовании [51] с помощью скрининга веществ было обнаружено вещество FiVe1, которое необратимо ингибировало рост и подвижность мезенхимальных трансформированных раковых клеток через связывание с центральным доменом виментина во время митоза, что нарушало его организацию и фосфорилирование. Ингибирующая (IC50) концентрация составила 234 нМ. Показано, что FiVe1 вызывает деградацию виментиновых филаментов через убиквитин-опосредованный механизм (также как и VA) [51].

Сеть виментиновых филаментов крепится к ядру и формирует вокруг него сетеподобную структуру, окружающую делящееся ядро и веретено деления. Экспрессия виментиновых мутантов по сайтам фосфорилирования приводит к многоядерности и анеуплоидии клеток, которая достигается за счёт физического препятствования процессу цитокинеза путём образования виментинового “мостика” между дочерними клетками на стадии анафазы [129, 130].

Добавление FiVe1 также нарушает фосфорилирование виментина, а именно по сайту Ser56, модифицируемого циклин-зависимой киназой 1 (CDK1). Мутант по этому сайту также вызывал появление многоядерных клеток [130]. Однако, FiVe1 приводил к изменениям не только в анафазе, но и во время метафазы: разобранные виментиновые филаменты были ассоциированы в большей степени с веретеном деления, препятствуя выравниванию хромосом вдоль метафазной пластинки. Также отмечалась неспособность  $\beta$ -тубулина сформировать микротрубочки веретена деления. Данный метафазный фенотип был уникален именно для клеток, обработанных FiVe1. Таким образом, в отличие от множества натуральных и синтетически полученных веществ, нацеленных на микротрубочки, воздействие веществом FiVe1 на виментин приводило к многоядерности и митотической катастрофе [51]. Так как повышенная экспрессия виментина ограничена мезенхимальными клетками, то предполагается возможная разработка противоопухолевой генотип-селективной терапии, основанной на виментине [51].

Тем не менее, исследование роли септинов и виментина, а также разработка ингибиторов, воздействующих на их структурно-функциональные свойства, остаётся мало изученной областью. В нашей работе мы предлагаем новые подходы по регуляции процессов пролиферации и миграции через влияние на септин-септиновые и виментин-плектиновые взаимодействия с помощью малых молекул.

## МЕТОДЫ

### 2.1. Методы молекулярного моделирования и виртуального скрининга

Виртуальный скрининг, докинг и молекулярная динамика проводились с использованием программных пакетов Schrödinger LLC (New York, USA), GROMACS 4.5.5 [213] и оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [214].

#### 2.1.1. Подготовка белковых структур и лигандов

Подготовка белковых структур производилась с помощью модуля Protein Preparation (Schrödinger, LLC, New York) [215] и включала удаление кристаллографической воды на расстоянии более 5 Å от белка, добавление полярных водородов и присвоение частичных зарядов Гастайгера. Силовое поле OPLS\_2005 использовалось для минимизации белковых структур и лигандов.

Для исследований методом виртуального скрининга использовалась библиотека PubChem [216]. Для построения фармакофора использовалась малая библиотека «FDA Pharm Classes», содержащая около 1 тысячи соединений, являющихся одобренными FDA лекарственными препаратами, прошедшими доклинические и клинические испытания. В связи с тем, что вещества были проверены относительно их безопасности, то создание на их основе фармакофора и последующего скрининга библиотеки веществ обладало более высокой вероятностью отбора безопасного соединения, пригодного для применения на человеке. Для сравнения и валидации результатов докинга в библиотеку были добавлены структуры, связывающиеся со септинами — ГТФ, ГДФ, ГТФ- $\gamma$ -S, CPPU и UR214-9. Соединение на базе модифицированного CPPU — UR214-9 — было построено в модуле Maestro (Schrödinger, LLC, New York). Большая библиотека соединений, подготовленная для процедуры виртуального скрининга, включала около миллиона субстанций из раздела «Органические соединения» базы данных PubChem.

Структуры лигандов подготавливались с использованием модуля LigPrep

(Schrödinger, LLC, New York). Лигандам приписывались частичные атомные заряды; несколько возможных состояний ионизации генерировались при pH  $7,0 \pm 2$  для каждого соединения. Минимизацию энергии проводили для каждого лиганда до тех пор, пока она не достигала СКО в  $0,01 \text{ \AA}$ .

### 2.1.2. Построение структуры по гомологии

Построение структуры по гомологии проводилось с помощью модуля Prime (Schrödinger, LLC, New York) [217]. В качестве шаблонных структур использовались наиболее близкие структурные аналоги. Построение производилось по выравниванию двух последовательностей, шаблонной и строящейся, с помощью ClustleW.

### 2.1.3. Построение 3Д-фармакофора

3Д-фармакофор для скрининга лигандов был построен на основе анализа лиганд-рецепторного комплекса септина или виментина с лигандами, отобранными после молекулярного докинга малой библиотеки «FDA Pharm Classes». Лиганды сортировались относительно их значений по встроенным оценочным функциям Glide Score, Glide Emodel, наилучшие варианты среди них были отобраны для построения фармакофора. Лиганды предварительно выравнивались для нахождения общих функциональных групп. Построение фармакофора проводилось в модуле Phase (Schrödinger, LLC, New York) [218]. Для генерации фармакофора соединения были подготовлены со следующими параметрами: до 10 конформационных состояний на одну вращающуюся связь и до 50 конформаций всего. Каждый лиганд был представлен минимум одной конформацией.

### 2.1.4. Комбинированный виртуальный скрининг на основе фармакофорного скрининга и молекулярного докинга

Для скрининга соединений использовался модуль Phase и Glide (Schrödinger, LLC, New York) [219]. 3Д-фармакофорный скрининг большой библиотеки соединений проводился по созданной ранее модели фармакофора.

Оценка пригодности лигандов в данном случае происходила исходя из СКО и направлений векторов отклонения атомов лиганда от фармакофора, описывающих отличия 3Д-структуры лиганда при наложении на фармакофор.

Пространственная ячейка для докинга имела размеры 20x20x20 Å и центрировалась по ключевым аминокислотным остаткам септина или виментина. Докинг производился в три стадии: HTVS (high-throughput virtual screening), SP (standard precision) и XP (extra precision). Результаты оценивались с помощью встроенных в пакет Schrödinger оценочных функций: Glide Score, Glide Emodel, а также по свободной энергии связывания, вычисленной по обобщённому методу Борна (MM-GBSA).

Glide Score является эмпирической оценочной функцией, аппроксимирующей свободную энергию связывания лиганда. Данный параметр включает набор составляющих, включая вклад силового поля (электростатические, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия), а также систему оценки взаимодействий, влияющих на связывание лиганда. Более отрицательные значения по Glide Score отображают более сильное связывание.

Glide Emodel также является эмпирической оценочной функцией, аппроксимирующей свободную энергию связывания лиганда, но имеет более значительный вклад компонентов силового поля, что делает её хорошо подходящей для сравнения различных конформеров. Точная формула по расчёту Emodel является запатентованной, но она включает в себя расчёты по Glide Score, энергии внутреннего напряжения лиганда ( $E_{\text{internal}}$ ) и энергии кулоновского и Ван-дер-Ваальсова взаимодействий.

Для сравнения оценочных функций в данной работе использовалась оценка свободной энергии Гиббса, вычисленная с использованием обобщённого метода Борна (MM/GBSA) для учёта эффекта сольватации на основании учёта площади поверхности структуры, контактирующей с растворителем [220].

Соединения с наилучшими показателями по Glide Score, Glide Emodel и MM-GBSA отбирались для последующих исследований. Для верификации результатов молекулярный докинг проводился также в программах,

использующих различные алгоритмы оценки: AutoDock Vina [221], DockThor [222], SwissDock [223] и CB-Dock [224].

#### 2.1.5. Молекулярная динамика

Молекулярная динамика (МД) проводилась с помощью программных пакетов GROMACS 4.5.5 по соответствующему протоколу [213] и Desmond (Schrödinger, LLC, New York) [225]. Для молекулярной динамики белок подготавливался и помещался в ячейку с размерами 1,5x1,5x1,5 нм. В пакете GROMACS использовалась модель явного растворителя (вода SPC216), в пакете Desmond — SPC. МД проводилась с добавлением 0,15M NaCl; системы предварительно были уравновешены добавлением соответствующих концентраций ионов и противоионов. Далее следовала минимизация методом наискорейшего спуска в силовом поле OPLS3e. Для релаксации использовался стандартный протокол, входящий в состав программного пакета Desmond и подходящий по информации разработчика для большинства стандартных систем. Данный протокол включал в себя две стадии минимизации (с фиксированными и нефиксированными тяжёлыми атомами), за которыми следовало четыре стадии молекулярной динамики с последовательно уменьшающимися ограничениями, шаг интегрирования составлял 2 фс. Применение данного протокола апробировано для подготовки сайта связывания белковых молекул и анализа лиганд-рецепторных взаимодействий.

Молекулярная динамика проводилась при постоянной температуре 300K и давлении с использованием термостата Нозе-Хувера и баростата Паринелло-Рамана для септинов и термостата и баростата Ланжевена для виментина. Время расчёта молекулярно-динамических траекторий указано отдельно в тексте.

Для оценки траекторий проведённой молекулярной динамики использовался параметр среднеквадратичного отклонения (СКО), измеряющий среднее отклонение выбранных атомов для каждого фрейма относительно референсной структуры. Формула для вычисления СКО (RMSD) приведена ниже:

$$RMSD_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r'_i(t_x) - r_i(t_{ref}))^2}$$

Где  $N$  — число выбранных атомов;  $t_{ref}$  — референсное время;  $r'$  — позиция выбранных атомов во фрейме  $x$  после наложения на референсный фрейм, соответствующего  $t_x$ . Данное вычисление повторяется для каждого фрейма в течение всей симуляции.

Среднеквадратичная флуктуация (СКФ) характеризует локальные изменения вдоль протеиновой цепи. Формула для вычисления СКФ (RMSF) приведена ниже:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T \langle (r'_i(t) - r_i(t_{ref}))^2 \rangle}$$

Где  $T$  — временная траектория, в течение которой вычислялся СКФ;  $t_{ref}$  — референсное время;  $r_i$  — позиция аминокислотного остатка  $i$ ;  $r'$  — позиция атомов в остатке  $i$  после наложения на референс; угловые скобки указывают на средний квадрат расстояния у выбранных атомов в остатке.

## 2.2. Экспрессия и очистка Hof1 и септинового комплекса

Для экспрессии и последующей очистки четырёх дрожжевых септинов Cdc11, Cdc12, Cdc3 и Cdc10 в клетках *Escherichia coli* (штамм BL21) были использованы два бицистронных вектора, содержащие следующие последовательности Cdc с тагами: Cdc12-6xHis, Cdc10-SNAP, Cdc11-S и Cdc3-Flag. Для экспрессии белка Hof1 в клетках *E. coli* (штамм BL21) использовалась плаزمида pMALc2, несущая последовательность MBP-Hof1-6xHis. Плазмиды были предоставлены коллегами из Brandies University, Waltham, USA.

Экспрессия белков проводилась стандартным способом. Сначала клетки выращивались до оптической плотности 1,5 в среде, содержащей антибиотика (ампициллин и хлорамфеникол — для септинов, ампициллин — для Hof1). Индукция производилась с помощью 1 mM ИПТГ, после чего клетки инкубировали 21 час при 18°C. Для выделения септинов осадок был

ресуспендирован в буфере (300 мМ NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 15 мМ имидазол, 50 мМ Tris HCl pH 8, 12% глицерол, pH 7). Лизис клеток проводился в буфере (0,1% Tween20, 40 мкМ ГДФ, β-меркаптоэтанол, лизоцим, с добавлением коктейля ингибиторов протеаз) на льду в течение 30 минут, после чего производилась обработка ультразвуком 2 раза по 3 мин и центрифугирование на 12000 об/мин при 4<sup>0</sup>С в течение 10 минут. Аналогичный протокол был использован для Hof1, лизис буфер содержал 20 мМ Tris-HCl pH 8 и 400 мМ NaCl.

Для очистки белков использовалась АКТА-FPLC хроматографическая система. Сначала супернатант был загружен в HisTrap колонку и уравновешен буфером для элюции. Белки были элюированы при помощи имидазола; после чего проведена ионообменная хроматография с использованием колонки HiTrapQ для септинов, очистка с амилозными гранулами для Hof1 (элюирование 20 мМ мальтозы и 1 мМ дитиотреитола).

Наличие очищенных белков определялось с помощью электрофореза (ДСН-ПААГ). Полученные образцы смешивали с 4-кратным буфером (0,2 М Tris (pH=6,8), 0,4 М β-меркаптоэтанол, 4% SDS, 40% глицерин, 0,01% бромфенолового синего) и инкубировали 5 минут при 97<sup>0</sup>С. Образцы наносили в полиакриламидный гель (10%) из расчёта 15-20 мкг белка на лунку. Белки разделяли при помощи электрофореза в денатурирующих условиях при постоянном напряжении 100 В в концентрирующем геле и при 180 В — в разделяющем в течение 1 часа. Для определения молекулярных масс белков использовали стандартную коммерческую смесь предокрашенных белков с известным молекулярным весом BenchMark™ (Invitrogen, USA). Окрашивание геля осуществляли раствором Кумасси (Coomassie brilliant blue G-250, Helicon).

Центрифугирование септинов для определения соотношения филаментных структур и отдельных септиновых субъединиц проводили в течение 10 минут при 16000 оборотах/минуту. Фракции из супернатанта и осадка анализировали методом электрофореза (ДСН-ПААГ).

### **2.3. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)**

Образцы в количестве 3 мкл наносили 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. Съёмка проводилась CCD камерой (Gatan, USA) с увеличением  $\times 40000$  и дефокусом 1,4-1,9 мкм. Обработка изображений проводилась в программном обеспечении RELION [226].

### **2.4. Культивирование клеточных линий**

Клеточные линии 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 CO<sub>2</sub> (Sanyo, Moriguchi, Japan), меняя среду в чашках каждые 3 дня на свежую. При достижении 80% субконфлюэнтного монослоя клетки пассировали. Для этого клетки обрабатывали раствором 0,25% трипсина (HyClone, USA) и рассаживали в соотношении 1:4. В экспериментах использовали клеточные линии 3-7 пассажа.

Для проведения экспериментов по пролиферации, миграции и иммунофлюоресценции к клеткам добавляли различные концентрации используемых веществ: Процианидин В3 (CAS 23567-23-9, Xi'an Plant Bio-engineering), CPPU (CAS 68157-60-8, Shanghai Huirui Chemical Technology Co., Ltd), разведённых в ДМСО, и Амикацин (CAS 39831-55-5, Shanghai Huirui Chemical Technology Co., Ltd), Паромомицин (CAS 1263-89-4, Shanghai Huirui Chemical Technology Co., Ltd), разведённых в дистиллированной воде.

Для видеомикроскопии и атомно-силовой спектроскопии клетки рассаживали на стерильную рельефную подложку, покрытую полилизинном в концентрации 100 мкг/мл и культивировали в течение 1-2 дней.

## 2.5. 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.

## 2.6. Иммунофлуоресценция

Клетки рассаживали на стёкла с добавлением используемых веществ и культивировали в течение 48 часов. После чего клетки фиксировали с использованием 4% параформальдегида в ФСБ (фосфатно-солевом буфере) pH 7,4 в течение 10 минут при комнатной температуре и отмывали холодным ФСБ 3 раза по 5 минут. Далее пермеабелизовали в течение 10 минут в растворе ФСБ, содержащего 0,25% Triton X-100, и три раза отмывали ФСБ по 5 минут. Блокирование неспецифического связывания антителами проводили с 0,1% Tween, 1% БСА (бычий сывороточный альбумин), 22,52 мг/мл глицина в ФСБ в течение 30 минут. Первичные антитела к септину (PA5-100077, ThermoFisher, USA), виментину (OMA1-06001, ThermoFisher, USA) или плектину (MA5-32102, ThermoFisher, USA) разводили 1:100 в 1% БСА в ФСБ с 0,1% Tween и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C, отмывали три раза ФСБ по 5 минут. Соответствующие вторичные антитела с меткой Alexa Fluor 594 (Abcam, Great Britain) разводили 1:200 в 1% БСА в ФСБ с 0,1% Tween и добавляли к клеткам. Инкубирование происходило в темноте в течение 1 часа, отмывка 3 раза ФСБ по 5 минут. Флуоресцентный сигнал регистрировали на микроскопе Axio Lab.A (Zeiss, Germany), оборудованного CCD камерой (Nikon, Japan).

Фотографии обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ [227]. Для измерений интенсивности флуоресценции в случае делящихся клеток (раздел Септины 3.1.3.3.) и для измерений в периферийных и перинуклеарных

областях (раздел Виментин 3.2.3.2.) отбирались клетки со схожей морфологией и размерами. Сигнал интенсивности флуоресценции был нормализован по медианному значению, полученному со всей клетки.

## **2.7. Wound healing assay (модель раны монослоя)**

Для оценки скорости миграции использовали модель миграции клеток в рану монослоя. Клетки высаживали в 12-луночный планшет и наращивали до монослоя. В образовавшемся монослое клеток стерильным 10-мкл жёлтым наконечником прочерчивалась “рана”. Процесс застания раневой поверхности анализировали через 0, 24 и 48 часов с помощью микроскопа Axio Lab.A (Zeiss, Germany). Изображения обрабатывались в программном пакете ImageJ [227].

## **2.8. Измерение клеточной пролиферации и жизнеспособности**

Клетки REF\_52 и MDA-MB-231 рассаживали в 12-луночный планшет при плотности  $2 \times 10^4$  клеток/мл и культивировали в стандартных условиях. Затем клетки обрабатывали либо ДМСО, либо различными концентрациями веществ: Прочианидином В3 или CPPU. По истечении желаемого времени обработки (24-72 часа) клетки собирали путём трипсинизации и подсчитывали с помощью гемоцитометра. Краситель трипановый синий использовали для подсчёта живых и мёртвых клеток.

## **2.9. Атомно-силовая спектроскопия и измерение модуля Юнга клеток**

Измерение жёсткости клеток проводилось в помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) в режиме спектроскопии. Клетки извлекались из CO<sub>2</sub> инкубатора, среда заменялась на среду Leibovitz (L-15). Измерения проводились при 37<sup>0</sup>С на атомно-силовом микроскопе Solver Bio (NT-MDT, Moscow, Russia), совмещённого с инвертированным оптическим микроскопом (Olympus, Tokyo, Japan). Для проведения экспериментов на живых клетках использовались специально приготовленные кантиливеры CSG11 (NT-MDT), модифицированные полистероновой микросферой с радиусом 4,5 мкм. Параметры кантилевера были следующие: длина 350 мкм, ширина 35 мкм, толщина 0,95 мкм, средняя силовая

константа 0,03 Н/м. Средняя глубина индентации равнялась 500 нм.

До и после измерений модуля Юнга у клеток соотношение между сигналом фотодиода и отклонением кантилевера (чувствительностью) калибровалось путём записи нескольких силовых кривых и вычислением их наклона на пустом участке подложки. Для вычисления модуля Юнга 15 силовых кривых в трёх повторностях были сняты с лидирующего и заднего краёв для каждой клетки независимо. Силовые кривые были обработаны согласно процедуре, описанной в работе [228]. Модуль Юнга вычислялся с использованием модели Гертца [229]:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1-\nu} \delta^{3/2} \sqrt{R},$$

Где  $E$  — локальный модуль Юнга,  $\nu$  — соотношение Пуассона для клеток.

В проводимых экспериментах соотношение Пуассона принималось равным 0,5. Модель Гертца является применимой для кантилеверов, модифицированных микросферами. Использование микросферы вместо остроугольного кантилевера позволяет проводить измерения на живых клетках. Модуль Юнга рассчитывался в программах Image Analysis program (NT-MDT) и OriginPro program (Originlab Corp., Northampton, MA) с использованием специально разработанного скрипта для обработки силовых кривых [230]. Случаи, когда вариативность модуля была более 100% или в случае измерения жёсткости близко к краю клетки, когда модуль Юнга возрастал резко и значительно, исключались из вычислений.

Получение изображений клеток с флуоресцентно-меченым С6-NBD-керамидом аппаратом Гольджи и последующая запись силовых кривых проводились на Integra Spectra (NT-MDT), совмещённого с оптическим микроскопом Olympus IX71, включая также АСМ сканирующую головку Smena и спектрометр Solar ТII. Integra Spectra позволяет записывать флуоресцентный сигнал и силовые кривые от одной и той же клетки. Для регистрации флуоресценции использовалась длина волны, равная 488 нм. Размер полученных флуоресцентных изображений был 30×30 или 40×40 микрон, 16×16 пикселей.

Полный спектр флуоресценции был записан в каждой точке, также как и общая интенсивность сигнала в диапазоне 510-530 нм.

Вторая часть экспериментальных работ по измерению модуля Юнга проводилась на базе Сеченовского университета совместно с Ефремов Ю.М. Все АСМ измерения проводились с использованием атомно-силового микроскопа Bioscope Resolve (Bruker, Санта-Барбара, Калифорния), совмещённого с инвертированным оптическим микроскопом Axio Observer (Carl Zeiss, Германия). Микроскоп имеет систему поддержания температуры, поэтому во время экспериментов с клетками температура поддерживалась постоянной на уровне 37°C.

В работе использовались зонды PeakForce QNM-Live Cell (PFQNM-LC-A-CAL, Bruker AFM Probes, Камарилло, Калифорния, США), которые представляют собой короткие кантилеверы в форме лопастей с предварительно откалиброванной силовой константой (значения находились в диапазоне 0,06-0,08 Н/м) и с наконечником радиусом 70 нм и длиной 17 мкм. Диапазон отклонений кантилевера (нм/В) был откалиброван по тепловому спектру непосредственно в чашке с образцом с использованием предварительно откалиброванного значения жёсткости пружины.

Режим Fast Force Volume использовался для наномеханического картирования карт размером от 32x32 до 128x128 точек и от 40x40 до 100x100 мкм. Индивидуальные силовые кривые были получены при скорости ~180 мкм/сек с заданным значением силы 0,5-1 нН. Численная обработка силовых кривых была выполнена с использованием программы MATLAB (The MathWorks, Natick, MA) в соответствии с предыдущими работами [230, 231] и с использованием скорректированной модели Герца.

Значения модулей Юнга в экспериментах с применением разных типов кантилеверов различались в абсолютных величинах, но относительные величины были сопоставимы. Показано, что при использовании кантилеверов, снабжённых наконечником в виде микросферы (радиус, в среднем около 2-15 мкм) значения модуля Юнга получаются меньше (в частности, в 10 раз), чем при измерениях

пирамидальным типом кантилеверов (радиус, в среднем, около 10 нм) [231].

## **2.10. Статистическая обработка**

Каждый эксперимент проводился не менее, чем в трёх повторностях. Представленные данные отражают средние значения  $\pm$  стандартное отклонение. Для проверки достоверности отличий в численных данных между опытными и контрольными группами использовался t-критерий Стьюдента, для исследований значимости различий между средними значениями — однофакторный дисперсионный анализ. Корреляционный анализ Пирсона использовался для анализа корреляции между двумя показателями. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Септины

#### 3.1.1. Септины в месте деления клеток способны пространственно организовывать актиновые филаменты, в том числе при участии актин-связывающих белков

Во время деления клеток на последних этапах цитокинеза актиновые филаменты должны быть пространственно организованы и выровнены относительно друг друга, опосредуя полярность и везикулярный транспорт между клетками. Помимо этого, актиновые филаменты необходимы для функционирования сократительного аппарата делящихся клеток [93, 96].

Используя модель эукариотических клеток *S. cerevisiae*, мы показали, что ассоциированный с перетяжкой актин-связывающий белок Hof1, регулирующий процесс цитокинеза у дрожжей, напрямую связывается как с актиновыми, так и септиновыми филаментами *in vivo* и организует их в специальные пучки [232].

С помощью TIRF (total internal reflection fluorescence) микроскопии с коллегами Mikael Garabedian, Bruce Goode (Brandeis University, USA) были прослежены взаимодействия флуоресцентно-меченого полноразмерного Hof1 с мечеными актиновыми филаментами и формирование связанных Hof1 актиновых пучков. Пучки формировались и при использовании такой же концентрации немеченого Hof1 (Рисунок 5).



Рисунок 5. Изображения TIRF-микроскопии (слева): 2 мкМ актин (меченный Oregon-green) с добавлением 100 нМ SNAP<sup>549</sup>-Hof1-FL. Изображение TIRF-микроскопии (справа): 2 мкМ актина (меченного Oregon-green) с добавлением 100 нМ Hof1-FL.

Способность Hof1 формировать пучки с актином была подтверждена нами с помощью ПЭМ. Частицы Hof1 декорировали актиновые филаменты, равномерно

располагаясь преимущественно на расстоянии 20-30 нм (Рисунок 6А). Частицы, не связанные с актином, были собраны и классифицированы, как и частицы на актине. Классы показали схожую форму как для “связанных”, так и для “несвязанных” частиц и соответствовали по длине димерам Hof1 (длина составила 20 нм) (Рисунок 6Б).

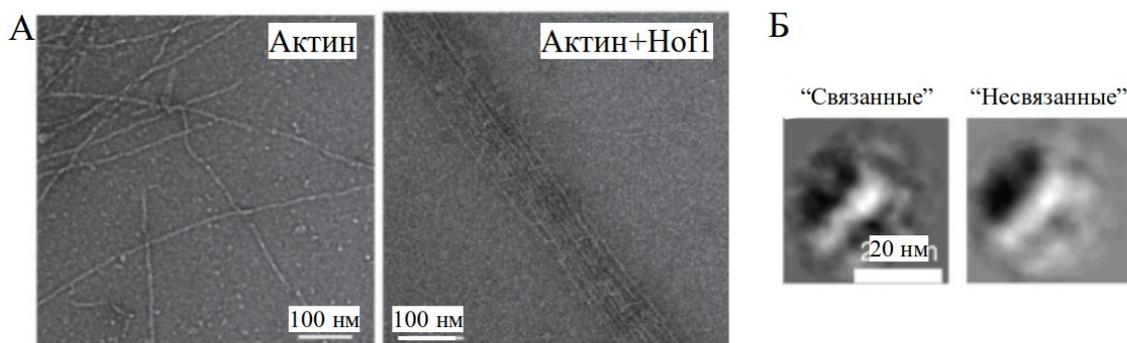


Рисунок 6. (А) ПЭМ негативно окрашенных актиновых филаментов без Hof1 и с добавлением 500 нМ Hof1-FL. (Б) Усреднённые 2Д классы Hof1 частиц, полученные с помощью ПЭМ (слева частицы Hof1, не связанные с актиновыми филаментами; справа частицы Hof1, связанные с актиновыми филаментами).

Для определения, какой домен Hof1 белка осуществляет взаимодействие с F-актином, были получены и сравнены различные конструкции Hof1 белка (Рисунок 7А). Способность формировать пучки была оценена на меченых актиновых филаментах с помощью коэффициента вариации. Большее значение коэффициента соответствовало большему связыванию, меньшие значения отражали большую дисперсность в измерениях. Оказалось, что варианты Hof1-СТ или Hof1-линкер (100 нМ; без SH3 домена) связываются с актином также, как и полноразмерный Hof1. Остальные домены показали связывание значительно слабее. Таким образом, Hof1 именно линкерным доменом связывается с актиновыми филаментами.

Основываясь на полученных данных, была предложена модель взаимодействия Hof1 с актином (Рисунок 7Б). В данной модели два линкерных домена димерного Hof1 сшивают актиновые филаменты друг с другом.

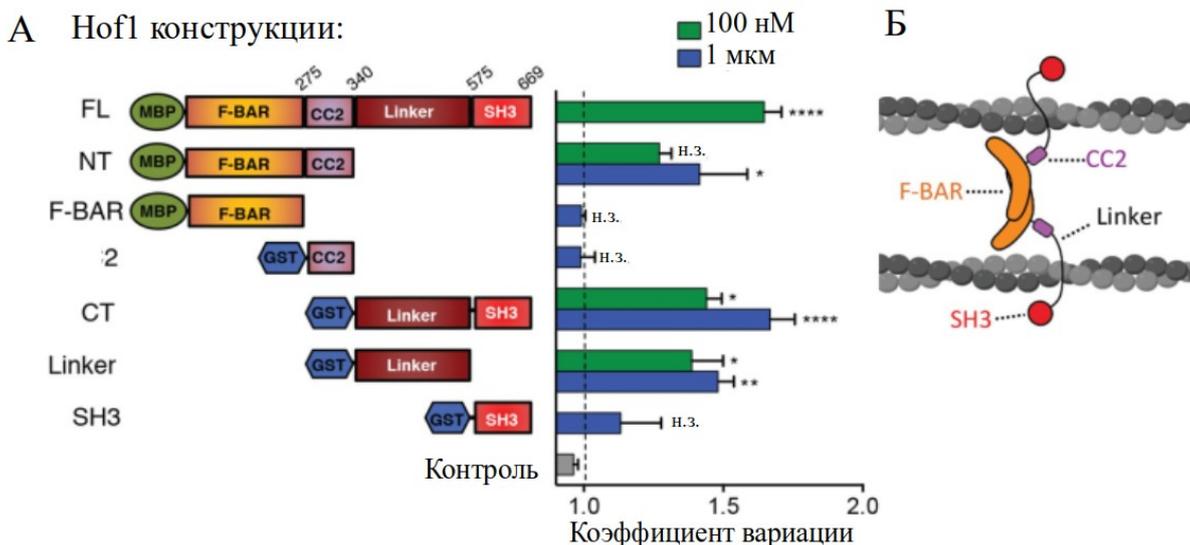


Рисунок 7. (А) Схема конструкций Hof1, протестированных в TIRF-микроскопии. Статистическая значимость по сравнению с контролем (н.з., нет значимости,  $p > 0.05$ ,  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ ,  $****p \leq 0.0001$ ). (Б) Модель взаимодействия димера Hof1 с актиновыми филаментами (создана с помощью Biorender.com).

С помощью электронной микроскопии мы показали, что септиновые филаменты также могут взаимодействовать с Hof1 (Рисунок 8).

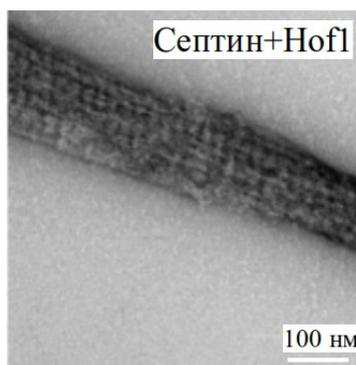


Рисунок 8. ПЭМ негативно окрашенных септиновых филаментов с 500 нм Hof1-FL.

Результаты TIRF-микроскопии подтвердили, что в отсутствие Hof1 взаимодействие между актиновыми и септиновыми филаментами минимально. В присутствии же Hof1 актин и септин значительно солокализуются (Рисунок 9А, Б), что предполагает роль септинов в качестве актин-координирующего центра в привлечении актин-связывающих белков, таких как Hof1, для организации актиновых филаментов в месте деления клеток.

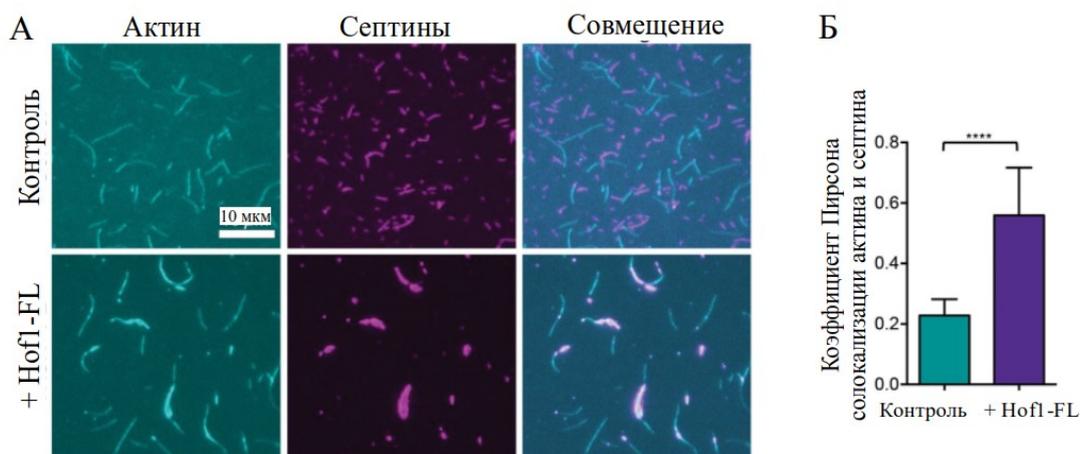


Рисунок 9. (А) Репрезентативные изображения TIRF-микроскопии актиновых (1 мкМ актина, меченого Oregon-green) и септиновых филаментов (50 нМ меченых SNAP549 септинов) без Hof1 (верхний ряд) или в реакциях с 50 нМ Hof1-FL (нижний ряд). (Б) Коэффициент корреляции Пирсона сококализации актиновых и септиновых филаментов в присутствии и отсутствии Hof1-FL (\*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ).

Таким образом, каркасная структура в месте цитокинеза, сформированная септинами, в свою очередь рекрутирует белок Hof1, который связывает и организует актиновые филаменты. Учитывая, что нарушение функции или удаление разных типов септинов приводит к дефектам цитокинеза [26-31, 98], нами была предложена гипотеза, что влияние на филаментную организацию септинов может также повлиять на процесс пролиферации (Рисунок 10). Для проверки этой гипотезы нами была проведена работа по подбору ингибитора сборки септиновых филаментов с помощью методов молекулярного моделирования и изучено его влияние на процесс пролиферации клеток.

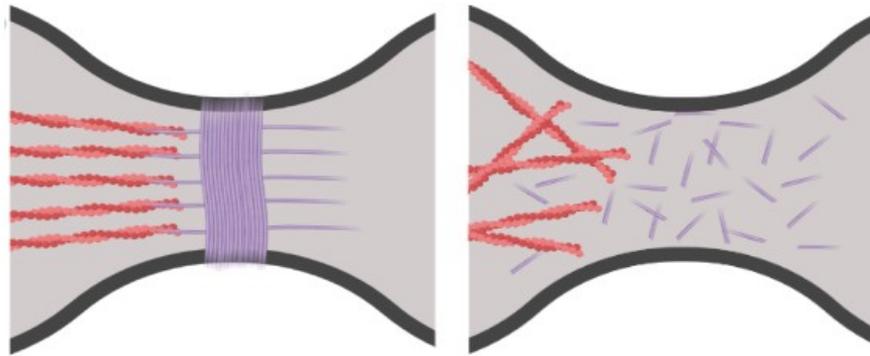


Рисунок 10. Схема септин-организующего центра актиновых филаментов в месте разделения клеток (слева) и нарушенная организация септин-координирующего центра (справа); актин показан красным, септин — сиреневым (создана с помощью Biorender.com).

### 3.1.2. Виртуальный скрининг соединений, влияющих на полимеризацию септиновых филаментов

Так как септины являются ГТФ-связывающими белками, для полимеризации и стабилизации структуры которых необходимы молекулы нуклеозидтрифосфатов, то сначала была проанализирована структура димерного септина в комплексе с ГТФ с целью идентификации аминокислотных остатков, принимающих участие в данном взаимодействии [298].

#### 3.1.2.1. Взаимодействие ГТФазного домена септина с ГТФ

В качестве таргетной молекулы была выбрана кристаллическая димерная структура септина 9 (PDB ID 5CYP) (Рисунок 11А). Во-первых, так как этот тип септина ещё не исследовался на предмет влияния на него малых молекул, в том числе и единственного известного ингибитора септинов — СРРУ. Во-вторых, септин 9 является замыкающим фрагментом октамерной септиновой единицы в большинстве случаев и соединяет соседние октамеры в филаменты [233]. В-третьих, септин 9 имеет треониновый остаток, необходимый для гидролиза ГТФ [60], соответственно, предполагается высокая значимость нуклеозидтрифосфатов в данном сайте, выполняющих не только стабилизирующую функцию, но и каталитическую.

Для комплекса септина 9 с нерасщепляемым аналогом ГТФ (ГТФ- $\gamma$ -S),

присутствовавшего в кристаллографической структуре PDB ID 5CYP, была проведена молекулярная динамика для идентификации аминокислотных остатков, принимающих участие в связывании лиганда. На Рисунке 11Б показано, что система лиганд-рецептор (SEPT9-ГТФ- $\gamma$ -S) в результате динамики была уравновешена в течение 1 нс, так как среднеквадратичное отклонение к было в пределах 2,4 Å. СКО лиганда относительно белка и его связывающего сайта также указывают на то, что лиганд занял своё положение в связывающем сайте (Рисунок 11Б).

График СКФ демонстрирует флуктуирующие области септина 9 (Рисунок 11В). Помимо подвижных N- и C-концов, выделяется много локальных районов, соответствующих петлям, перемежающимся с более стабильными вторичными структурами в виде  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -стрендов септина. Тем не менее, вторичная структура белка оставалась стабильной во время симуляции, процентное соотношение вторичных структур не изменилось.

СКФ лиганда ГТФ- $\gamma$ -S также была проанализирована относительно белка (Рисунок 11Г). Как видно, наибольшую стабильность имеют хорошо зафиксированные две последние фосфатные группы ГТФ- $\gamma$ -S, которые вносят наибольший вклад в связывание. Наибольшую же подвижность у лиганда имеют кислород (10) первой фосфатной группы и гидроксильные группы (18, 20) рибозного кольца.

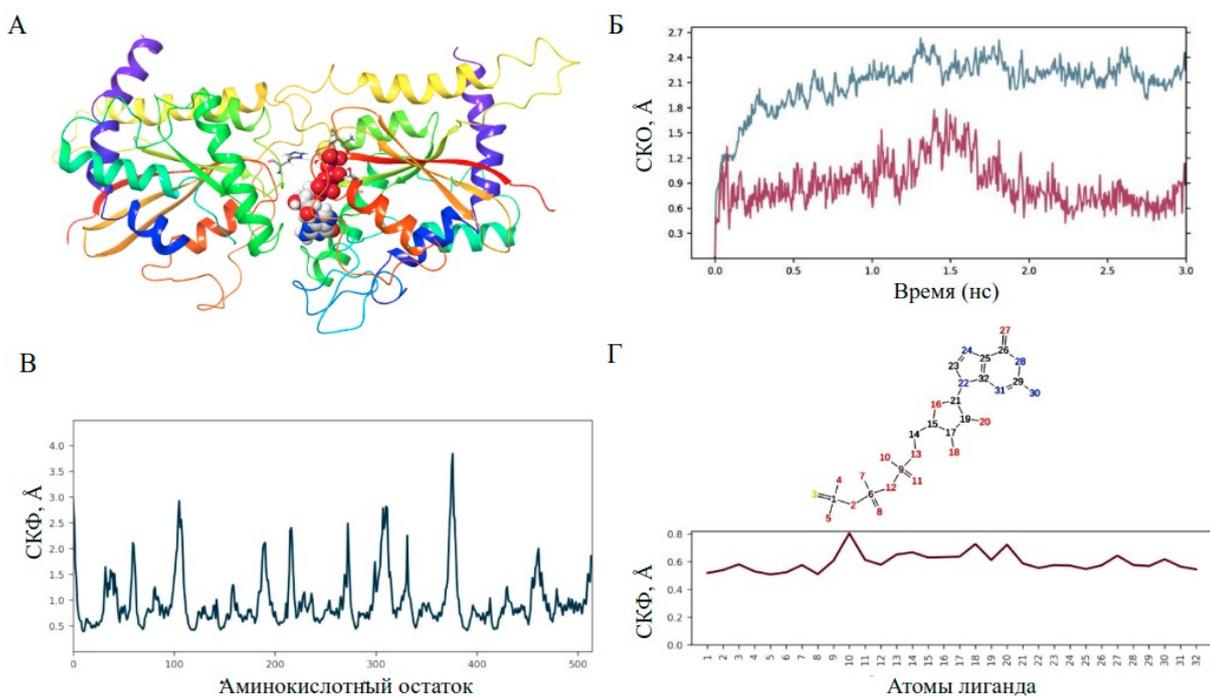


Рисунок 11. (А) Димерная кристаллическая структура септина 9 со связанным ГТФ- $\gamma$ -S (PDB ID 5CYP). (Б) СКО в зависимости от времени: синий —  $C\alpha$  атомы септина 9 относительно референсного фрейма, красный — лиганд относительно септина 9. (В) СКФ аминокислотных остатков (по  $C\alpha$ ) септина 9. (Г) СКФ лиганда — ГТФ- $\gamma$ -S — относительно септина 9.

Помимо этого, во время симуляции было также проанализировано, какие взаимодействия возникают между белком и лигандом и как часто. На Рисунке 12 показано распределение данных взаимодействий, а также указаны аминокислотные остатки, участвующие в них. Гистограмма на Рисунке 12 показывает, как часто аминокислотный участок взаимодействует с лигандом в течение всей симуляции. Значения больше 1 означают, что аминокислотный остаток поддерживал множество взаимодействий того же типа с лигандом, но через разные атомы. Так, можно выделить Lys36, Ser37, Thr38, Arg60, Lys170, Asp172 как основных участников в образовании водородных связей; Ser37, Thr64, Asp87 — в образовании ионных связей; Arg241 — гидрофобного взаимодействия; Leu61, His145, Glu178 — в образовании водных мостиков.

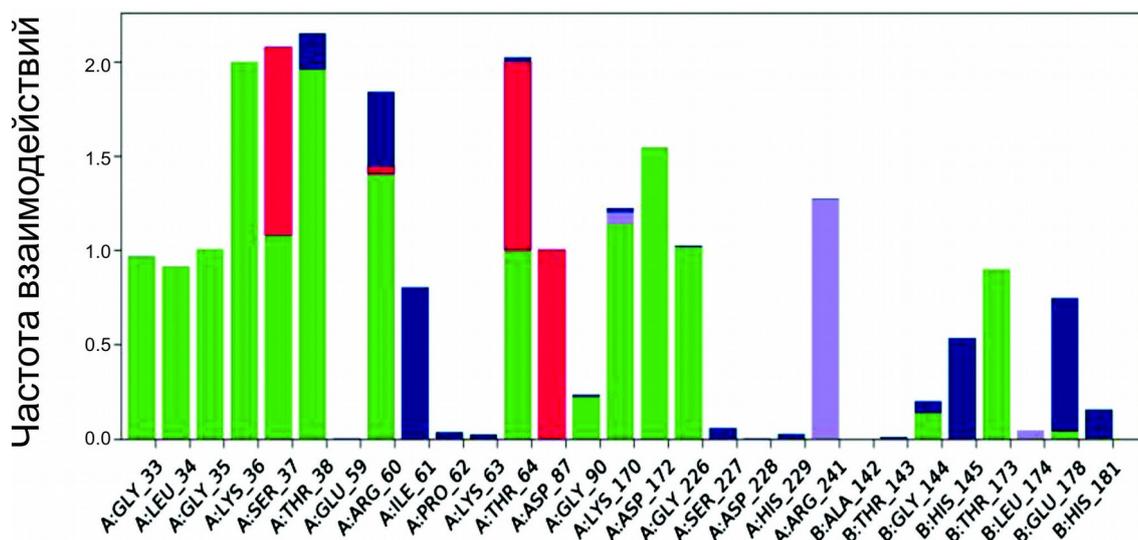


Рисунок 12. Гистограмма взаимодействий аминокислотных остатков септина 9 с лигандом ГТФ- $\gamma$ -S. Зелёным показаны водородные связи, сиреневым — гидрофобные, розовым — ионные, синим — водные мостики.

На Рисунке 13 показан суммарный анализ взаимодействий белок-лиганд на протяжении всей симуляции. Всего в среднем регистрировалось около 22 контактов между белком и лигандом, максимальное количество доходило до 28, минимальное — до 16. На рисунке 13А представлена градация “силы” аминокислотного остатка, то есть чем больше он образует различных контактов с лигандом, тем насыщеннее цвет. Таким образом, одни из самых “сильных” аминокислотных остатков — Lys36, Ser37, Thr38, Arg60, Thr64, которые на протяжении всей симуляции постоянно контактировали с лигандом (Рисунок 13А). На Рисунке 13Б показана схема взаимодействий лиганда ГТФ- $\gamma$ -S с аминокислотами септина 9.

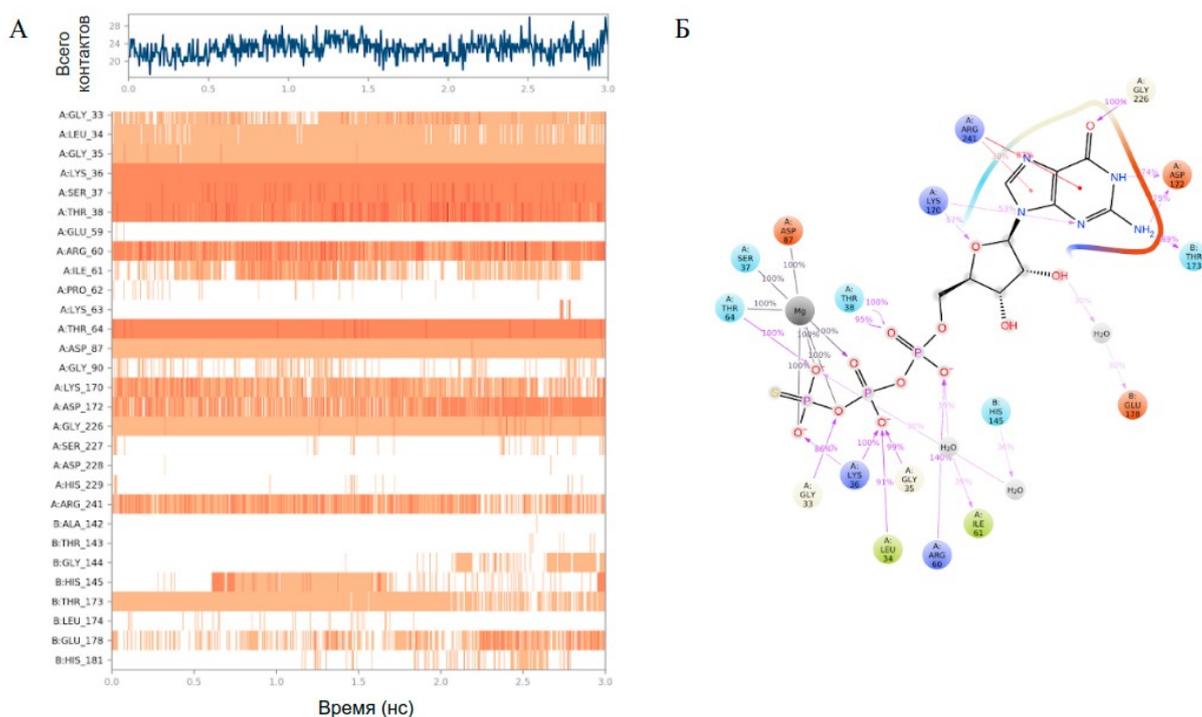


Рисунок 13. (А) Гистограмма контактов белок-лиганд в течение всей симуляции. (Б) Схема лиганда ГТФ- $\gamma$ -S и его взаимодействий с аминокислотами септина 9.

Таким образом, для поиска малых молекул, нарушающих полимеризацию септиновых филаментов, была поставлена задача отобрать соединения, предотвращающие связывание ГТФ и стабилизацию димерной структуры септина 9. Для этого необходимо было смоделировать конформационную структуру мономера септина до его связывания ГТФ.

В связи с этим после анализа “открытой” конформации сайта связывания димерной формы септина 9, то есть доступной для связывания ГТФ, была проведена молекулярная динамика в течение 50 нс данной структуры без лиганда для выяснения конформационных изменений, характерных для “закрытого” типа септина 9, то есть без наличия ГТФ в сайте связывания (Рисунок 14А). Уравновешенная мономерная структура “закрытой” субъединицы септина 9 использовалась далее для виртуального скрининга библиотеки соединений.

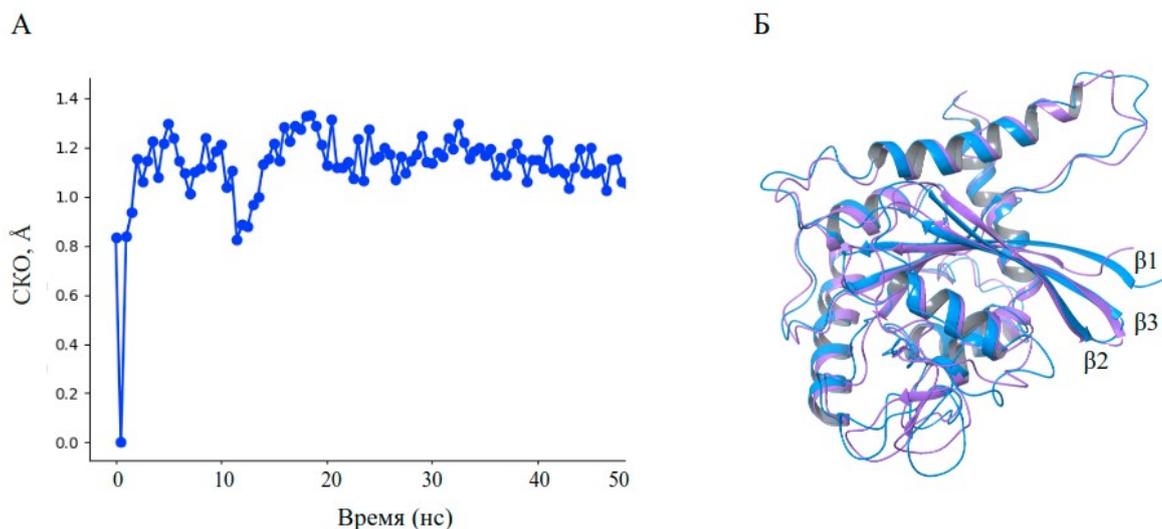


Рисунок 14. (А) СКО мономерной формы септина 9 (по боковым группам) относительно референсного фрейма в зависимости от времени. (Б) наложение структур септина 9 в “открытой” (синий) и “закрытой” (фиолетовый) конформации.

При наложении структуры с лигандом на димерную структуру без лиганда по  $C\alpha$  атомам СКО составило  $3,44 \text{ \AA}$ , однако, в сайте связывания ГТФ без лиганда произошли конформационные изменения. Заметно отклонился на  $\approx 10\text{-}15^\circ$  вниз первый центральный  $\beta$ -стрэнд (Рисунок 14Б). При гидролизе ГТФ сдвиг данного  $\beta$ -стрэнда происходит вверх [54], что указывает на пре-конформационное состояние (до ГТФ) у полученного нами мономера. Также были идентифицированы изменения в локализации петель, принимающих участие в связывании ГТФ [298].

### 3.1.2.2. Комбинированный скрининг библиотеки малых молекул для предотвращения полимеризации септинов

Для построения фармакофора была выбрана малая библиотека базы PubChem — «FDA Pharm Classes», содержащая ориентировочно 1000 соединений. Пространственная ячейка размером  $20*20*20 \text{ \AA}$ , по которой проводился докинг, центрировалась по координатам  $-6.943*14.994*-0.952 (X*Y*Z)$  и была ориентирована на место связывания фосфатных групп нуклеотида, а также на область присоединения второй септиновой субъединицы. По совокупности

лучших значений отобранных соединений на основании Glide Score, Glide Emodel и энергии связывания MM-GBSA, были определены функциональные группы, важные для формирования взаимодействий лиганд-белок в рассматриваемом сайте. На основании проведённого анализа был сконструирован фармакофор, содержащий 5 основных функциональных групп: 2 акцепторные и 3 отрицательно-ионные (Рисунок 15А). Со стороны белка-рецептора были выделены следующие аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии с лигандами: Lys170, Arg241, Lys242, Lys244 и Ile61, находящиеся в “боковой” области стыковки двух септиновых субъединиц (Рисунок 15Б, В). По данному фармакофору проводился скрининг полной библиотеки соединений с помощью программного обеспечения Glide (Glide, Schrödinger, LLC, New York).

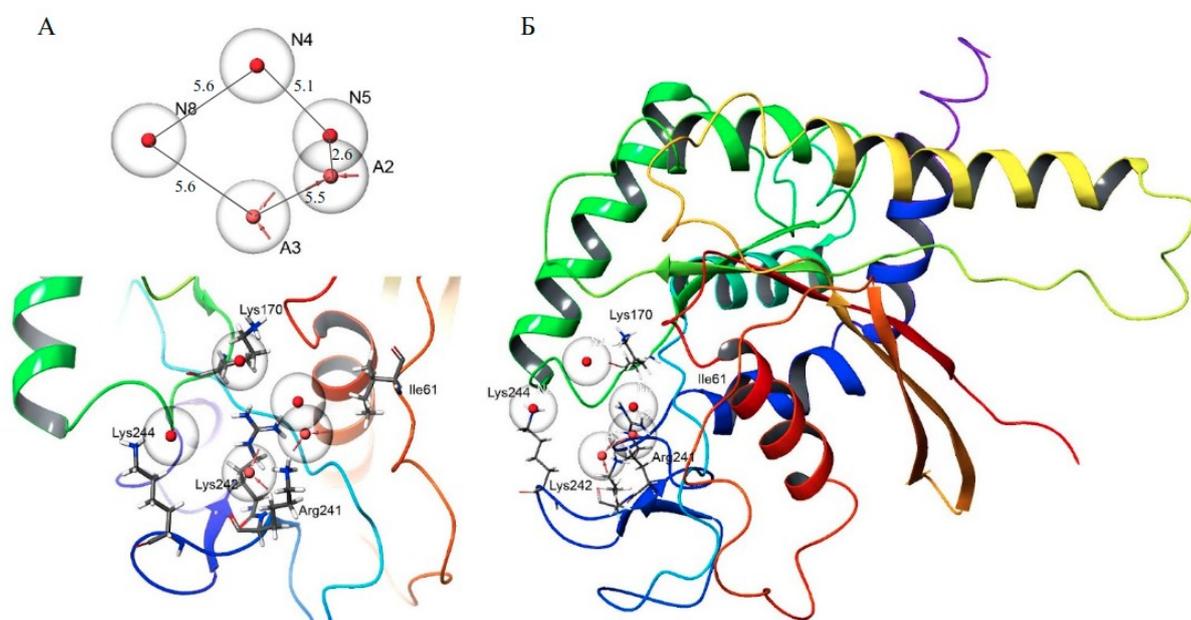


Рисунок 15. (А) Фармакофор (А — акцепторная группа, N — отрицательно-ионный тип группы) с обозначенными расстояниями (Å) между функциональными группами; снизу приближенный вид фармакофора в комплексе с септином 9, выделены ключевые аминокислотные остатки. (Б) Общий вид положения фармакофора и септина 9.

После этого был проведён скрининг большой библиотеки соединений (около 1 миллиона) через фармакофор с помощью программного обеспечения Glide (Glide, Schrödinger, LLC, New York) в несколько стадий, начиная с HTVS до

более точного SP и XP, позволяющих исключить ложноположительные результаты. Соединения после скрининга были ранжированы согласно параметрам Glide Score, Glide Emodel и MM-GBSA. Вещества, связавшиеся с наибольшей аффинностью, перечислены в Таблице 2.

Потенциальная биологическая антинеопластическая активность отобранных соединений оценивалась с помощью веб-сервиса PASSonline [234]. Программа учитывает около 4000 различных видов биологической активности веществ, но на данный момент не учитывается такая специфическая активность как ингибирование полимеризации септиновых филаментов. В связи с этим оценивалась более общая активность, а именно антинеопластический эффект соединения. Таким образом, для соединений Лезинурад и Метокарбамол данная активность не предсказывалась, для соединений CPPU и UR214-9 она составляла около 0,2, для соединения Лодоксамид и Метотрексат — 0,3, для Панобиностата — 0,44, Микофеноловой кислоты — 0,46 и Процианидина — 0,582. Таким образом, можно предполагать возможный эффект Процианидина В3 на онкологические процессы, в частности, через снижение пролиферации, на которую изначально был направлен поиск малых молекул, препятствующих полимеризации септинов в месте деления клеток.

Таблица 2 — Отобранные соединения после молекулярного докинга на мономерной форме септина 9

№	Номер вещества в базе PubChem	Название вещества	Glide Score	MM-GBSA, ккал/моль	Glide Emodel	MM-GBSA, ккал/моль	Предсказанная биологическая активность (антинеопластическая)
1	135398633	ГТФ	-8,313	-31,27	-63,713	-37,52	Не определена
2	135398675	ГТФ-γ-S	-8,25	-29,53	-63,542	-31,2	Не определена
3	135398619	ГДФ	-8,824	-33,67	-63,366	-33,49	Не определена
4	126941	Метотрексат	-3,694	-27,25	-36,609	-21,27	0,319
5	6918837	Панобиностат	-5,03	-28,22	-56,272	-30,78	0,44
6	44564	Лодоксамид	-6,813	-28,72	-59,331	-37,52	0,351
7	446541	Микофеноловая кислота	-7,94	-31,53	-54,785	-31,53	0,463
8	53465279	Лезинурад	-7,263	-30,86	-47,539	-30,86	-
9	73417413	Метокарбамол	-4,31	-26,49	-40,735	-25,17	-
10	93379	СРРУ	-2,175	-20,36	-30,396	-19,02	0,263
11	-	UR214-9	-2,341	-25,44	-37,638	-23,44	0,194
12	146798	Процианидин В3	-9,339	-30,64	-70,429	-35,64	0,582

Наиболее аффинные 12 соединений были протестированы также с помощью других программ для молекулярного докинга, таких как AutoDock Vina [221], DockThor [222], SwissDock [223] и CB-Dock [224]. Каждая упомянутая программа использует свой алгоритм оценки белок-лигандных взаимодействий, что позволяет сопоставить и сравнить полученные результаты скрининга. В программе AutoDock Vina используется “Lamarckian Genetic Algorithm” (LGA) [235], DockThor — “Dynamic Modified Restricted Tournament Selection” (DMRTS) [236], SwissDock — “Dihedral Space Sampling” (DSS), EADock [237], CB-Dock — “Curvature-based cavity detection approach” [224], Glide\_XP — “Anchor-and-grow sampling approach” [238]. Результаты представлены на Рисунке 16.

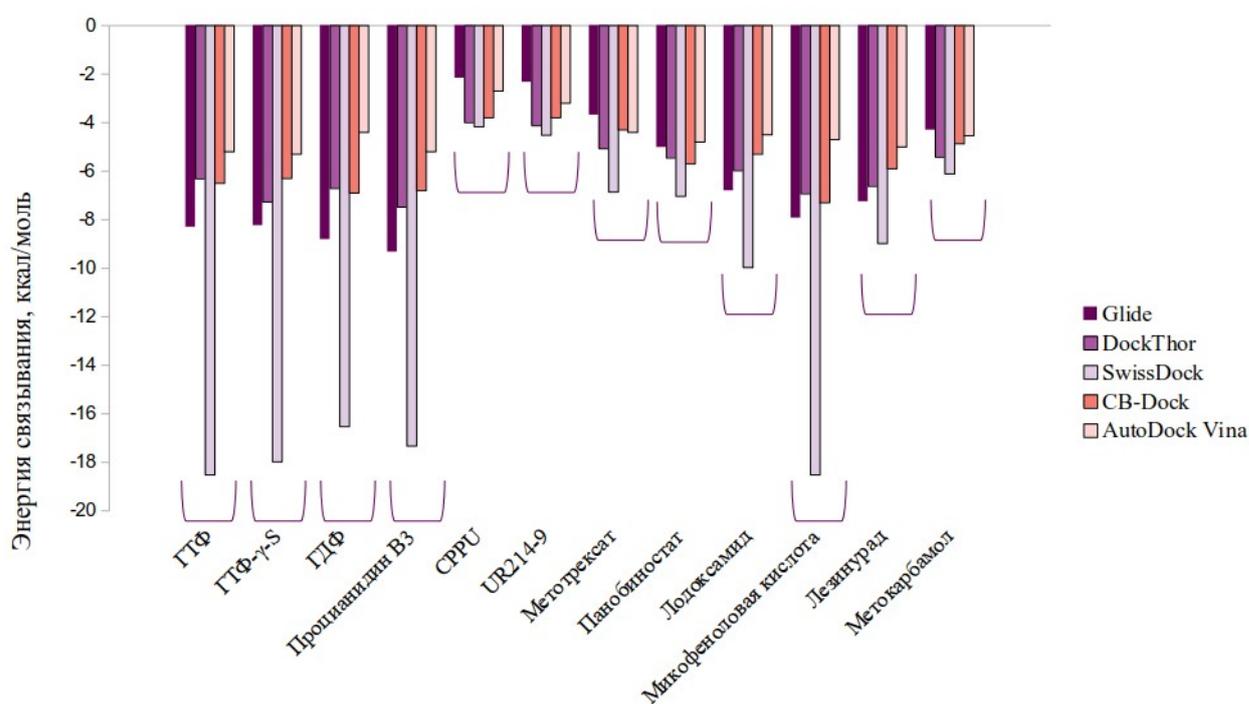


Рисунок 16. Молекулярный докинг соединений в программных пакетах Glide\_XP, DockThor, SwissDock, CB-Dock, AutoDock Vina.

Результаты докинга в указанных программных пакетах оказались сопоставимы друг с другом (Рисунок 17). Так, более отрицательное значение энергии связывания отражает большую стабильность комплекса лиганд-рецептор. Наибольшую аффинность к септину имели вещества ГТФ и его производные, а также Прозианидин В3 и Микофеноловая кислота, наименьшая была у CPPU и

его аналога UR214-9, остальные находились в среднем диапазоне [298].

Для валидации аффинных соединений была выбрана оценочная функция Glide Emodel, так как она имела наилучшую корреляцию с ММ-GBSA ( $R^2 = 92\%$ ,  $p < 0.001$ ). В итоге для дальнейших исследований было выбрано вещество Процианидин В3, которое показало наибольшую аффинность при связывании с мономерной формой септина 9 (Рисунок 17). Так как Процианидин В3 по связыванию оказался приблизительно на одном уровне по сравнению с ГТФ и его производными, то предполагаемая аффинность Процианидина В3 к септину 9 может быть приблизительно оценена с диапазоном экспериментальных значений аффинности ГТФ и ГДФ к септинам, составляющего 3-6 мкМ, соответственно [52].

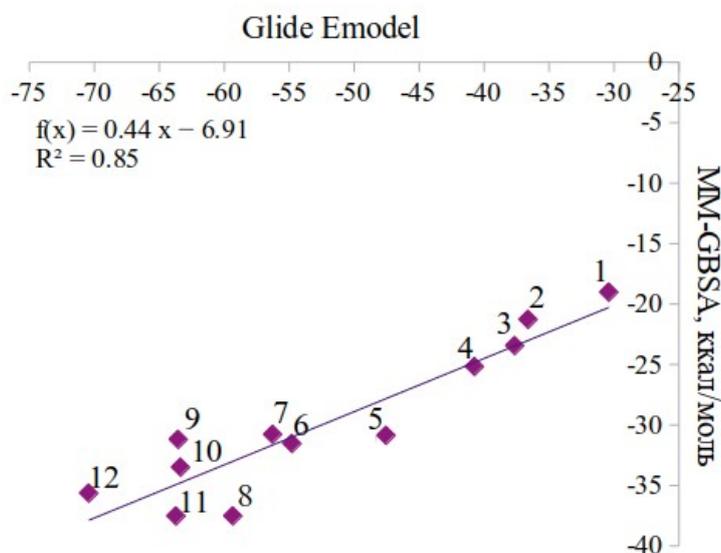


Рисунок 17. Оценочная функция Glide Emodel относительно значений свободной энергии ММ-GBSA (ккал/моль) малых молекул: CPPU (1), Метотрексат (2), UR214-9 (3), Метокарбамол (4), Лезинурад (5), Микофеноловая кислота (6), Панобиностат (7), Лодоксамид (8), ГТФ- $\gamma$ -S (9), ГДФ (10), ГТФ (11), Процианидин В3 (12);  $p < 0.001$ .

Для дальнейших исследований было выбрано вещество Процианидин В3, так как второе вещество с наиболее высокой аффинностью — Микофеноловая кислота, хоть и связывалось со септином 9, но не препятствовало формированию димерной формы септина, а, наоборот, обеспечивало его стабильность, что было показано в ходе молекулярного моделирования. Процианидин В3, в свою очередь,

с высокой аффинностью связывался с консервативным сайтом посадки ГТФ на мономерной структуре септина 9 и предотвращал присоединение второй септиновой субъединицы, что является нужным в данном случае эффектом.

### 3.1.2.3. Анализ комплекса септина 9 с Процианидином В3

Для анализа образуемых взаимодействий между мономером септина 9 и Процианидином В3 проводили молекулярную динамику. Комплекс достигал равновесного состояния в течение 1 нс, отклонение белка составляло не более 1,5 Å, а лиганда - не более 1 Å (Рисунок 18А). Структура мономера в комплексе с Процианидином В3 была стабильной, в частности, регионы аминокислотных остатков 100-120, 180-210, по сравнению с димерной формой септина в комплексе с ГТФ-γ-S. Среднеквадратичные флуктуации указанных регионов достигали 2,5-3 Å у комплекса с ГТФ-γ-S (см. Рисунок 11В), по сравнению с значениями 1,5-2 Å у комплекса с Процианидином В3 (Рисунок 18А). Вторичная структура белка не нарушалась (Рисунок 18А). Учитывая, что значение ΔG (свободной энергии Гиббса) комплекса септина 9 с Процианидином В3, рассчитанное методом MM-GBSA, составило около -35 ккал/моль (или -147 кДж/моль) в начальной позиции и -52 ккал/моль (или -209 кДж/моль) после молекулярной динамики, то можно предполагать высокую стабильность данного лиганд-рецепторного комплекса. Изображение комплекса SEPT9 с Процианидином В3 представлено на Рисунке 18Б в виде изображения поверхности, также показан приближенный вид на лиганд и формируемые им взаимодействия с аминокислотами септина 9.

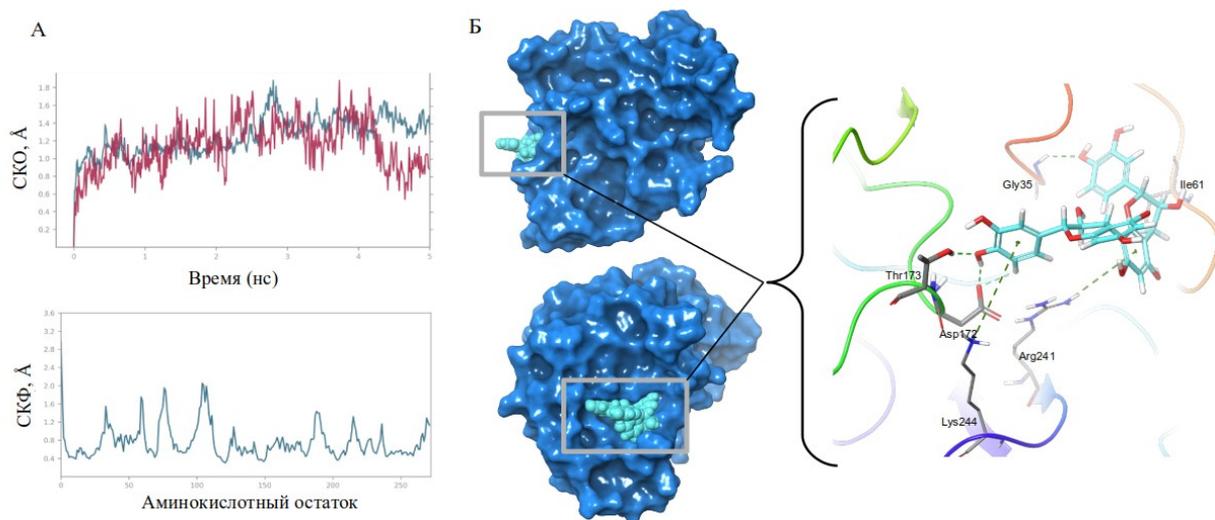


Рисунок 18. (А) СКФ в зависимости от времени: синий —  $\text{Ca}$  атомы мономерного септина 9 относительно референсного фрейма, красный — лиганд относительно септина 9; снизу СКФ аминокислотных остатков (по  $\text{Ca}$ ) мономерного септина 9. (Б) Структура мономерной формы септина 9 с Процианидином В3 (слева — общий вид в двух проекциях; справа — приближенный вид сайта связывания).

Образуемые связи между Процианидином В3 и септином 9 приведены в Таблице 3. Дополнительно были выделены водные мостики, образованные аминокислотными остатками Gly33, Arg241, Lys244.

В структуре септинов представлены следующие консервативные мотивы, ответственные за связывание с ГТФ: G1 (GxxxxGK), G3 (DxxG) и G4 (AxxD). В частности, мотив G1 формирует подвижную петлю, которая взаимодействует с фосфатной группой присоединяющегося нуклеотида. Мотив G3 содержит гидрофобные остатки и координирует ионы магния и может взаимодействовать с  $\beta$ - и  $\gamma$ -фосфатными группами ГТФ. Мотив G4 важен для специфического связывания гуанинового основания ГТФ. У септина 9 данные мотивы представлены следующими аминокислотными последовательностями: G1 (30-GQSGLGK-36), G3 (87-DTPG-90) и G4 (169-AKAD-172).

Таблица 3 — Образованные взаимодействия между Процианидином В3 и мономерной формой септина 9

№	Атом со стороны септина 9	Атом со стороны Процианидина В3	Тип связи (Å)
1	Gly35(NH)	O12	Водородная (2,31)
2	Arg241(HH22)	Ароматическая группа (C3-C16)	Пи-катионное взаимодействие (4,7)
3	Lys244(NZ)	Ароматическая группа (C13-C27)	Пи-катионное взаимодействие (5,7)
4	Asp172(OD2)	H21	Водородная (1,72)
5	Thr173(HG1)	O10	Водородная (1,96)
6	Thr173(OG1)	H20	Водородная (1,88)
7	Arg60(HH21)	O4	Водородная (2,04)
8	Arg60(HH22)	O6	Водородная (1,99)
9	Arg60(NH2)	O7	Солевой мостик (4,8)
10	Ile61(O)	H22	Водородная (2,47)

Из анализа димерной формы септина 9 с ГТФ- $\gamma$ -S известно, что область вокруг консервативного мотива G1 очень активно задействуется в связывании фосфатных групп ГТФ- $\gamma$ -S, формируя контакты через аминокислотные остатки Lys36, Ser37, Thr38. Также стабилизирующие лиганд связи формируются от боковой петли септина 9, включая Arg60, Ile61, Thr64. Аминокислотные остатки

Lys170 и Asp172 из мотива G4 формируют связи с гуаниновым основанием ГТФ- $\gamma$ -S.

По результатам анализа формируемых взаимодействий Процианидина В3 с мономерной формой септина 9, было обнаружено следующее расположение лиганда (Рисунок 18Б): одна из групп Процианидина В3 — пирокатехин — связывалась с Gly35 из G1 мотива, занимая место присоединения фосфатных групп ГТФ. Одна из бензопирановых частей Процианидина В3 фиксировалась со стороны боковой петли септина 9 через гидрофобные взаимодействия с Phe61 и водородные связи с Arg60, как и в случае комплекса септина 9 со связанной структурой ГТФ- $\gamma$ -S. То есть часть Процианидина В3 занимала и блокировала место связывания фосфатных групп ГТФ. Вторая часть Процианидина В3 формировала связи с областью связывания гуанинового основания — G4, а именно с аминокислотными остатками Asp172 и Thr173.

Таким образом, Процианидин В3 полностью задействовал основные консервативные регионы структуры септина 9, фиксируя положения аминокислотных остатков, участвующих в связывании ГТФ, и предотвращая связывание последнего. Помимо этого, Процианидин В3 имел два дополнительных пи-катионных взаимодействия, что обеспечивало дополнительную аффинность связывания. При этом Процианидин В3 располагается в сайте связывания септина 9 таким образом, что одна из его ароматических групп оказывается развёрнута в сторону, стерически препятствуя присоединению другой септиновой субъединицы. При моделировании димерной структуры септинов с Процианидином В3 связывание лиганда не происходило, что подтверждает неспособность Процианидина В3 связываться и стабилизировать димерную форму септинов.

Отобранное соединение Процианидин В3 было также протестировано на дрожжевом варианте септина — аналоге септина 9 — Cdc11, где также показало более высокую степень связывания с мономерной формой. Значения Glide Score = -6,73, Glide Emodel = -68,643, MM-GBSA = -21,92, что сравнимо с полученными значениями для человеческого септина 9. Аналогично человеческому аналогу

септина Процианидин В3 связывался похожим образом с Cdc11 и задействовал аналогичные аминокислотные остатки.

В связи с этим предполагается возможность Процианидина В3 связаться с пре-конформационным состоянием септина 9 и препятствовать дальнейшему присоединению ГТФ и, соответственно, других септиновых субъединиц, ингибируя таким образом полимеризацию септинов [298].

### 3.1.3. Влияние Процианидина В3 на структуру септинов

#### 3.1.3.1. Процианидин В3 взаимодействует с септинами

Связывание Процианидина В3 было оценено с помощью элюирования комплекса септина с Процианидином В3 через фильтр, пропускающего только несвязавшиеся малые молекулы. Измерение поглощения проводилось в смеси до нанесения на фильтр и затем во фракции, прошедшей через фильтр, с помощью спектрофотометра в УФ-диапазоне. На Рисунке 19 показаны три типа спектров до (К — комплекс) и после (М — малая молекула) прохождения через фильтр с различными молярными соотношениями септинов с Процианидином В3 (2:1, 1:1 и 1:2, соответственно). Сигнал от белка в случае комплексов вычитался.

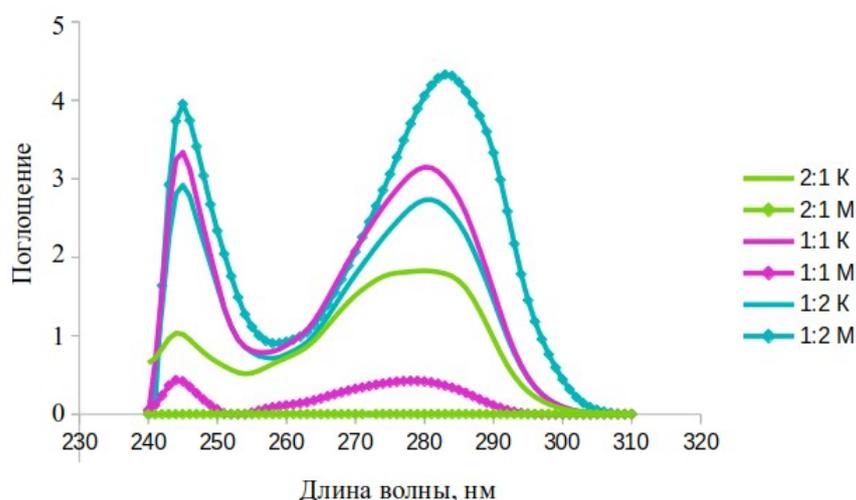


Рисунок 19. Спектры поглощения разных молярных соотношений септин-Процианидин В3 (2:1, 1:1 и 1:2, соответственно) до (К — комплекс) и после (М — молекула) пропускания раствора через фильтр.

При молярном преобладании септинов к Процианидину В3 в 2 раза выход свободных молекул через фильтр не регистрировался (2:1 М), что говорит о полном связывании малой молекулы с белком. При равном соотношении септина и Процианидина В3 связывалось порядка 84-90% (1:1 К). При избытке Процианидина В3 в 2 раза большинство данных молекул оказалось несвязанными (1:2 М). Тем не менее, связавшаяся в этом случае часть Процианидина В3 была эквивалентна молярному количеству Процианидина В3, связавшегося при соотношении с белком 1:1 (1:1 К и 1:2 К). Таким образом, процент несвязавшегося Процианидина В3 варьировал от 10 до 55% в зависимости от молярного соотношения (Таблица 4).

Таблица 4 — Процент связавшегося Процианидина В3 с септином при их различном молярном соотношении

Молярное соотношение септин-молекула	Процент, связавшейся молекулы с септином	Процент, не связавшейся молекулы с септином
2:1	100%	0%
1:1	90%	10%
1:2	45%	55%

### 3.1.3.2. Процианидин В3 препятствует полимеризации септинов

Для проведения *in vitro* тестирования влияния Процианидина В3 на структуру септиновых филаментов была отработана методика выделения, экспрессии (см. Методы) (Рисунок 20) и визуализации септиновых филаментов с помощью электронной микроскопии (Рисунок 21).

Полимеризация септиновых филаментов из очищенных субъединиц происходила путём понижения концентрации соли до 50 мМ, конечная концентрация септинов составила 0,05 мг/мл. Для оценки степени полимеризации септинов при добавлении 10 мкМ Процианидина В3 был проведён эксперимент

по осаждению септиновых филаментов центрифугированием. Количество белка оценивалось в различных фракциях (супернатанте и осадке) с помощью электрофореза в невозстанавливающих условиях. В контрольном образце большинство септинов находилось в филаментном состоянии в осадке, в то время как во фракции супернатанта количество белка было минимальным. При добавлении Процианидина В3 практически весь белок присутствовал только в супернатанте, что подтверждает влияние Процианидина В3 на формирование септиновых филаментов (Рисунок 20).

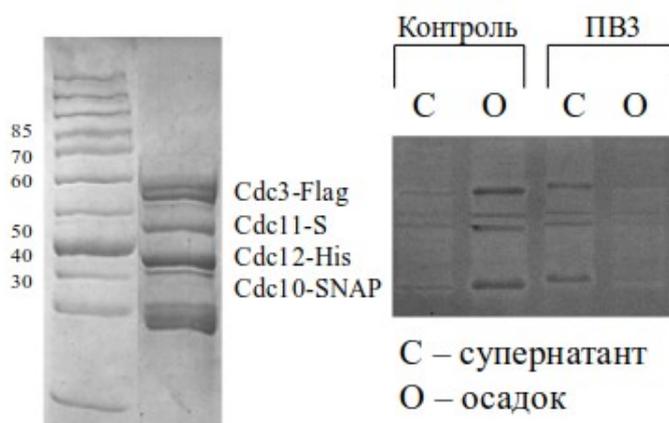


Рисунок 20. Электрофорез септинов дрожжей (слева). Справа электрофорез надосадочной фракции (С — супернатант) и осадка (О) с добавлением Процианидина В3 (ПВ3) и без добавления.

Для исследований методом электронной микроскопии подготавливали контрольные образцы септинов и образцы с добавленным Процианидином В3. Септины разводили до концентрации 0,05 мг/мл (буфер Tris–HCl, pH 8) и затем инкубировали с Процианидином В3 в концентрации 10 мкМ в течение получаса при комнатной температуре. Далее образцы наносились на медную сетку, покрытую углеродной подложкой, предварительно обработанную в тлеющем разряде, после чего окрашивались 1% уранилацетатом. Съёмка происходила с помощью программного обеспечения SerialEM [239].

В результате на микрографиях, полученных от контрольных образцов септинов, были идентифицированы как отдельные октамерные субъединицы (Рисунок 21А), так и септиновые филаменты с типичным для них паттерном в виде “рельсов” (Рисунок 21А). В образцах с добавленным Процианидином В3

филаментных структур обнаружено не было, но были идентифицированы в основном гексамерные, в меньшей степени пентамерные и тетрамерные формы септинов (Рисунок 21А, врезка).

Октамерные и гексамерные субъединицы септинов были собраны в программе RELION [226] (около 25000 частиц в первом и 40000 частиц во втором случае), классифицированы, и использованы для построения 3Д-моделей электронной плотности септинового октамера и гексамера (Рисунок 21Б). В полученные электронные плотности были вписаны атомные структуры человеческого септинового гексамера (PDB ID 7M6J) [240]. Дополнительно в октамерную структуру были вписаны отдельные человеческие септиновые субъединицы септина 9 (PDB ID 5CYP) (Рисунок 21Б). В результате мы убедительно продемонстрировали, что добавление Процианидина В3 к септинам приводило к снижению формирования филаментных форм *in vitro*.

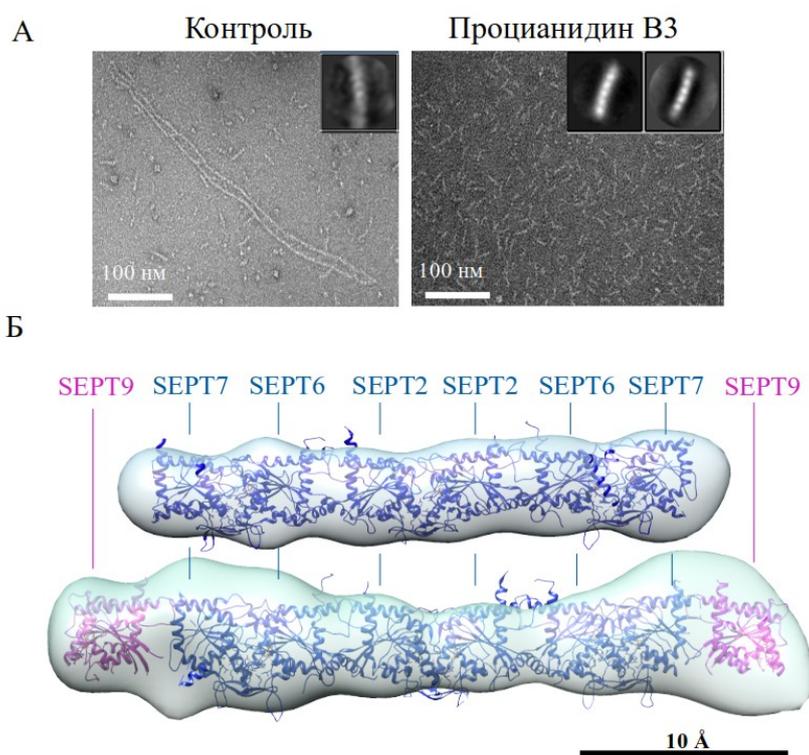


Рисунок 21. (А) Электронная микроскопия септинов; в правом верхнем углу — 2Д-класс октамера (слева); 2Д-классы гексамера (справа). (Б) 3Д-модели электронной плотности гексамерной (сверху) и октамерной (снизу) септиновой субъединицы со вставленной структурой гексамера септина (PDB ID 7M6J, синий) и отдельными септиновыми субъединицами септина 9 (PDB ID 5CYP, розовый).

3.1.3.3. Процианидин В3 влияет на морфологию клеток и локализацию в них септинов

Методом иммунофлюоресценции было изучено влияние малых молекул, отобранного нами Процианидина В3, а также известного ингибитора септинов — СРРУ, на морфологию клеток и организацию в них септинов. Для этого фибробласты REF\_52 инкубировали с веществами в течение 4 часов, после чего проводили окрашивание антителами к септинам (Рисунок 22А).

Оценка степени агрегации септинов проводилась путём оценки интенсивности флуоресценции, нормализованной по среднему сигналу от клетки. Для контрольных клеток и клеток, обработанных Процианидином В3 интенсивность флуоресценции варьировала незначительно, в отличие от клеток, обработанных СРРУ (Рисунок 22Б). Разброс в интенсивности предполагает, что септины в присутствии СРРУ формируют агрегатные скопления, что отражается в большей вариабельности сигнала интенсивности по клетке. Влияние СРРУ на формирование агрегатных структур у септинов также показано в литературе [34]. Добавление Процианидина В3 не приводило к формированию агрегатов септинов (Рисунок 22Б).

Как видно из Рисунка 18А контрольные фибробласты REF\_52 имели характерную вытянутую для них форму, достигавшую в среднем длины 40 мкм, соотношение длины к ширине клеток составляло в среднем от 6 до 8 (Рисунок 22Б, В). Клетки, обработанные Процианидином В3, преимущественно приобретали более округлую форму (соотношение длины к ширине составляло около 1,5), средние размеры варьировали в пределах 22 мкм (Рисунок 22Б, В). Также отмечалось менее интенсивное окрашивание септинов, которые оказывались в более “разрыхлённом”, но равномерно распределённом состоянии по всей клетке, по сравнению с контрольными клетками с “собранными” септинами (Рисунок 22А).

Клетки, обработанные СРРУ, имели схожую округлую морфологию с соотношением длины к ширине порядка 1, но размеры этих клеток были наименьшие, в пределах 14 мкм (Рисунок 22Б, В). Септины у данных клеток были

сконцентрированы вокруг ядра, формируя агрегированные скопления (Рисунок 22А), что также известно из литературных данных [34]. Также отличительной чертой клеток, обработанных CPPU, являлось преобладание клеток, не разделившихся в процессе митоза и оставшихся в ди-, три- и тетраплоидном состояниях. Таким образом, клетки, инкубированные с соединениями ПВЗ и CPPU, приобретали более округлую форму и были соответственно в 1,5-3 раза короче контрольных (Рисунок 22В).

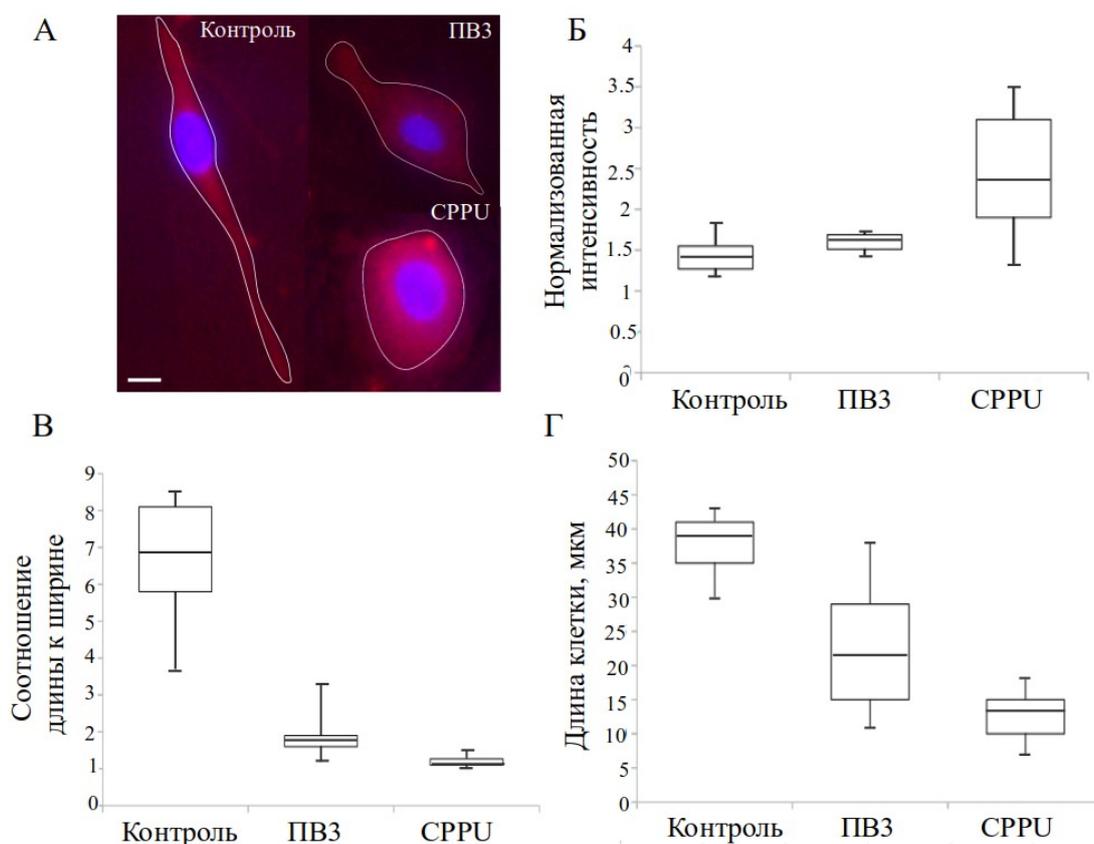


Рисунок 22. (А) Общее изображение клеток REF\_52, окрашенных антителами к септину 9, обработанных Процианидином В3 (ПВЗ) или CPPU. Увеличение  $\times 40000$ , масштабный отрезок 10 мкм. (Б) График интенсивности флуоресценции по септинам, нормализованный на общий сигнал клетки. (В) График соотношения длины клеток к ширине. (Г) График распределения длин клеток ( $n=45$ ),  $p < 0.05$ .

Известно, что септины, в частности септин 9, необходимы для завершения последних этапов цитокинеза, когда они наиболее активно участвуют в формировании септинового кольца [26, 28, 31]. В связи с этим параметр

интенсивности флуоресценции септинов в области формирования перетяжки у делящейся клетки использовался для идентификации клеток на последних фазах митоза (Рисунок 23А, жёлтая линия). При анализе контрольных клеток было установлено, что нормализованная интенсивность по септинам в межъядерной области примерно на 40% выше таковой в более ранних фазах митотического цикла (Рисунок 23Б). Используя данный критерий, проводился подсчёт клеток, обработанных ПВЗ и CPPU и находящихся на последних этапах разделения клеток. Добавление как Процианидина ВЗ, так и CPPU снижало в 3-4 раза количество клеток, находящихся на завершающих этапах цитокинеза (Рисунок 23В), несмотря на увеличенное количество делящихся клеток. Вероятно, оба вещества препятствовали нормальному функционированию септинового кольца, что замедляло или останавливало разделение клеток.

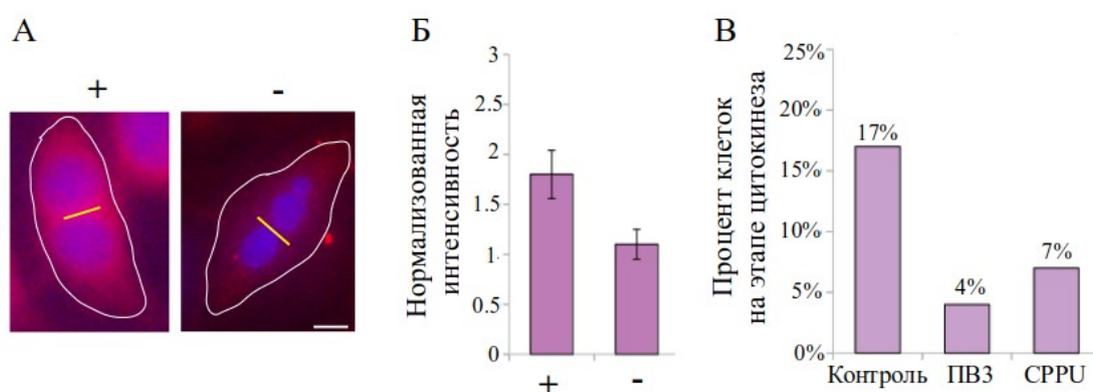


Рисунок 23. (А) Репрезентативные снимки клеток REF\_52, подходящие под параметр последних этапов цитокинеза (+; интенсивность больше 1,5) и нет (-; интенсивность меньше 1,5); увеличение  $\times 40000$ , масштабный отрезок 5 мкм. (Б) Уровень нормализованной интенсивности в межъядерной области у клеток на этапе цитокинеза (+) и на ранних стадиях митоза (-). (В) График процентного соотношения клеток на этапе цитокинеза от числа делящихся клеток ( $n=280$ ),  $p < 0.05$ .

Таким образом, добавление Процианидина ВЗ предпологаемо снижало образование филаментных септиновых структур в экспериментах *in vitro*.

### **3.1.4. Процианидин В3 снижает пролиферацию и жизнеспособность клеток рака молочной железы**

Исследовалось влияние малых молекул — СРРУ и Процианидина В3 — на показатели пролиферации и жизнеспособности клеток рака молочной железы MDA-MB-231 (Рисунок 24). Клетки, обработанные Процианидином В3, начиная с концентрации 30 мкМ, демонстрировали дозозависимое снижение в пролиферации. При концентрации 50 мкМ пролиферативная способность снижалась на 50%. При этом зависимость от времени обработки Процианидином В3 не прослеживалась, значения в течение 24-72 часов коррелировали друг с другом (Рисунок 24).

Добавление СРРУ снижало пролиферативную способность клеток более эффективно, начиная с наименьшей концентрации в 5 мкМ. При концентрации 10 мкМ пролиферация снижалась на 50%. При повышении концентрации до 30-100 мкМ эффект воздействия на пролиферацию не увеличивался. Однако при концентрации 300 мкМ практически все клетки были нежизнеспособны, что предполагает цитотоксический эффект соединения СРРУ (Рисунок 24).

Жизнеспособность клеток снижалась в обоих случаях, но при добавлении Процианидина В3 процент жизнеспособных клеток был выше и кривая носила более пологий вид. При добавлении СРРУ жизнеспособность клеток составляла менее 10% при концентрации 100 мкМ, в то время как у Процианидина В3 она сохранялась на уровне 20-50% (Рисунок 24).

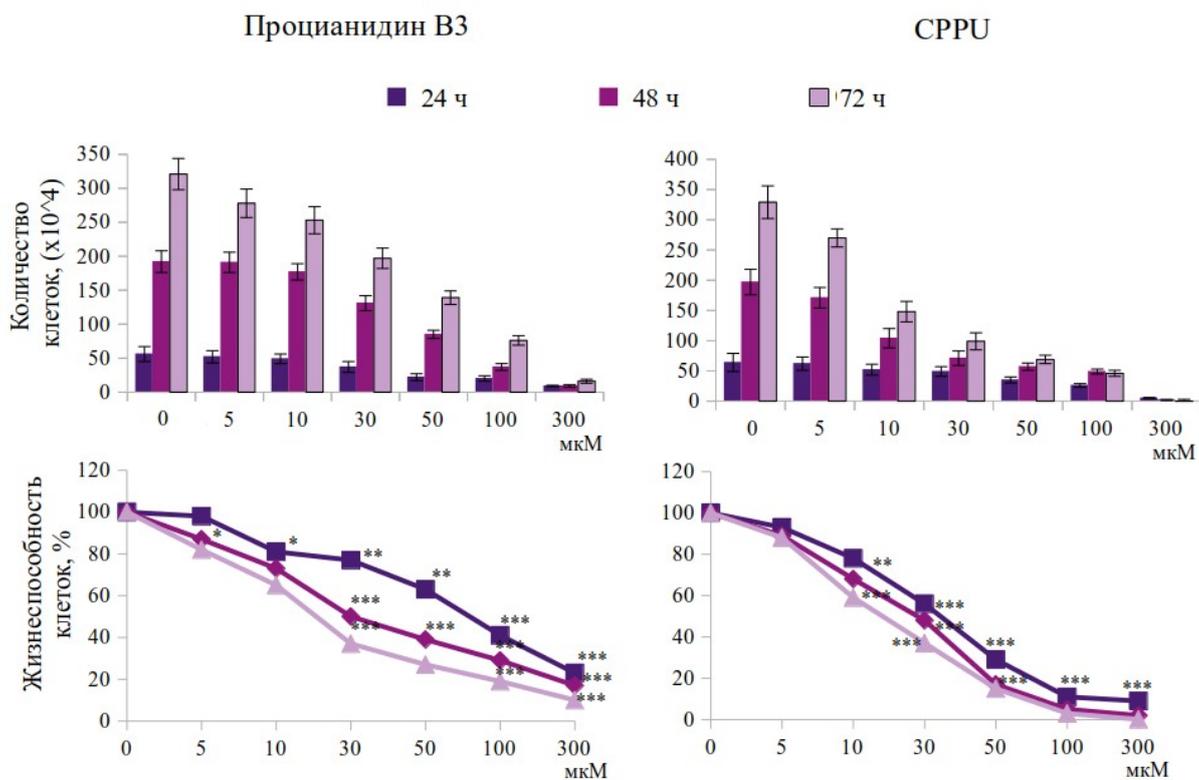


Рисунок 24. Оценка пролиферативной способности, а также жизнеспособности клеток MDA-MB-231, обработанных различными концентрациями веществ Процианидина В3 и CPPU в течение 24, 48 и 72 часов; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Таким образом, в результате проведения виртуального скрининга по поиску малой молекулы, нарушающей полимеризацию септинов, было отобрано вещество из группы флавоноидов — Процианидин В3. В *in vitro* экспериментах данное вещество показало снижение количества филаментных структур септинов, вследствие чего, вероятно, снизилось количество клеток на последних этапах цитокинеза и непосредственно пролиферация раковых клеток.

## 3.2. Виментин

### 3.2.1. Роль разных форм виментина в миграции клеток

Для исследования роли виментиновых филаментов на процесс миграции были проанализированы скорость и направленность движения у трёх типов клеток: эмбриональных фибробластов крысы (REF) с нормальными виментиновыми филаментами (REF\_52), с нокаутным виментином (REF -/-), а также с мутированным виментином по аминокислотному остатку Y117L (REF\_117), образующего ULF. Для установления изменений в цитоскелете использовалась флуоресцентная микроскопия: у всех типов клеток не был затронут актиновый цитоскелет и микротрубочки, промежуточные филаменты в виде виментина отсутствовали у клеток REF-/-, у клеток REF\_117 имели вид точек (ULF), у клеток REF\_52 были нормальные виментиновые филаменты (Рисунок 25А) [297].

С помощью микроскопии структурированного освещения (SIM) было показано более детально различие виментина у нормальных клеток (REF\_52) и клеток с виментином в виде ULF (REF\_117) (Рисунок 25Б). Также была подсчитана средняя длина виментиновых белков в обоих случаях: у REF\_52 длина филаментов составляла около  $8 \pm 3,8$  мкм, а у клеток REF\_117 длина виментиновых фрагментов была около 150 нм, что согласуется с размерами ULF (Рисунок 25В).

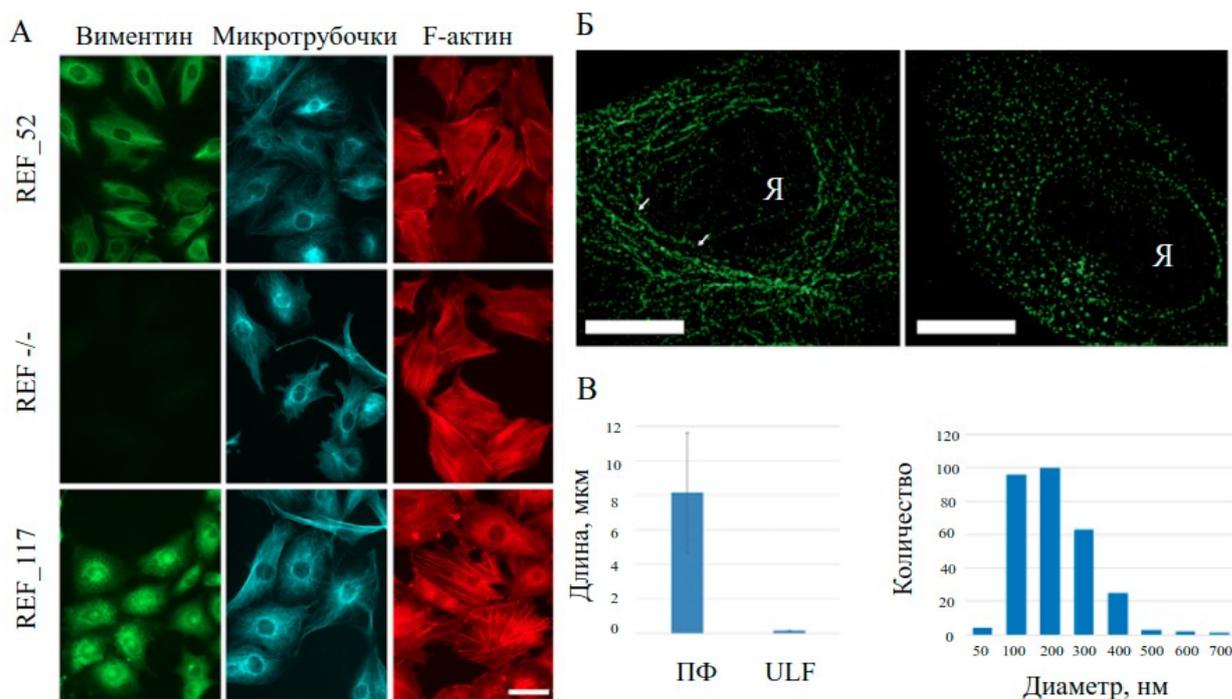


Рисунок 25. (А) Флуоресцентная визуализация фибробластов REF\_52 дикого типа, экспрессирующих виментин, фибробластов REF -/- с нокаутом виментина и фибробластов REF\_117 с мутацией Y117L. Виментин обозначен зелёным цветом, микротрубочки — синим, актин — красным. Масштабный отрезок 20 мкм. (Б) SIM-микроскопия: слева — клетки REF\_52 дикого типа, справа — мутантная клетка REF\_117, экспрессирующая виментин в виде ULF. Масштабный отрезок 10 мкм. Белые стрелки отражают пример измеряемого участка ПФ (промежуточных филаментов); Я — ядро. (В) Гистограмма слева внизу показывает средние измеренные размеры ПФ и ULF. Гистограмма справа внизу показывает распределение диаметров виментина в виде ULF у клеток REF\_117 ( $n=299$ ).

Было показано, что во всех трёх случаях клетки имеют одинаковую скорость миграции (Рисунок 26Б). Однако клетки, с виментиновыми филаментами (REF\_52), либо с ULF (REF\_117), дольше сохраняли направленность движения, по сравнению с нокаутными клетками без виментина (REF -/-), которые, в свою очередь, поворачивали очень часто (Рисунок 26А, Б).

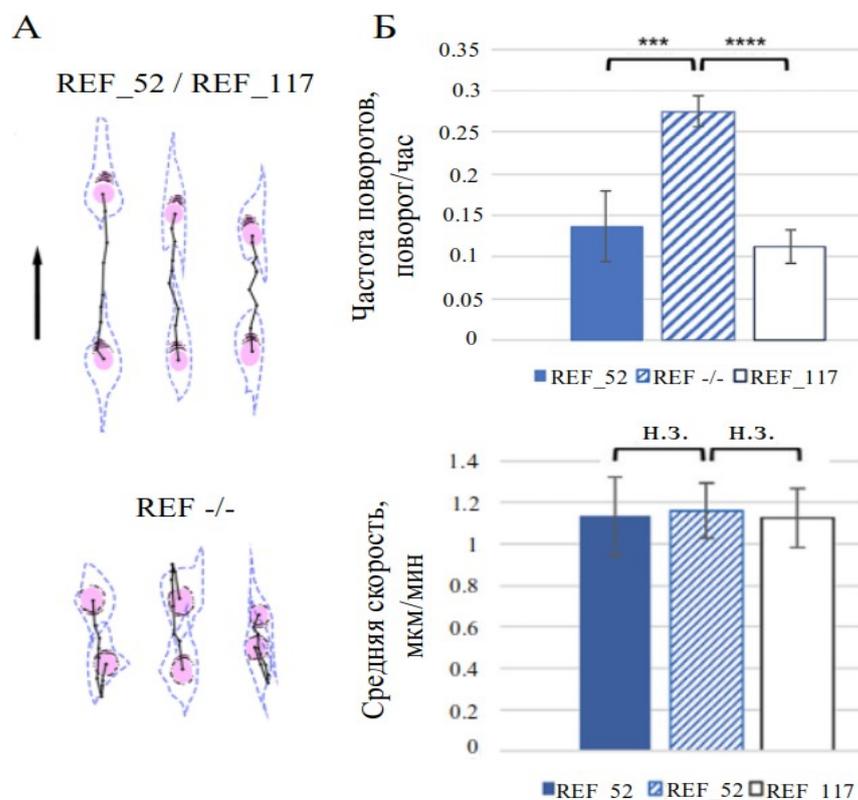


Рисунок 26. (А) Схематическое изображение траектории движений клеток с нормальными виментиновыми филаментами (REF\_52), ULF (REF\_117) и клеток с нокаутированным геном виментина (REF -/-). (Б) График частоты поворотов и график средней скорости движения трёх типов REF ( $n=30$ ), н.з. — не значимо; \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

Таким образом, было предположено, что виментин в не зависимости от структурного состояния в клетке, в виде филаментов и ULF, обеспечивает направленность клеточного движения. Известно, что направленность движения клеток определяется также за счёт поддержания определённой жёсткости на переднем конце клетки. В связи с этим был проведён ряд экспериментов по изучению жёсткости на противоположных краях клеток с помощью атомно-силовой спектроскопии [297].

Для фиксирования клетки в мигрирующем (вытянутом) положении была сконструирована специальная рельефная подложка с продольными желобами на расстоянии  $1,70 \pm 0.02$  мкм друг от друга и глубиной  $350 \pm 7$  нм (Рисунок 27А). Клетки мигрировали вдоль этих желобов, расплываясь и принимая вытянутую форму, таким образом, позволяя провести измерения на переднем и заднем краях клетки независимо (Рисунок 27Б).

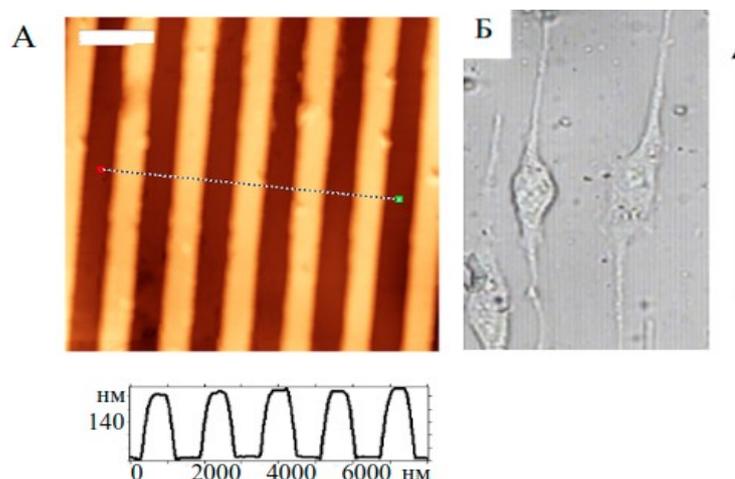


Рисунок 27. (А) Модельная система подложки для измерения модуля Юнга на противоположных краях мигрирующих клеток; масштабный отрезок 2000 нм. (Б) Репрезентативное фото расположения клеток вдоль желобов подложки.

Лидирующий край клетки определялся с помощью флуоресцентной микроскопии по локализации окрашенного аппарата Гольджи относительно ядра клетки. Из литературы известно, что у мигрирующих клеток аппарат Гольджи обычно поляризован относительно ядра и находится в передней части клетки [241, 242]. При миграции клеток, экспрессирующих виментин (REF\_52 и REF\_117) аппарат Гольджи также локализовался на переднем крае клетки, а ядро смещалось больше к заднему краю. Клетки, нокаутные по виментину, принимали более округлую морфологическую форму, без чётко выраженной локализации аппарата Гольджи относительно ядра, что свидетельствует о потере направленности при миграции (Рисунок 28).

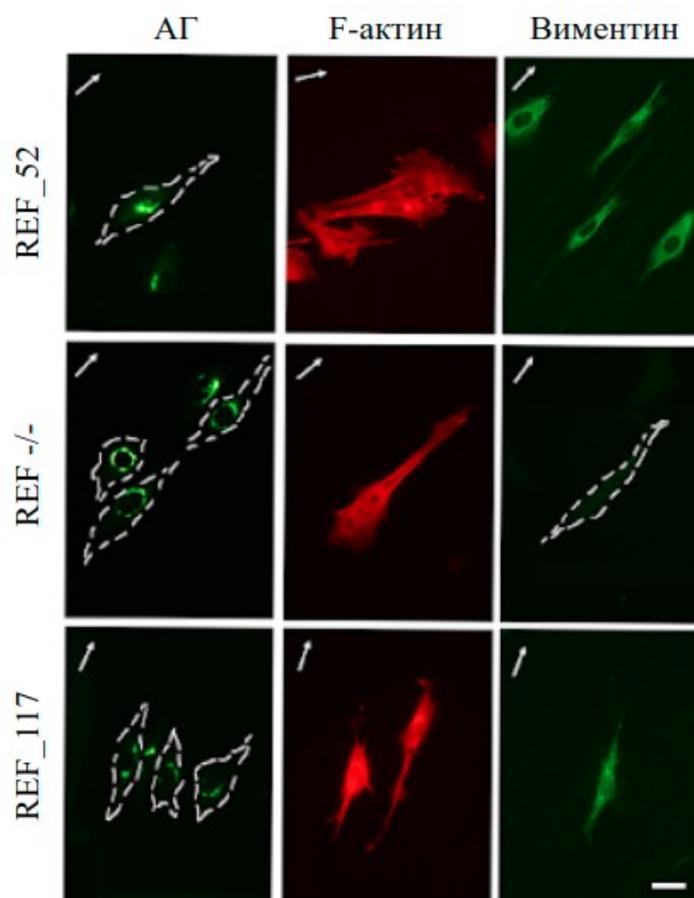


Рисунок 28. Флуоресцентно-окрашенные изображения REF\_52, REF\_117 и REF -/- на рельефной подложке. Красным показаны актиновые филаменты, зелёным — виментин. Стрелками обозначено направление движения клеток; масштабный отрезок 20 мкм; АГ — аппарат Гольджи.

В начале была проведена валидация рельефной подложки относительно её влияния на измерения жёсткости у клеток. Для этого были проанализированы силовые кривые с 15 клеток; снятие данных происходило серийно с шагом в 150 нм поперёк клетки, покрывая суммарное расстояние в 1,5 микрометров (10 силовых кривых в каждой серии). В большинстве случаев (75%) полученных значений рельеф подложки не влиял на значения модуля Юнга, а отклонение составляло не более 37%, что является приемлемым для измерений жёсткости. Таким образом, подложка не оказывала значительного влияния на измерения модуля Юнга.

Далее проводились измерения модуля Юнга уже на лидирующем и заднем краях клеток с помощью атомно-силовой спектроскопии, используя локализацию

аппарата Гольджи для определения лидирующего края клетки в фибробластах REF\_52 и REF\_117. Случаи, когда положение аппарата Гольджи было сложно определить, исключались из выборки. Были сняты 3 серийные повторности по 15 силовых кривых, как на переднем, так и на заднем краях для каждой клетки. В случае вариабельности модуля Юнга на 50% и более, такая клетка также удалялась из выборки. В итоге средние значения модуля Юнга для обоих концов клетки были рассчитаны независимо. Большинство клеток (60%) с виментином, как в виде нормальных филаментов, так и в виде ULF, имели в два раза большую жёсткость на переднем крае (порядка 550 Па), по сравнению с задним (порядка 350 Па). В клетках, нокаутных по виментину, жёсткость была примерно одинакова на двух противоположных краях (по 360 Па) (Рисунок 29) [297].

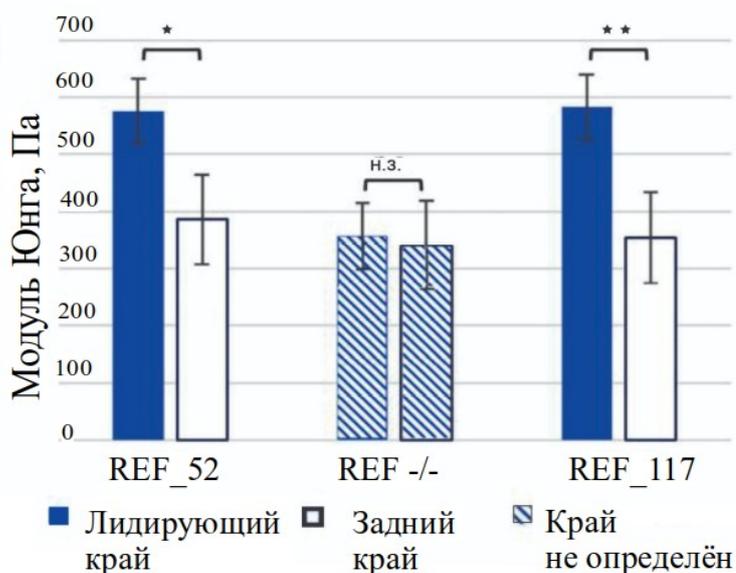


Рисунок 29. Модуль Юнга, измеренный на противоположных краях клеток REF\_52, REF\_117 и REF -/- ( $n=52$ ); н.з. — не значимо,  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ .

Было сделано предположение, что для сохранения клеточной направленности при миграции виментин может быть как в форме филаментов, так и в виде ULF, сохраняя при этом жёсткость на переднем крае клетки. Известно, что основную роль в миграции клеток играют актиновые филаменты, которые взаимодействуют с виментином через белок-адаптер — плектин. Соответственно, была предложена модель, в которой плектин мог бы соединять виментин даже в

виде ULF с актиновыми филаментами. Так как размеры ULF виментина намного меньше виментиновых филаментов, то это не позволяет им 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, что поддерживает жёсткость на лидирующем крае клетки (Рисунок 30) [297].

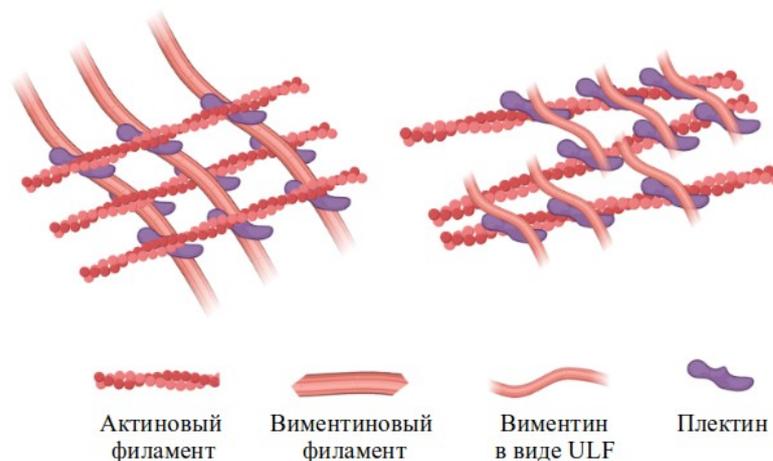


Рисунок 30. Модель взаимодействий разных форм виментина с актином через плектин (слева — полноразмерные филаменты виментина, справа — ULF); создана с помощью Biorender.com.

Для тестирования этой гипотезы был использован метод молекулярного моделирования для поиска соединения, влияющего на взаимодействие виментина с плектином, с целью дальнейшей проверки его влияния на миграционные возможности клеток.

### **3.2.2. Виртуальный скрининг соединений, влияющих на взаимодействие виментина с плектином**

#### **3.2.2.1. Моделирование структуры комплекса виментин-плектин**

По литературным данным были определены участки плектина и виментина, которые участвуют во взаимодействии друг с другом. Со стороны плектина (UniProtKB — Q15149) был выделен участок в районе пятого PRD повтора (4067-



С учётом того, что модели 5 PRD плектина с линкером не было, то соответствующая модель по гомологии была построена на основе домена В кристаллографической модели десмоплакина (PDB ID 5DZZ). Идентичность между последовательностями была 66% (Рисунок 31А, Г). Для построения линкера между 5 и 6 PRD повторами была взята кристаллическая структура линкера периплакина (PDB ID 4Q28), представляющая упорядоченный PR-подобный мотив (33% идентичности) (Рисунок 31Б, Г). После этого гомологичные модели 5 домена плектина и его линкера были соединены и достроены друг с другом (Рисунок 31В).

Для уравнивания построенной гомологичной модели плектина с линкером была проведена молекулярная динамика в течение 300 нс (Рисунок 32А). В результате молекулярной динамики было оптимизировано положение линкера относительно домена плектина, который развернулся на  $90^{\circ}$  к одной из боковых сторон плектина (Рисунок 32Б). Данное расположение представляется наиболее оптимальным вариантом для последовательного присоединения следующего PRD домена, так как из кристаллической структуры десмоплакина известно, что PRD домены располагаются один за другим.

Белок-белковый докинг полученной структуры проводился с участком сегмента 1В виментина (PDB ID 3UF1) (140-240 аминокислотные остатки) (Рисунок 32В, Г). По результатам белок-белкового докинга только один комплекс содержал параллельную укладку виментина относительно поверхности плектина в области выемки рельефа с положительно-заряженными аминокислотными остатками (4274-4277 RRKR), участвующими во взаимодействии плектина с другими белками цитоскелета [168-171]. В связи с этим данный вариант комплекса был выбран для дальнейших исследований. Остальные комплексы имели маловероятные конфигурации в виде перпендикулярного расположения виментина относительно плектина, которые бы препятствовали сборке и функционированию виментиновых филаментов (Рисунок 32Д).

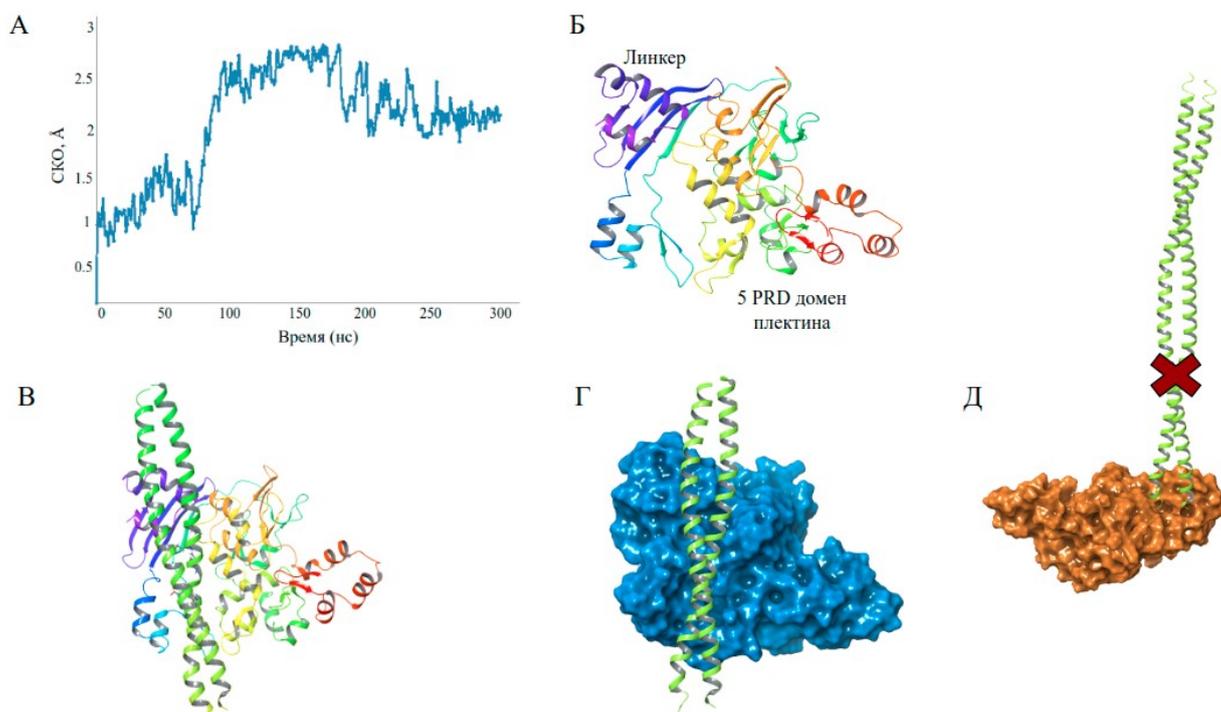


Рисунок 32. (А) СКО в зависимости от времени по  $Ca$  атомам белка плектина с линкером относительно референсного фрейма. (Б) Структура 5 PRD домена плектина с линкером после проведённой молекулярной динамики. Результаты белок-белкового докинга виментина (зелёный) и плектина в виде спиралей (В) и в виде поверхности (Г) (плектин — синий). (Д) Пример исключённых результатов белок-белкового докинга (плектин — оранжевый).

После минимизации и молекулярной динамики комплекса виментина с плектином был проведён анализ взаимодействий между данными структурами, на основании которых строился затем фармакофор. В Таблице 5 представлены основные взаимодействия, присутствующие более 70% времени молекулярной симуляции. Все взаимодействия между виментином и плектином были сгруппированы на 3 основные кластера в зависимости от их расположения и формирования контактов с началом, серединой или концом плектиновой молекулы (Рисунок 33А). Наиболее стабильные взаимодействия были в центральном кластере 2, формируемые в частности Arg4276 (Рисунок 33Б), что соотносится с литературными данными [195-198]. В то время как контакты из 1 и 3 кластеров были в большей степени нестабильны.

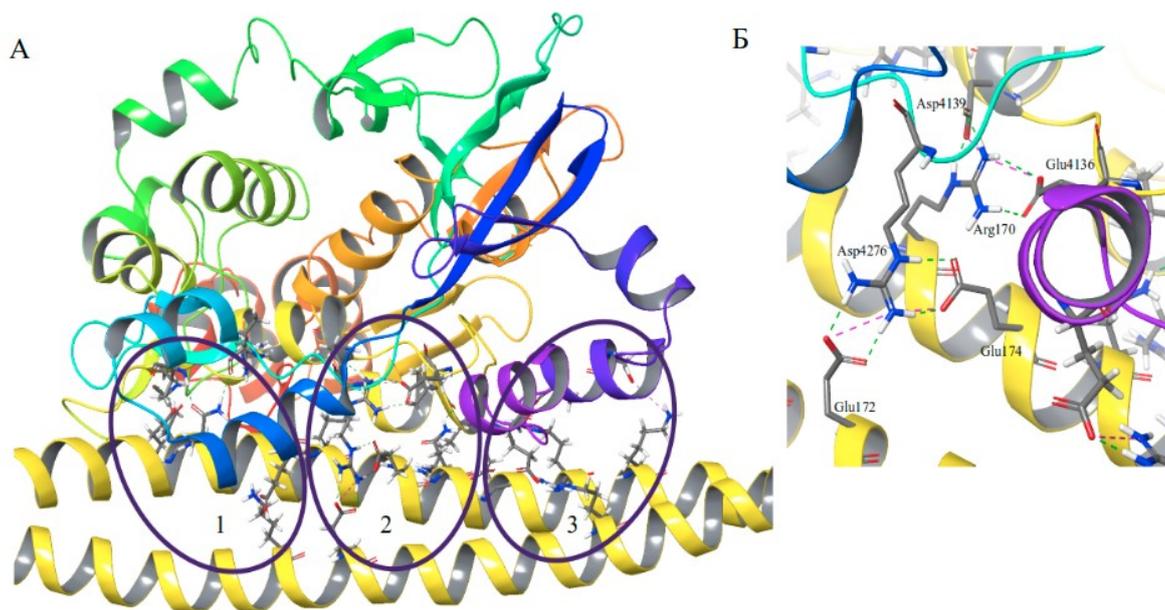


Рисунок 33. (А) Комплекс виментина (жёлтый) и плектина, овалами показаны основные кластеры взаимодействий между белками. (Б) Приближенный вид кластера 2 с обозначениями основных аминокислот, участвующих в белок-белковом взаимодействии.

Также можно отметить, что согласно литературным данным взаимодействие между энвоплакином, аналогом плектина из того же семейства плакинов, с виментином происходит через два ключевых остатка аспарагиновой кислоты, Asp112 и Asp119, со стороны виментина [204]. С линкером периплакина взаимодействуют отрицательно-заряженные аминокислотные остатки виментина Asp176 и Glu187 [203]. В случае комплекса виментина с плектином также были выделены отрицательно-заряженные аминокислоты глутаминовой кислоты, Glu172 и Glu174, расположенные на виментине и активно формирующие взаимодействия с положительно-заряженной выемкой плектина.

Таблица 5 — Взаимодействия между сегментом 1В участка виментина и 5 PRD доменом плектина

Аминокислотный остаток со стороны виментина	Аминокислотный остаток со стороны плектина	Тип взаимодействий (Å)
1 кластер		
B, Gln163*	Val4279	Водородная связь (2.41)
B, Gln163*	Val4281	Водородная связь (3.05)
B, Asn166*	Arg4146	Водородная связь (2.46)
B, Asn166*	Ile4280	Водородная связь (2.42)
2 кластер		
B, Arg170*	Asp4139	2 водородные связи (1.71), 1 солевой мостик (2.69)
B, Arg170*	Glu4136	Водородная связь (1.79), 1 солевой мостик (2.69)
A, Glu172*	Arg4276	2 водородные связи (1,58), 1 солевой мостик (2.8)
B, Glu174*	Lys4275	Водородная связь (2.6)
B, Glu174*	Arg4276	2 водородные связи (1.74), 1 солевой мостик (2.67)
3 кластер		
B, Asn177	Lys4138	Водородная связь (2.31)
B, Arg184	Ala4361	Водородная связь (1.58)
A, Arg186	Thr4363	Водородная связь (1.99)

Методом аланинового скрининга были также проанализированы “горячие точки” (hot spots) для выявления остатков, принимающих наибольшее участие в

стабилизации комплекса виментин-плектин. Результаты, полученные с помощью сервера KFC2 [243, 244] и модуля Biologics (Schrödinger, LLC, New York), были схожи и идентифицировали следующие важные аминокислотные остатки, мутации в которых снизили свободную энергию связывания между белками более чем на 1 ккал/моль: Gln163, Asn166, Arg170, Val173, Glu174 со стороны цепи В и Glu172 со стороны цепи А виментина, Glu4136, Lys4138, Asp4139, Arg4276, Ile4280, Val4281 со стороны плектина. Большинство из указанных hot spot аминокислот были перечислены ранее (в Таблице 5 помечены \*) как задействованные в формировании белок-белковых взаимодействий, что подтверждает их значительную роль в стабилизации комплекса виментин-плектин. Таким образом, дальнейшее построение фармакофора осуществлялось с учётом hot spot аминокислот со стороны виментина.

3.2.2.2. Комбинированный скрининг библиотеки малых молекул для ингибирования взаимодействия виментина с плектином

Для построения фармакофора была выбрана малая библиотека из базы PubChem — «FDA Pharm Classes», содержащая ориентировочно 1000 соединений. Пространственная ячейка размером  $10 \times 10 \times 10$  Å, по которой проводился докинг, центрировалась по координатам  $-9 \times 3.44 \times -6.35$  (по X\*Y\*Z) и ключевым аминокислотам из кластера 2, участвующих во взаимодействии виментина с плектином (со стороны цепи А — Glu172, со стороны цепи В — Asn166, Asp167, Arg170, Glu174, Asn177). На основе отобранных соединений по совокупности лучших значений Glide Score, Glide Emodel и энергии связывания MM-GBSA был сконструирован фармакофор (Рисунок 34А, Б), содержащий 6 основных функциональных групп для образования связей: 2 акцепторные, 3 донорные и 1 положительно-ионную.

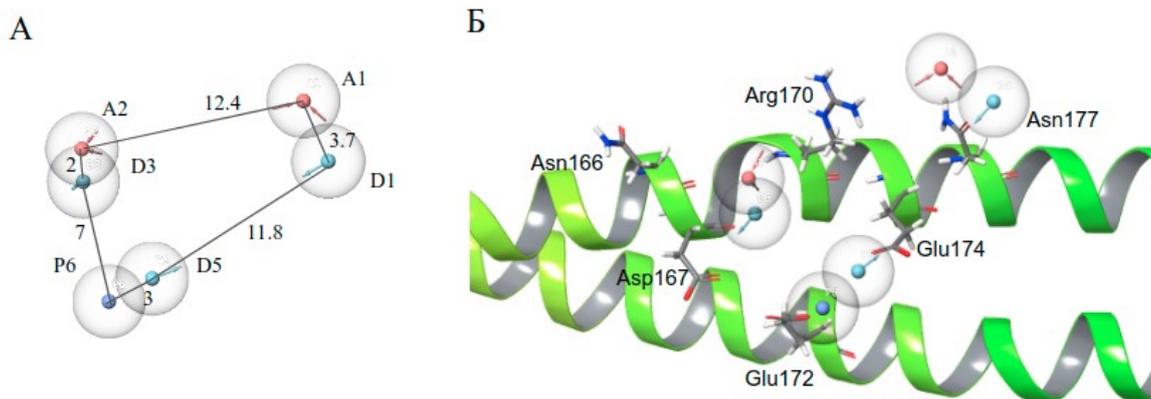


Рисунок 34. (А) Фармакофор (А — акцепторная группа, D — донорная группа, P — положительно-ионный тип группы) с обозначениями расстояний между функциональными группами (Å). (Б) Приближенный вид фармакофора с виментином, выделены ключевые аминокислотные остатки.

После этого был проведён скрининг большой библиотеки соединений (около 1 миллиона) через фармакофор с помощью программного обеспечения Glide (Glide, Schrödinger, LLC, New York) в несколько стадий, начиная с HTVS до более точного докинга как SP и XP, позволяющих исключить ложноположительные результаты. Соединения после скрининга были ранжированы согласно параметрам Glide Score, Glide Emodel и MM-GBSA (Таблица 6).

Таблица 6 — Отобранные соединения после молекулярного докинга на виментине

№	Номер вещества в базе PubChem	Название вещества	Glide Score	MM-GBSA, ккал/моль	Glide Emodel	MM-GBSA, ккал/моль
1	165580	Паромомицин	-7,373	-51,07	-93,918	-54,9
2	25058097	Гиемалозид А	-7,147	-49,31	-82,372	-52,47
3	37768	Амикацин	-6,873	-42,96	-75,542	-43,93
4	197190	Минозаминомицин	-6,477	-44,51	-58,352	-49,79
5	441306	Нетилмицин	-5,232	-30,22	-30,219	-40,33
6	19649	Стрептомицин	-5,374	-34,37	-34,374	-36,29
7	36294	Тобрамицин	-6,186	-39,73	-39,734	-32,36

Для валидации отобранных соединений была выбрана оценочная функция Glide Emodel относительно MM-GBSA с наилучшим коэффициентом Пирсона в 72% (Рисунок 35).

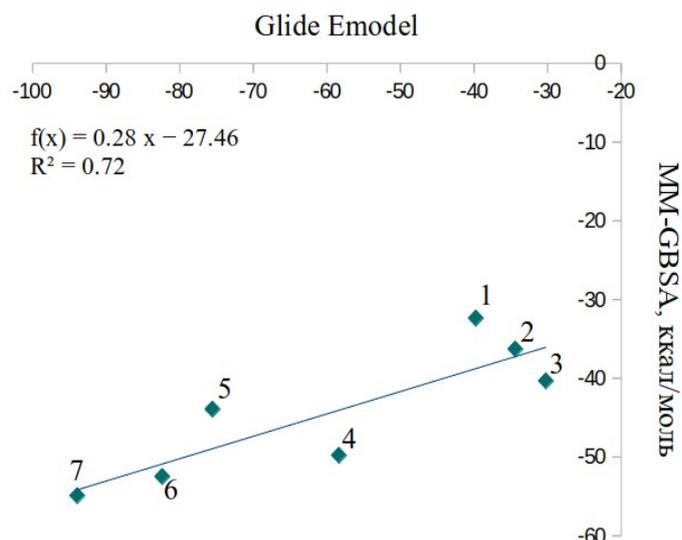


Рисунок 35. Оценочная функция Glide Emodel относительно значений свободной энергии MM-GBSA (ккал/моль) малых молекул: Тобрамицин (1), Стрептомицин (2), Нетилмицин (3), Минозаминомицин (4), Амикацин (5), Гиёмалозид А (6), Паромомицин (7),  $p < 0.001$ .

Наибольшей аффинностью обладало вещество Паромомицин Glide Score = -7,37, Glide Emodel = -93,918 и MM-GBSA = -54,9. Ещё два вещества Гиёмалозид А и Минозаминомицин были также потенциально высокоаффинными, но недоступны для приобретения для дальнейших исследований, поэтому для сравнения было включено следующее по эффективности вещество — Амикацин (Glide Score = -6,873, Glide Emodel = -75,542, MM-GBSA = -43,93 (Рисунок 36). Результаты докинга были также проверены, как и в случае с Процианидином В3, в альтернативных программах для докинга [221-224]; расчёты свободной энергии связывания были сопоставимы.

Изображения комплексов виментина с Паромомицином и Амикацином приведены на Рисунке 36. Образованные контакты данных молекул с виментином приведены в Таблице 7 и Таблице 8, соответственно.

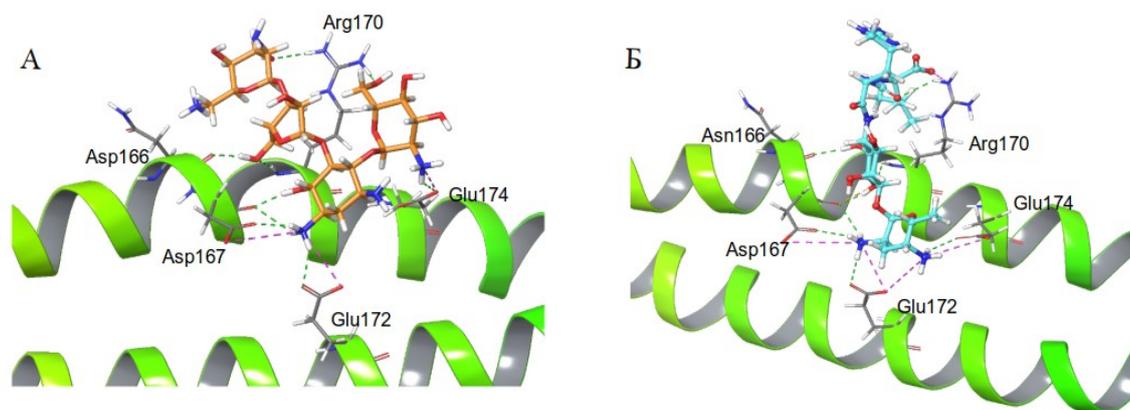


Рисунок 36. (А) Докинг малой молекулы Паромомицина (оранжевый) и (Б) Амикацина (бирюзовый) на виментиновом 1В сегменте.

Таблица 7 — Взаимодействия между сегментом 1В участка виментина и Паромомицином

Аминокислотный остаток со стороны виментина	Атом со стороны лиганда (Паромомицина)	Тип взаимодействий (Å)
Asn166(O)	H40	Водородная (1.67)
Asp167(OD1)	H41	Водородная (2.01)
Asp167(OD2)	N2	Солевой мостик (4.7)
Asp167(O)	H23	Водородная (1.77)
Asp167(O)	H47	Водородная (2.74)
Glu172(OE1)	H39	Водородная (2.11)
Glu172(OE2)	N2	Солевой мостик (3.71)
Arg170(H)	O12	Водородная (2.37)
Arg170(HH21)	O11	Водородная (2.07)
Arg170(HH11)	O14	Водородная (2.16)
Glu174(OE2)	H43	Водородная (2.19)
Glu174(OE2)	N3	Солевой мостик (2.97)

Таблица 8 — Взаимодействия между сегментом 1В участка виментина и Амикацином

Аминокислотный остаток со стороны виментина	Атом со стороны лиганда (Амикацина)	Тип взаимодействий (Å)
Asp167(OD1)	H23	Водородная (1.48)
Asp167(OD2)	N7	Солевой мостик (4.01)
Glu172(OE1)	H24	Водородная (1.63)
Glu172(OE2)	N7	Солевой мостик (3.76)
Glu172(OE2)	N6	Солевой мостик (4.21)
Arg170(HH11)	O5	Водородная (1.67)
Glu174(OE1)	H27	Водородная (1.64)
Glu174(OE2)	N6	Солевой мостик (4.01)

Амикацин и Паромомицин имели схожий паттерн связывания, но Паромомицин связывался немного лучше, образуя 9 водородных связей и 3 солевых мостика. В то время как у Амикацина было 4 водородные связи и 4 солевых мостика. Данное отличие в связывании также отображается на рассчитанных параметрах Glide Score, Glide Emodel и MM-GBSA, у Паромомицина данные значения лучше. Также можно отметить, что Амикацин связывался преимущественно вдоль альфа-спиралей виментина, формируя менее стабильные взаимодействия с ключевыми аминокислотными остатками виментина. В то время как Паромомицин связывался поперёк альфа-спиралей и перекрывал большую поверхность виментина, участвующую во взаимодействии с плектином.

Важно отметить, что оба соединения стерически препятствовали формированию комплекса виментин-плектин (данные не приведены), а также связывали hot spot аминокислотные остатки виментина, Glu172 (А цепь) и Asn166, Asp167, Arg170, Glu174 (В цепь), предположительно играющих основную роль во взаимодействии виментина с плектином.

### 3.2.3. Влияние Паромомицина и Амикацина на структурно-функциональные свойства виментина

#### 3.2.3.1. Взаимодействие виментина с Паромомицином и Амикацином

Связывание малых молекул, Паромомицина и Амикацина, определялось с помощью элюирования белок-лигандных комплексов через фильтр, пропускающий только не связавшиеся малые молекулы (Рисунок 37). В силу слабого поглощения аминогликозидных антибиотиков расчёт процента связавшихся малых молекул проводился по заранее валидированным соотношениям добавляемой концентрации молекулы от соответствующей ей оптической плотности (Таблица 9).

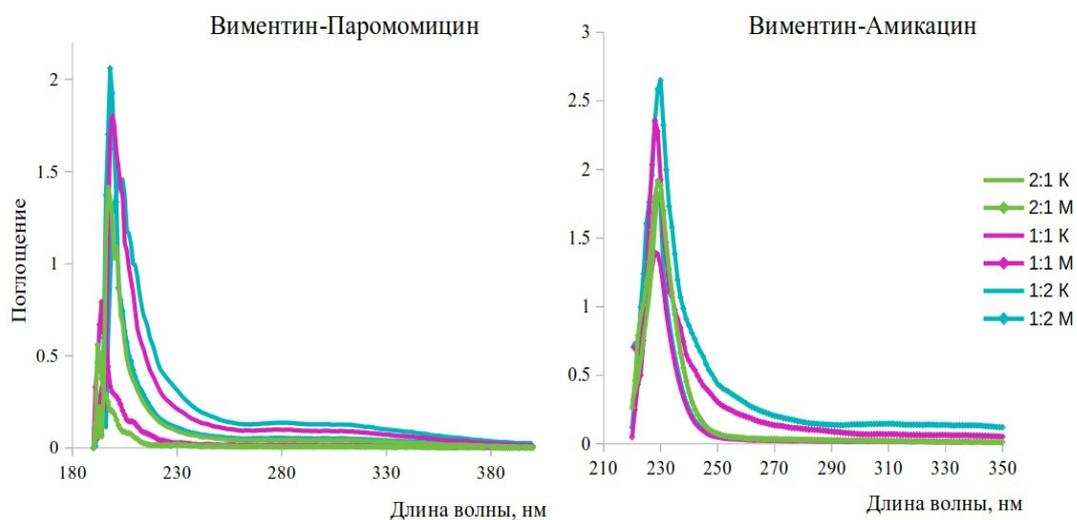


Рисунок 37. Спектр поглощения комплексов (К) виментина с Паромомицином (слева) и Амикацином (справа), несвязавшиеся молекулы обозначались как М; различными цветами показаны типы молярных соотношений виментина с молекулой, соответственно.

Таблица 9 — Процент связавшихся молекул с виментином при различном молярном соотношении

Молярное соотношение виментин-молекула	Процент, связавшейся молекулы с виментином	Процент, не связавшейся молекулы с виментином
Паромомицин		
2:1	100%	0%
1:1	100%	0%
1:2	70%	30%
Амикацин		
2:1	50%	50%
1:1	10%	90%
1:2	15%	85%

Паромомицин практически не детектировался во фракции не связавшихся молекул, что предполагает его взаимодействие с виментином. При избытке Паромомицина предполагается его неспецифическое связывание в нескольких местах виментиновых филаментов. Амикацин в данном эксперименте слабо связывался с виментином.

### 3.2.3.2. Микроскопия виментиновых филаментов и их локализация в клетке

Влияние отобранных малых молекул на структуру виментиновых филаментов исследовалось с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Виментиновые филаменты полимеризовали путём добавления соли NaCl до концентрации в 160 мМ, конечная концентрация виментина составляла 0,2 мг/мл. После этого образец фиксировался 0,1% глутаральдегидом и окрашивался 1% уранилацетатом. При добавлении как Паромомицина (Рисунок 38А), так и Амикацина (Рисунок 38Б) виментин формировал филаментные структуры с диаметром 10 нм (Рисунок 38А, Б, слева) и пучки с диаметром от 30 до 60 нм (Рисунок 38А, Б, справа). Таким образом, протестированные малые молекулы не оказывали заметного влияния на структуру виментиновых филаментов.

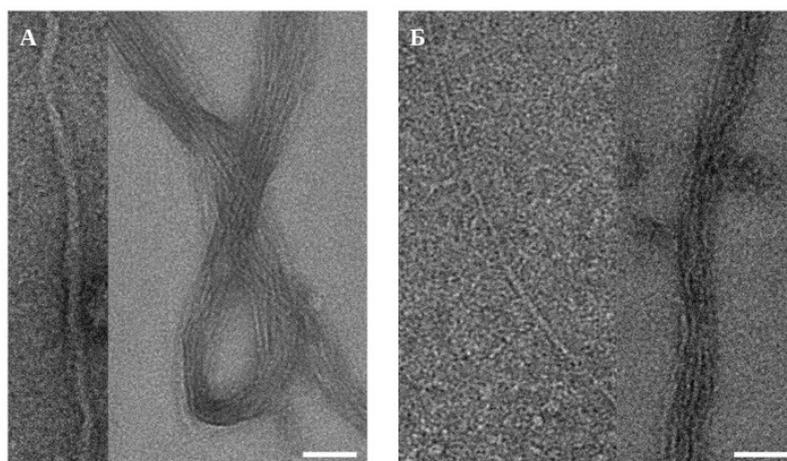


Рисунок 38. Репрезентативные микрографии виментиновых филаментов с добавлением Паромомицина (А) и Амикацина (Б). Отдельный виментиновый филамент слева, пучок из виментиновых филаментов справа. Масштабный отрезок 200 нм.

Для исследования влияния Паромомицина и Амикацина на локализацию виментиновых филаментов в клетках был проведён иммунофлуоресцентный анализ с использованием антител против виментина и плектина (Рисунок 39А).

Как видно в контрольных клетках происходит равномерное распределение виментина по всей клеточной поверхности аналогично распределению плектина (Рисунок 39А). В клетках с добавлением Паромомицина отмечалось значительное нарушение локализации виментина и его транслокация в перинуклеарное пространство с образованием яркого “ободка” вокруг ядра. Это может свидетельствовать о том, что вследствие нарушения взаимодействия виментина с плектином и актином, виментин транслоцируется с периферии клетки к ядру, в результате чего клетка теряет сеть виментиновых филаментов у лидирующего края, необходимую для направленной миграции. Плектин, остаётся связанным с актином, и в целом не меняет своего расположения в клетке (Рисунок 39А).

При добавлении Амикацина виментиновые филаменты вместе с плектином концентрировались в какой-либо части клетки. Помимо этого, применение Амикацина приводило к снижению полимеризации актиновых филаментов и их локализации на периферии, что совпадает с литературными данными [245]. У клеток с Паромомицином актиновый цитоскелет не отличался от контроля.

Предполагается, что у клеток, обработанных Амикацином, происходило нарушение сети актиновых филаментов у периферии, что приводило также к смещению как плектиновых молекул, так и виментиновых филаментов в область скопления актина (Рисунок 39А).

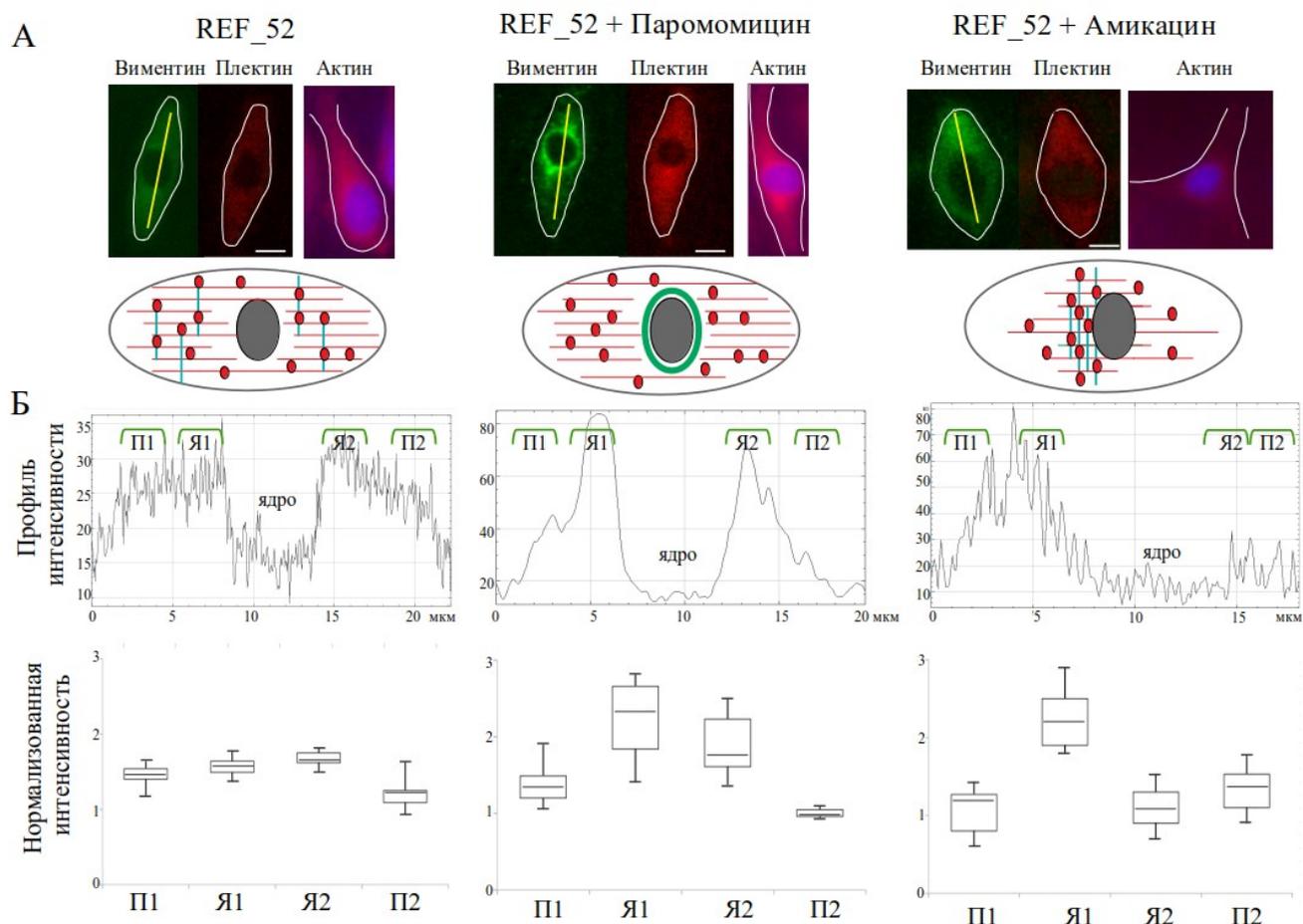


Рисунок 39. (А) Иммунофлуоресценция клеток REF\_52 с Паромомицином и Амикацином (окрашивание антителами к виментину (зелёный), плектину (красный), актина фаллоидином (красный) и DAPI (синий). Жёлтой линией обозначен продольный срез клеток; масштабный отрезок 5 мкм. Ниже приведены схемы организации цитоскелета (виментин — зелёный, актин — красный, плектин — красные круги). (Б) Профили интенсивности флуоресцентного сигнала по виментину. Ниже нормализованные значения по регионам клетки (П — периферийная область, Я — околядерная область) ( $n=45$ ),  $p < 0.05$ .

Статистический анализ профилей, измеренных вдоль клеток (Рисунок 39Б, жёлтая линия), интенсивности флуоресценции по виментину подтвердил наблюдаемые результаты. При обработке клеток Паромомицином виментин преимущественно локализовался в околядерной области, где нормализованная

интенсивность флуоресценции была в 1,5-2 раза больше, чем на периферии (Рисунок 39Б). При инкубации клеток с Амикацином наибольший пик интенсивности регистрировался также около ядра, но преимущественно с одной стороны (Рисунок 39Б). В контрольных клетках распределение виментина было равномерным как на периферии, так и в перинуклеарной части (Рисунок 39Б).

Таким образом, Паромомицин, по-видимому, нарушал взаимодействие виментина с плектином, что приводило к перераспределению виментиновых филаментов к центру клетки с периферии. Амикацин же в большей степени нарушал полимеризацию актиновых филаментов, что приводило к преимущественной локализации виментина с плектином в околядерной области.

### **3.2.4. Влияние Паромомицина и Амикацина на миграционные свойства**

#### **3.2.4.1. Паромомицин и Амикацин снижают жёсткость на лидирующем крае**

Для исследования действия Паромомицина и Амикацина на жёсткость клеток использовался метод атомно-силовой спектроскопии. Клетки высаживались на специально подготовленные подложки (см. Методы), после чего проводилось измерение их локальной жёсткости на лидирующем и заднем краях. Как и в случае предыдущих измерений было показано, что у клеток REF\_52 и REF\_117 средняя жёсткость на лидирующем крае практически в 2 раза больше таковой на противоположном. Однако при добавлении как Паромомицина, так и Амикацина средняя жёсткость на двух противоположных краях клеток сравнивалась преимущественно за счёт снижения жёсткости на переднем крае клетки, как в случае клеток REF\_52, так и у клеток REF\_117. Действие Амикацина было более выражено, вероятно из-за его разрушающего воздействия на актиновый цитоскелет. Для Паромомицина также было зафиксировано достоверное снижение жёсткости на лидирующем крае, особенно в случае клеток REF\_117 (Рисунок 40).

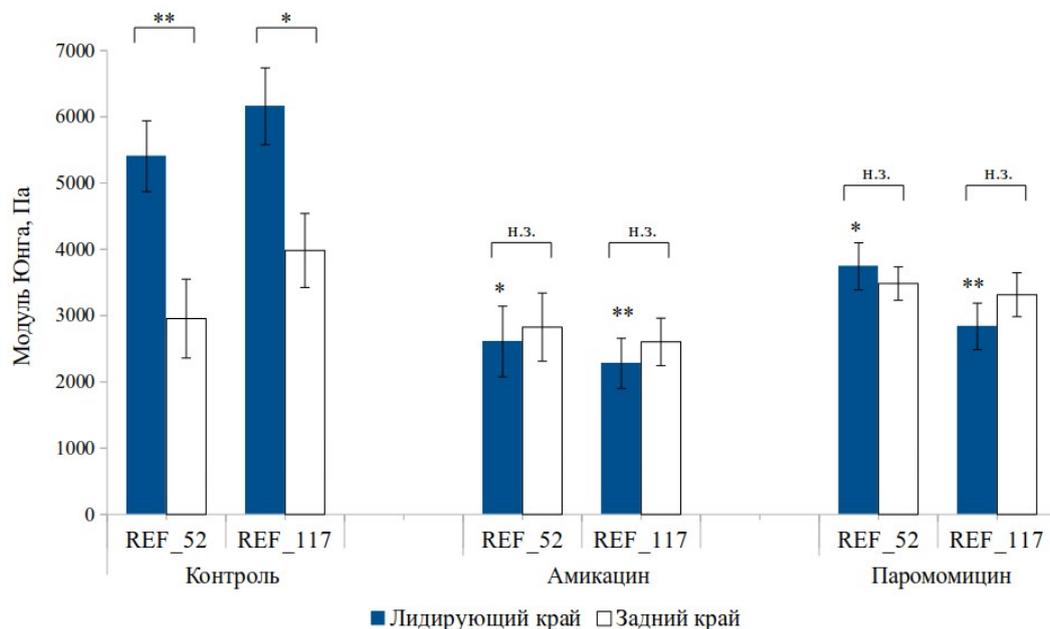


Рисунок 40. Измерение средних значений модуля Юнга (Па) при воздействии Амикацина и Паромомицина на клеточные линии REF\_52 и REF\_117 ( $n=90$ ); н.з. — не значимо,  $*p \leq 0.05$ ;  $**p \leq 0.01$ .

Также было подсчитано процентное соотношение клеток, имеющих разные значения жёсткости на противоположных концах. В качестве достоверного значения разницы между двумя краями клетки принималось значение в 700 Па, превышающее среднеквадратичное отклонение. Таким образом, в случае контрольных REF\_52 и REF\_117 клеток процент с отличающимися значениями модуля Юнга на двух краях составлял почти 80%, при обработке Амикацином или Паромомицином данный показатель падал на уровень 30-5% в зависимости от вещества и клеточной линии. Наиболее сильный эффект отмечался в случае Паромомицина на клеточной линии REF\_117, где количество клеток с одинаковой жёсткостью на противоположных концах возрастало до 95% (Рисунок 41).

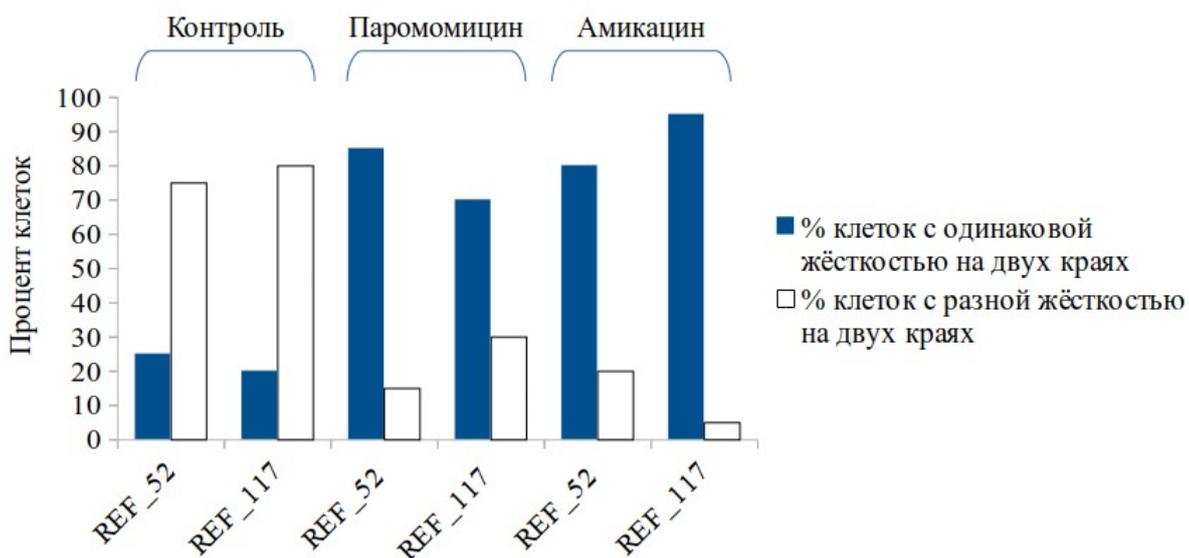


Рисунок 41. Процентное соотношение клеток с одинаковыми и разными показателями жёсткости на противоположных краях (лидирующем и заднем) клетки в зависимости от добавляемого вещества (Амикацина, Паромомицина) к клеточным линиям REF\_52 и REF\_117.

### 3.2.4.2. Паромомицин и Амикацин снижают миграционные свойства клеток

Миграционная способность клеток оценивалась с помощью скретч-теста модели раны монослоя (Wound healing assay) на клеточных линиях REF\_52 и REF\_117 в течение 24 и 48 часов при добавлении различных концентраций Паромомицина и Амикацина. Стоит отметить, что клетки REF\_117 сами по себе были более медленными, чем клетки REF\_52. Процент закрытия раневой поверхности в случае первых был на уровне 60-70% в течение первых 24 часов, тогда как REF\_52 за это время полностью закрывали “рану”.

Снижение миграции было более выражено при воздействии Амикацина из-за нарушения актинового цитоскелета. При добавлении 5 мкМ Амикацина процент закрытия раневой поверхности замедлялся в среднем на 15-20% в случае клеток REF\_52 и ориентировочно на 40-60% в случае клеток REF\_117 (Рисунок 43). Дальнейшее повышение концентрации Амикацина поддерживало замедление миграции клеток REF\_52 и REF\_117 в среднем на уровне в 20-50% в течение 24 и 48 часов, соответственно. При достижении концентрации 500 мкМ в клетках REF\_117 наблюдалась почти полная остановка миграции (Рисунок 43).

Для Паромомицина также прослеживалось замедление миграции клеток (Рисунок 42). Для клеток REF\_52 и REF\_117 добавление 5 мкМ Паромомицина практически не снижало миграционную способность клеток. Повышение концентрации до 10-50 мкМ снижало миграцию на 20-40% для клеток REF\_52 и REF\_117 в течение 24-48 часов. Дальнейшее повышение концентрации дозозависимо уменьшало миграционную способность. При 100 мкМ снижение у фибробластов REF\_52 было более, чем 50%, а у REF\_117 — 70-80% (Рисунок 43).

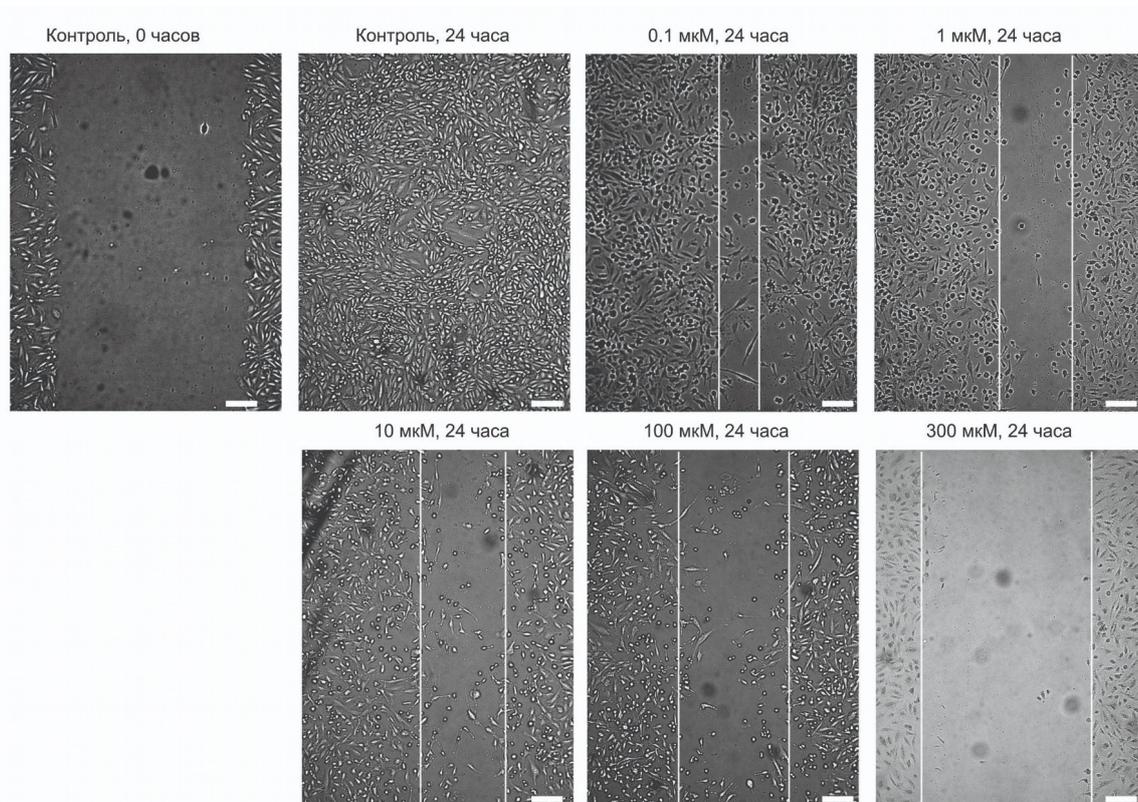


Рисунок 42. Скретч-тест на примере клеток REF\_52, обработанных Паромомицином по прошествии 24 часов.

Таким образом, добавление как Паромомицина, так и Амикацина приводило к замедлению закрытия раневой поверхности в обоих типах клеток. При этом концентрации 50-100 мкМ имели заметный эффект в обоих случаях, однако для Паромомицина эффект был в большей степени дозозависим.

Вероятно, добавление малых концентраций Амикацина приводило к нарушению структуры актинового цитоскелета, неспособного к дальнейшей полимеризации, что замедляло миграцию, а увеличение дозы Амикацина не усиливало данный эффект. Добавление Паромомицина не влияло на структуру

как актиновых, так и промежуточных филаментов, как было показано ранее, а нарушало белок-белковые взаимодействия между виментином и плектином. В связи с этим, увеличение концентрации Паромомицина могло приводить к большему замедлению миграции в зависимости от добавляемой дозы.

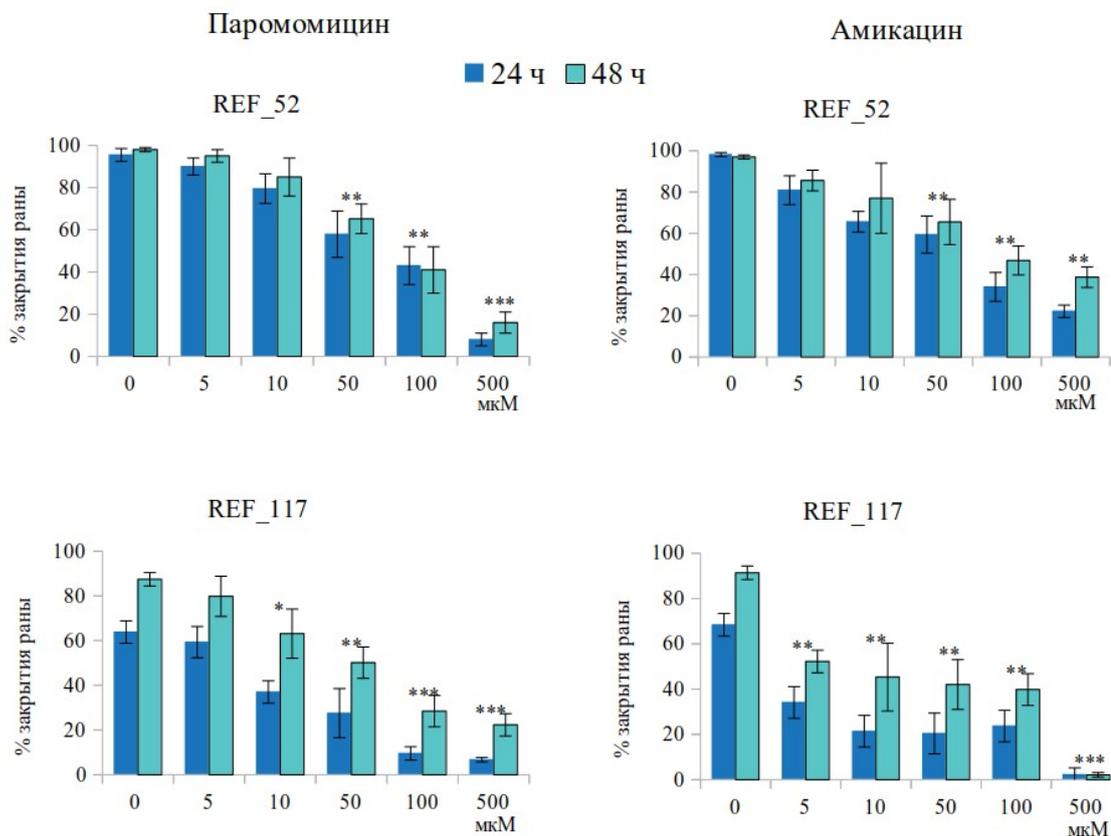


Рисунок 43. Влияние различных концентраций Паромомицина и Амикацина (0, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ) на миграционную способность клеток REF\_52 и REF\_117 в течение 24 и 48 часов в скретч-тесте, \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Стоит отметить, что наибольшее влияние Паромомицина или Амикацина было зафиксировано для клеток REF\_117, что предполагает более выраженную стабилизирующую функцию полноразмерных виментиновых филаментов, по сравнению с ULF. Таким образом, отобранные соединения воздействовали на миграционные свойства клеток через разные механизмы: Паромомицин, вероятно, ингибировал взаимодействие виментина с плектином, а Амикацин нарушал актиновый цитоскелет.

## ОБСУЖДЕНИЕ

### Септины

Септины принимают ключевую роль на заключительных этапах цитокинеза, обеспечивая успешное разделение клеток. Неправильное функционирование, локализация или отсутствие септинов приводит к нарушению организации сети актиновых филаментов, важных для работы сократительного кольца, остановке цитокинеза, что часто является летальным для клеток [25, 31, 93, 98]. Формирование септинового кольца у дрожжей в ранней G1 фазе является определяющим событием для привлечения в место разделения материнской и дочерней клетки миозина II, MyoP [93]. В результате чего в анафазе идёт формирование сократительного актин-миозинового кольца, в частности за счёт септин-опосредованной организации актиновых филаментов напрямую или через белков-посредников.

Показано, что актин-связывающий белок Hof1 аккумулируется в большом количестве на септиновом кольце в анафазе, после чего перемещается на сократительное кольцо перед началом его стягивания [246]. Предполагается ингибирующая роль Hof1 на цитокинез [247]. Тем не менее, его удаление нарушало разделение клеток и было для них летальным [247, 248]. В связи с этим, пространственная и временная организация важны для правильного функционирования данного белка. Мы показали, что септины являются первоначальным заякоривающим компонентом для Hof1, который путём взаимодействия с актиновыми филаментами может направлять их септин-опосредованную локализацию в цитокинезе.

Модель дрожжей является широко используемой и удобной для изучения процесса деления клеток. Мы предполагаем, что септины, являясь консервативными белками для всех эукариот, организуют актиновые филаменты и в клетках млекопитающих, в частности через белок PSTPIP1, гомолога Hof1 у млекопитающих [249]. В связи с определяющей ролью септинов в формировании и работе сократительного кольца, был предложен подход по нарушению их структурной организации, а именно предотвращение формирования филаментных

форм, преобладающих в процессе цитокинеза. Методом виртуального скрининга было отобрано соединение Процианидин В3, которое связывалось с местом посадки ГТФ, необходимого для полимеризации септинов, а также препятствовало присоединению соседних субъединиц.

Процианидин принадлежит к проантоцианидинам (или конденсированным танинам) класса флавоноидов и может существовать в димерной, тримерной, тетрамерной и других олигомерных формах катехина и эпикатехина. Димерные процианидины — А1, А2, В1, В2, В3, В4, В5, В6, В8, тримерные — С1, С2, тетрамерные — арекатанин А2 и циннамтаннин А2. Более всего процианидины встречаются в яблоках, какао, винограде и ягодах [250]. Вследствие природного происхождения, считается, что данное полифенольное соединение обладает меньшим количеством токсичных эффектов, и рассматривается в качестве превентивного и лечебного средства для онкологических заболеваний [251, 252].

Исследования *in vitro* показывают, что процианидин проявляет ингибирующую функцию на пролиферацию клеточных линий человеческого рака груди MCF-7, где на вторые сутки культивирования ингибирующая концентрация IC50 Процианидина В2 составила 19,21 мкМ. Добавление 50 мкМ Процианидина В2 приводило к изменениям в морфологии клеток на круглую с иррегулярной, уменьшению размеров, а также мест прикреплений клеток к субстрату. Тем не менее, признаки апоптоза не отмечались [253].

Применение 100 мкМ Процианидина В3 увеличивало клеточную смерть клеток рака простаты (LNCaP) на 95% через подавление гистоновой ацетилтрансферазы p300 (IC50 жизнеспособности клеток около 50 мкМ), но не влияло на клеточные линии NIH 3T3 или HEK-293, что предположительно говорит о снижении клеточной жизнеспособности, а не о стимулировании цитотоксических эффектов [254].

На клетках карциномы груди MDA-MB-468 было зафиксировано необратимое подавление роста клеток через ингибирование митоген-активированной протеиновой киназы и индуцирования G1 ареста в клеточном цикле, также отмечался процесс дифференциации при дозозависимом

применении виноградных семечек, содержащих процианидины, в течение 72 часов. Тем не менее, признаки апоптоза не отмечались, но морфологические изменения клеток и усиленное подавление маркера цитокератина-8 свидетельствовали о клеточной дифференциации раковых клеток [255].

Экстракт проантоцианидинов из виноградных косточек был протестирован как на раковых клеточных линиях (рак лёгкого A427, рак молочной железы MCF-7, желудочная аденокарцинома CRL-1739, острый миелогенный лейкоз K562), а также на нормальных клеточных линиях (клетки слизистой оболочки желудка и нормальных клетках мышинных макрофагов J774A.1). В результате отмечалось дозозависимое и временное цитотоксическое подавление роста именно раковых клеточных линий, кроме клеток K562, в то время как у нормальных клеток рост и жизнеспособность, напротив, улучшилась (10-20%). Также при обработке раковых клеточных линий данным экстрактом клетки теряли адгезию к субстрату и приобретали округлую форму, данные эффекты не наблюдались для нормальных клеток и линии K562 [256].

Антипролиферативный дозозависимый эффект был также показан для клеток плоскоклеточного рака полости рта CAL27 и SCC25 [257], клеток рака простаты DU145 [258, 259], LNCaP [260], клеток рака мочевого пузыря BIU87 [261], клеток колоректального рака HT29, LoVo, CaCo2, но не для нормальных клеток толстой кишки NCM460 [262-264] и *in vivo* [265] с использованием экстрактов из виноградных косточек, за счёт возможной индукции апоптоза (аноиксис) и повреждения митохондрий.

Использование экстракта процианидинов из какао на клеточных линиях рака яичника OAW42 и OVCAR3 приводило к селективной цитотоксичности данных клеток, в то время как не было никакого токсического влияния на нормальные клетки фибробластов дермы [266]. Тем не менее, проантоцианидины не имели токсического или мутагенного эффекта на нормальные клетки, включая *in vivo* исследования, а уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) при исследованиях субхронической токсичности равнялся 2%, равнозначному дозировке 1410 мг/кг/день у мужских особей или 1501 мг/кг/день

у женских особей, что означает высокую степень безопасности данной категории веществ [267].

Приведённые выше результаты по проантоцианидинам были сопоставимы с результатами, полученными нами для Процианидина В3. Мы также показали дозозависимое снижение пролиферации и жизнеспособности клеток рака молочной железы MDA-MB-231 при добавлении Процианидина В3 в течение 24-72 часов.

Механизмы действия процианидинов ранее исследовались. В частности, было показано, что Процианидин В2 дозозависимо (2,5~50 мкМ) связывался с NF-κB, препятствуя апоптозу и стимулируя воспалительные и пролиферативные процессы, снижая таким образом связывание NF-κB с ДНК (25 мкМ, 35-48%) во всех клеточных линиях лимфомы Ходжкина (L-428, KM-H2, L-540, L-1236 и HDML-2 cells) [268].

Подавление гистоновой ацетилтрансферазы Процианидином В3 и ацетилирования андрогенового рецептора снижало жизнеспособность раковых клеток простаты (IC<sub>50</sub> около 50 мкМ) [254]. Процианидин В2 снижал активность ДНК метилтрансфераз при IC<sub>50</sub> 6,88 ± 0,647 мкМ в клетках MDA-MB-231. При этом отмечалось снижение жизнеспособности раковых клеток при увеличении концентрации MDA-MB-231 (LC<sub>50</sub> = 150 мкМ), но не было выявлено никакого летального эффекта на нормальных клетках — кератиноцитах HaCat [269].

Процианидины также влияют на провоспалительные компоненты. Так, применение Процианидина В2 значительно уменьшило продукцию провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF-α и RANTES) и экспрессию анти-апоптопических белков (Bcl-xL, Bcl-2, XIAP и cFLIP) [268], также подавлялась экспрессия белков MAPK-сигнального пути (ERK1/2, JNK и p38) и PI3K/Akt-сигнального пути, что в свою очередь снижало активацию NF-κB, а последний, возможно, далее регулировал снижение циклооксигеназы (COX-2), синтазы оксида азота (iNOS), PCNA (proliferating cell nuclear antigen), циклина D1 и MMP-9 в клетках эпидермоидной карциномы (A431) [270].

Применение Процианидина увеличивало G1 популяцию клеток, что

предположительно связано с апоптозом и подавлением циклина D1, CDK4 и сурвивина [261, 266, 271].

Процианидин приводил почти к 10-кратному снижению активности MMP-2 и MMP-9, что снижало экспрессию VEGF (фактор роста сосудистого эндотелия) и стимулировало апоптоз в клетках MDA-MB-231 [272]. Предположительно процианидин может снижать жизнеспособность раковых клеток путём апоптоза и снижать их инвазивность через уменьшение процессов ангиогенеза [273-276].

Таким образом, отмечается широкий спектр действия процианидинов. Тем не менее, пока нигде не отмечался факт воздействия данной группы соединений на структуры цитоскелетных белков, в том числе септины. Методом фильтрации, пропускающей только малые молекулы, мы показали связывание и формирование комплексов септинов с Процианидином В3.

В экспериментах по электронной микроскопии была показана сниженная способность септинов формировать филаментные структуры при добавлении Процианидина В3. В образцах с добавленным соединением отмечалось большее количество гексамерных, а не октамерных септиновых частиц с двумя замыкающими субъединицами септина 9, формирующих в норме филаментные структуры. Способность Процианидина В3 формировать меньше филаментных структур также была подтверждена в эксперименте по седиментации: большинство септиновых белков находилось во фракции супернатанта, по сравнению с контролем, где филаменты септинов присутствовали в осадке.

Флуоресцентная микроскопия показала, что Процианидин В3 не приводил к формированию септиновых агрегатов. При этом отмечалось его значительное воздействие на морфологию клеток. Обработанные Процианидином В3 фибробласты принимали округлую форму вместо характерной для них вытянутой. Учитывая, что септины концентрируются в области перетяжки у делящихся клеток на последних стадиях цитокинеза, мы определили, что процент таких клеток был значительно меньше в группе с Процианидином В3.

На основании этого предполагается, что Процианидин В3 препятствует формированию септиновых филаментов, что замедляет или останавливает

процесс деления делящихся клеток. Ранее известный ингибитор — CPPU — приводит к формированию агрегатов септинов, что, вероятно, является более значительным нарушением для клетки, чем несобранные филаменты, и вызывает более резкое снижение пролиферации и жизнеспособности клеток, вероятно, через механизмы апоптоза.

Неспособность формировать септиновые филаменты в случае добавления Процианидина В3, вероятно, не вызывает столь значительного нарушения в клеточных процессах, так как отдельные септиновые субъединицы также выполняют схожие функции и могут компенсировать отсутствие филаментов при других клеточных процессах. Однако, необходимость формирования септинового кольца для привлечения других цитоскелетных компонентов на последних этапах цитокинеза, вероятно играет определяющую роль с участием именно филаментных структур септинов. В связи с чем добавление Процианидина В3 вызывало замедление пролиферации клеток. При этом их жизнеспособность оставалась намного выше, по сравнению с использованием CPPU, что предполагает меньший процент апоптоза среди клеток, обработанных Процианидином В3, а значит основной механизм действия идёт через замедление последних этапов цитокинеза.

Стоит также рассмотреть другие гипотезы возможного воздействия Процианидина В3 на септиновый компонент. В ряде видов рака наблюдается повышенная экспрессия септинов, в том числе разновидностей септина 9 [15-20, 114], что может обуславливать эффект Процианидина В3 на раковые клетки. Показано, что септин 9 привлекает и напрямую взаимодействует с эндосомальным сортирующим комплексом, необходимым для транспорта — ESCRT (Endocytic Sorting Complex Required for Transport), завершающего деление делящихся клеток [277]. Таким образом, нарушение их взаимодействия также способно повлиять на процесс цитокинеза.

Также было отмечено влияние Процианидина В3 на форму клеток, которые становились более округлыми, что также может быть следствием нарушения септиновой организации, так как септины являются цитоскелетными белками,

регулирующими форму клеток, а также процессы адгезии и механотрансдукции [12, 278].

Показано, что септин 9 может играть отдельную роль, не участвуя во формировании филаментов, а напрямую взаимодействуя с фактором обмена гуанинового нуклеотида (GEF) — ARHGEF18. Септин 9 через взаимодействие с GEF ингибирует Rho-сигналинг, играющего ключевую роль во многих клеточных процессах, включая реорганизацию цитоскелета [103, 279]. Также обнаружена солокализация GEF и септина 9 с актиновым цитоскелетом [279]. Нарушение локализации септинов с актином и, как следствие, ремоделирование последнего, может приводить к апоптозу клеток [280, 281].

Дополнительно интересно отметить потенциал применения молекул, направленных на предотвращение полимеризации септинов, относительно повышения чувствительности к противоопухолевым препаратам. Известно, что септины обеспечивают химиорезистентность клеток к онкологическим препаратам [34]. Нарушение структуры септинов может увеличить чувствительность клеток к действию подобных лекарств.

К слову, химио-сенситизирующие свойства процианидинов также были показаны в ряде исследований. Р-гликопротеин, являющийся продуктом гена мульти-лекарственной устойчивости (MDR-1), является основным участником в развитии химиорезистентности лекарственных средств, вызывая выход лекарств из клеток и снижая внутриопухолевую концентрацию терапевтических средств [282]. Использование процианидина в дозировке 80 мг/кг с 2 мг/кг доксорубицина увеличило продолжительность жизни мышей на 76% по сравнению с контролем [283]. Также клетки рака яичника после обработки экстрактом процианидина были более восприимчивы к действию доксорубицина. Помимо этого, отмечалась значительная корреляция восприимчивости к доксорубицину с падением уровня экспрессии Р-гликопротеина, что свидетельствует о химио-сенсibilизации [266]. Таким образом, процианидин может влиять на мульти-лекарственную устойчивость [284]. Вероятно, данный эффект может быть также связан с механизмом стабилизации септинами мембран-ассоциированных структур.

## **Виментин**

Виментин является одним из основных маркеров ЭМП, который в частности сопровождает появление онкологии [5]. В целом, во время миграции клетки приобретают определённую степень анизотропии с формированием хорошо детектируемого лидирующего края. Показано, что такие мигрирующие клетки имеют различные показатели жёсткости на своих противоположных концах, а передний край обычно жёстче [285]. Вероятно, это один из факторов, обеспечивающий направленность движения. Виментин активно взаимодействует с различными цитоскелетными белками, в том числе с актином как напрямую, так и через белок-адаптер плектин [190]. Взаимодействие виментин-плектин-актин может обеспечивать формирование жёсткой сети на переднем крае клетки и, соответственно, формировать направленность миграции.

Показано, что виментин в клетке может существовать в различном состоянии: в качестве нефиламентных частиц, ULF и зрелых филаментов. Нами было показано, что виментин, находящийся только в форме ULF, также поддерживает направленность клеточной миграции. В связи с этим было предположено, что плектин может связывать ULF виментин с актиновыми филаментами, поддерживая тем самым жёсткость на переднем крае клетки. К тому же в других работах были детектированы предполагаемые места связывания виментина с плектином [195-198], что показывает на возможность взаимодействия плектина с виментином в виде ULF.

Среди участков по взаимодействию виментина и плектина был выделен 5-ый PRD домен и линкер между 5-6 доменами, в частности отмечался кластер из четырёх основных аминокислот (Arg4277-Arg4280), выстилающих специальную выемку на поверхности плектина. Со стороны виментина взаимодействующая часть была обозначена в виде сегмента 1B (151-247 аминокислоты) центрального домена. В недавней работе было также отмечено предпочтение белков семейства плакинов связывать промежуточные филаменты именно С-концевым модулем в области положительно-заряженной выемки [286]. Так как данный желоб соседствует с линкером, то, в частности, для моделирования виментин-

плектиновых взаимодействий было важно учесть как 5 домен плектина, так и линкер.

Структура 5-ого PRD домена плектина с линкером была построена впервые по гомологии. После проведения белок-белкового докинга сгенерировалось одно положение, где виментиновый домен лежал на поверхности плектина. Анализ данных взаимодействий показал, что контакты со стороны плектина как раз затрагивали указанные выше для плектина аминокислотные остатки, находящиеся в области положительно-заряженной выемки, в частности были взаимодействия с аминокислотами Lys4275 и Arg4276 плектина. Со стороны виментина аминокислотные остатки также находились в предполагаемом пределе, установленном экспериментально (151-247) — Asn166-Asn177. На основе данного сайта взаимодействия был построен фармакофор и проведён скрининг соединений, среди которых наибольшей аффинностью обладали соединения Амикацин и Паромомицин.

Амикацин является аминогликозидным антибиотиком, производным канамицина, применяется для лечения грамотрицательных бактериальных инфекций, в том числе у раковых больных. Обладает высокой биодоступностью, но также и токсичностью, может приводить к ряду побочных эффектов, таких как потеря слуха, нарушение функции почек [287]. В связи с чем его применяют, в основном, в виде липосомальных ингаляций [288]. Механизм действия основан на связывании с бактериальной 16S рРНК и блокировании 30S рибосомной субъединицы с последующим нарушением белкового синтеза [287]. Тем не менее, в недавней работе было показано, что Амикацин в концентрации около 450 мкМ ингибировал на 55,6% миграцию клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231 [245].

Паромомицин также является аминогликозидным антибиотиком, но используемым для более широкого спектра патогенов, а именно как для лечения кишечного амебиаза [289], так и для некоторых штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а позже стал применяться и для лечения лейшманиоза [290]. Основное действие Паромомицина направлено на

ингибирование трансляции белкового синтеза путём его связывания с 16S рРНК [291]. Для 50% ингибирования роста эукариотического организма *Tetrahymena thermophila* использовалось 22 мкМ Паромомицина [292].

Паромомицин плохо проникает в кровоток, поэтому активно используется именно для лечения паразитарных инфекций в кишечнике. Для лучшей биодоступности и эффективности Паромомицин модифицируют, например, используют его в комплексе с альбуминовыми микросферами, которые улучшали таргетность действия препарата, что позволило на 80% снизить необходимую дозу [293], так как в больших дозах Паромомицин (особенно при более чем 3 г/день) обладает токсичностью, хоть и низкой, а также вызывает побочные эффекты, такие как тошнота, спазмы и диарея. Тем не менее, Паромомицин является одним из антибиотиков с хорошим профилем безопасности [294].

Стоит также отметить, что действие Паромомицина на рибосомы избирательно. Было показано, что его действие на рибосомы *Leishmania mexicana* приводило к значительному снижению пролиферации данного организма, а также влияло на белковый синтез, в то время как те же эксперименты на рибосомах млекопитающих практически не отражались на полипептидном синтезе и механизме трансляции. Более того, поверхностный плазмонный резонанс между Паромомицином и рРНК лейшмании и млекопитающего показал высокое связывание в первом случае и практически никакого взаимодействия в случае рРНК млекопитающего, что может говорить об избирательном действии Паромомицина на рРНК [295].

В связи с этим Паромомицин выглядит более безопасным соединением, по сравнению с Амикацином, не влияющим на биосинтез белка в клетках человека.

Мы показали, что Паромомицин обладал большей рассчитанной аффинностью к виментину и связывался с белком в *in vitro* экспериментах, по сравнению с Амикацином. Электронная микроскопия не показала какого-либо влияния данных веществ на структуру виментиновых филаментов, однако по локализации виментина в клетках были обнаружены значительные различия. Добавление Паромомицина приводило к делокализации виментиновых

филаментов в околядерную область с образованием характерного “ободка” вокруг ядра. При этом расположение плектина и актина не изменялось. Следовательно, Паромомицин приводил к нарушению взаимодействия виментина с плектином, что отражалось на его локализации. Плектин сохранял взаимодействие с актином, поэтому его распределение в клетке не нарушалось.

Воздействие Амикацина приводило к нарушению организации актиновых филаментов, в частности на периферии клетки, что влекло за собой скопление виментина с актином в агрегатные структуры около ядра. Способность Амикацина нарушать полимеризацию актина была показана также и в других работах.

Таким образом, снижение модуля Юнга на лидирующем крае отмечалось при воздействии как Амикацина, так и Паромомицина. Оба вещества снижали направленную миграцию клеток, однако, воздействуя через разные механизмы: Амикацин нарушал актиновую сеть на периферии, а Паромомицин препятствовал взаимодействию виментина с плектином, что сказывалось на организации цитоскелета, в частности на лидирующем крае клетки. Стоит отметить, что данные соединения тестировались на фибробластах с нормальными виментиновыми филаментами (REF\_52) и с мутантным виментином в виде ULF (REF\_117). Замедление миграции клеток при добавлении Паромомицина и Амикацина было более выражено в случае клеток с ULF, что предполагает большую эффективность филаментной формы виментина в поддержании жёсткости и направленной миграции.

Потенциальных “druggable” белков-мишеней, подходящих для разработки ингибиторов на основе малых молекул и при этом воздействующих на патогенез заболевания, не так много, около 500-1500 [296]. В связи с этим, многообещающе выглядит область поиска молекул, воздействующих на белок-белковые взаимодействия. Интерактом насчитывает от 300,000 до 600,000 потенциальных мишеней, подходящих для разработки препаратов. Учитывая, что биологические молекулы имеют свои недостатки: недоступность для внутриклеточных мишеней,

иммуногенность, низкая пероральная биодоступность, сложное и дорогое производство, то разработка малых молекул, нацеленных на белок-белковые взаимодействия, представляет значительный практический интерес [296].

Отобранные соединения (Процианидин В3 и Паромомицин) рассматриваются в качестве белок-белковых ингибиторов. Процианидин В3 нацелен на предотвращение септин-септиновых взаимодействий, а Паромомицин — на виментин-плектиновые. Следует принимать во внимание определённые отличия белок-белковых ингибиторов от традиционных малых молекул. Так как поверхность белок-белковых взаимодействий часто является очень обширной и не такой рельефной, как в случае ферментов с “желобами” или “карманами”, то определяющими характеристиками для белок-белковых ингибиторов являются их большой размер, больше 500 кДа, большое количество доноров (> 5) и акцепторов (> 10) водородной связи, часто высокая липофильность, что нежелательно в рамках ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) и делает данные молекулы мало подходящими для медико-химических фильтров, таких как правило Липинского. Тем не менее, не всегда соблюдение этих характеристик необходимо для успешной разработки лекарственных препаратов, в частности и на основе белок-белковых ингибиторов. Соединения из группы малых молекул, воздействующие на белок-белковые взаимодействия и не удовлетворяющие правилу Липинского, показали хорошие результаты в доклинических испытаниях (RhuDex — CD80-CD28, CA-170 — PD-1-PD-L1) и перешли на этап клинических исследований [296].

Таким образом, разработанные подходы по ингибированию полимеризации септинов и взаимодействий между виментином и плектином являются новыми и перспективными относительно дальнейшей оптимизации молекул-ингибиторов, осуществляющих направленное действие на септин-септиновые и виментин-плектиновые взаимодействия, и изучения их влияния на процессы клеточной пролиферации и миграции.

## 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.

## **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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Chaffer C.L., Weinberg R.A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis // *Science*. 2011. Vol. 331, № 6024. P. 1559–1564.
- 2) Seyfried T.N., Huysentruyt L.C. On the Origin of Cancer Metastasis // *Critical Reviews in Oncogenesis*. 2013. Vol. 18(1-2). P. 43-73.
- 3) Sun B. et al. Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression // *Biomedical Reports*. 2015. Vol. 3, № 5. P. 603-610.
- 4) Kokkinos M.I. et al. Vimentin and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer – Observations in vitro and in vivo // *Cells Tissues Organs*. 2007. Vol. 185, № 1-3. P. 191–203.
- 5) Wu S. et al. Upregulation of the EMT marker vimentin is associated with poor clinical outcome in acute myeloid leukemia // *Journal of Translational Medicine*. 2018. Vol. 16, № 1.
- 6) Usman S. et al. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis // *Cancers*. 2021. V. 13, № 19. P. 4985.
- 7) Strouhalova K. et al. Vimentin Intermediate Filaments as Potential Target for Cancer Treatment // *Cancers*. 2020. V. 12, № 1. P. 184.
- 8) Liu S. et al. High Vimentin Expression Associated with Lymph Node Metastasis and Predicated a Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, № 1.
- 9) Richardson A.M. et al. Vimentin Is Required for Lung Adenocarcinoma Metastasis via Heterotypic Tumor Cell–Cancer-Associated Fibroblast Interactions during Collective Invasion // *Clinical Cancer Research*. 2017. V. 24, № 2. P. 420-432.
- 10) Connolly D. et al. Septin roles in tumorigenesis // *Biological Chemistry*. 2011. Vol. 392, № 8-9. P. 725–738.
- 11) Shankar J. et al. Pseudopodial Actin Dynamics Control Epithelial-Mesenchymal Transition in Metastatic Cancer Cells // *Cancer Research*. 2010. Vol. 70, № 9. P. 3780–3790.
- 12) Østevold K. et al. Septin remodeling is essential for the formation of cell membrane protrusions (microtentacles) in detached tumor cells // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 44. P. 76686–76698.
- 13) Short B. Septins provide a link to epithelial migration // *Journal of Cell Biology*. 2014. V. 207, № 2. P. 162-162.
- 14) Zhang G., Feng W., Wu J. Down-regulation of SEPT9 inhibits glioma progression through suppressing TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020. V. 125. P. 109768.
- 15) Gonzalez M.E. et al. High SEPT9\_v1 Expression in Human Breast Cancer Cells

- Is Associated with Oncogenic Phenotypes // *Cancer Research*. 2007. Vol. 67, № 18. P. 8554–8564.
- 16) Montagna C. et al. The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines // *Cancer Res*. 2003. Vol. 1, № 63(9). P. 2179-2187.
  - 17) Burrows J.F. et al. Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia // *The Journal of Pathology*. 2003. Vol. 201, № 4. P. 581–588.
  - 18) Scott M. et al. Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis // *International Journal of Cancer*. 2005. Vol. 118, № 5. P. 1325–1329.
  - 19) Bennett K.L. et al. Frequently Methylated Tumor Suppressor Genes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *Cancer Research*. 2008. Vol. 68, № 12. P. 4494–4499.
  - 20) Stanbery L. et al. High SEPT9\_v1 Expression Is Associated with Poor Clinical Outcomes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *Translational Oncology*. 2010. Vol. 3, № 4. P. 239–245.
  - 21) Huang M. et al. Methylated septin 9 gene is an important prognostic marker in stage II and stage III colorectal cancer for evaluating local recurrence or distant metastasis after surgery // *BMC Gastroenterology*. 2022. V. 22, № 1.
  - 22) Dolat L., Hu Q., Spiliotis E.T. Septin functions in organ system physiology and pathology // *Biological Chemistry*. 2014. Vol. 395, № 2. P. 123–141.
  - 23) Calvo F. et al. Cdc42EP3/BORG2 and Septin Network Enables Mechano-transduction and the Emergence of Cancer-Associated Fibroblasts // *Cell Reports*. 2015. Vol. 13, № 12. P. 2699–2714.
  - 24) Zhang N. et al. The requirement of SEPT2 and SEPT7 for migration and invasion in human breast cancer via MEK/ERK activation // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 38. P. 61587–61600.
  - 25) Mavrakis M. et al. Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles // *Nature Cell Biology*. 2014. Vol. 16, № 4. P. 322–334.
  - 26) Kremer B.E., Haystead T., Macara I.G. Mammalian Septins Regulate Microtubule Stability through Interaction with the Microtubule-binding Protein MAP4 // *Molecular Biology of the Cell*. 2005. Vol. 16, № 10. P. 4648–4659.
  - 27) Kinoshita M. et al. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. // *Genes & Development*. 1997. Vol. 11, № 12. P. 1535–1547.
  - 28) Spiliotis E.T. A Mitotic Septin Scaffold Required for Mammalian Chromosome Congression and Segregation // *Science*. 2005. Vol. 307, № 5716. P. 1781–1785.
  - 29) Surka M.C., Tsang C.W., Trimble W.S. The Mammalian Septin MSF Localizes

- with Microtubules and Is Required for Completion of Cytokinesis // *Molecular Biology of the Cell*. 2002. V. 13, № 10. P. 3532-3545.
- 30) Nagata K. et al. Filament Formation of MSF-A, a Mammalian Septin, in Human Mammary Epithelial Cells Depends on Interactions with Microtubules // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. V. 278, № 20. P. 18538-18543.
  - 31) Estey M.P. et al. Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission // *Journal of Cell Biology*. 2010. V. 191, № 4. P. 741-749.
  - 32) Kim K.K. et al. Development of Potent Forchlorfenuron Analogs and Their Cytotoxic Effect in Cancer Cell Lines // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, № 1.
  - 33) Angelis D. et al. In Silico Docking of ForchlorfenuroKimm (FCF) to Septins Suggests that FCF Interferes with GTP Binding // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, № 5.
  - 34) Hu Q., Nelson W.J., Spiliotis E.T. Forchlorfenuron Alters Mammalian Septin Assembly, Organization, and Dynamics // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283, № 43. P. 29563–29571.
  - 35) Iwase M. et al. Forchlorfenuron, a phenylurea cytokinin, disturbs septin organization in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes & Genetic Systems*. 2004. Vol. 79, № 4. P. 199–206.
  - 36) Heasley L.R., Garcia G., McMurray M.A. Off-Target Effects of the Septin Drug Forchlorfenuron on Nonplant Eukaryotes // *Eukaryotic Cell*. 2014. Vol. 13, № 11. P. 1411–1420.
  - 37) Kinoshita M. et al. Self- and Actin-Templated Assembly of Mammalian Septins // *Developmental Cell*. 2002. Vol. 3, № 6. P. 791–802.
  - 38) Bertin A. et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate Promotes Budding Yeast Septin Filament Assembly and Organization // *Journal of Molecular Biology*. 2010. Vol. 404, № 4. P. 711–731.
  - 39) Liu C. et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation // *Oncotarget*. 2015. V. 6, № 18. P. 15966-15983.
  - 40) Xuan B. et al. Vimentin filaments drive migratory persistence in polyploid cancer cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. V. 117, № 43. P. 26756-26765.
  - 41) Singh N. et al. An Overview on Ashwagandha: A Rasayana (Rejuvenator) of Ayurveda // *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2011. Vol. 8, № 5S.
  - 42) Bargagna-Mohan P. et al. The Tumor Inhibitor and Antiangiogenic Agent Withaferin A Targets the Intermediate Filament Protein Vimentin // *Chemistry & Biology*. 2007. Vol. 14, № 6. P. 623–634.
  - 43) Heyninck K. et al. Withaferin A inhibits NF-kappaB activation by targeting cysteine 179 in IKK $\beta$  // *Biochemical Pharmacology*. 2014. Vol. 91, № 4. P. 501–

- 44) Falsey R.R. et al. Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II // *Nature Chemical Biology*. 2005. Vol. 2, № 1. P. 33–38.
- 45) Keeling M.C., Gavara N. Withaferin-A Can Be Used to Modulate the Keratin Network of Intermediate Filaments in Human Epidermal Keratinocytes // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, № 12. P. 4450.
- 46) Antony M.L. et al. Growth Arrest by the Antitumor Steroidal Lactone Withaferin A in Human Breast Cancer Cells Is Associated with Down-regulation and Covalent Binding at Cysteine 303 of  $\beta$ -Tubulin // *Journal of Biological Chemistry*. 2014. V. 289, № 3. P. 1852-1865.
- 47) Bargagna-Mohan P. et al. Withaferin A Targets Intermediate Filaments Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin in a Model of Retinal Gliosis // *Journal of Biological Chemistry*. 2010. V. 285, № 10. P. 7657-7669.
- 48) Maitra R. et al. Inhibition of NF $\kappa$ B by the natural product Withaferin A in cellular models of Cystic Fibrosis inflammation // *Journal of Inflammation*. 2009. Vol. 6, № 1. P. 15.
- 49) Singh D. et al. *Withania somnifera* inhibits NF- $\kappa$ B and AP-1 transcription factors in human peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells // *Phytotherapy Research*. 2007. Vol. 21, № 10. P. 905–913.
- 50) Grin B. et al. Withaferin A Alters Intermediate Filament Organization, Cell Shape and Behavior // *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, № 6.
- 51) Bollong M.J. et al. A vimentin binding small molecule leads to mitotic disruption in mesenchymal cancers // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. Vol. 114, № 46.
- 52) Trogden K.P. et al. An image-based small-molecule screen identifies vimentin as a pharmacologically relevant target of simvastatin in cancer cells // *The FASEB Journal*. 2018. Vol. 32, № 5. P. 2841–2854.
- 53) Hartwell L. Genetic control of the cell division cycle in yeast \*IIV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis // *Experimental Cell Research*. 1971. Vol. 69, № 2. P. 265–276.
- 54) Byers B., Goetsch L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. // *Journal of Cell Biology*. 1976. Vol. 69, № 3. P. 717–721.
- 55) Haarer B.K., Pringle J.R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck // *Molecular and Cellular Biology*. 1987. Vol. 7, № 10. P. 3678–3687.
- 56) Field C.M., Kellogg D. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? // *Trends in Cell Biology*. 1999. Vol. 9, № 10. P. 387–394.
- 57) Adams A.E. et al. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. //

- Journal of Cell Biology. 1990. Vol. 111, № 1. P. 131–142.
- 58) Fares H., Goetsch L., Pringle J.R. Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. // Journal of Cell Biology. 1996. Vol. 132, № 3. P. 399–411.
  - 59) Martínez C. et al. Human septin–septin interactions as a prerequisite for targeting septin complexes in the cytosol // Biochemical Journal. 2004. Vol. 382, № 3. P. 783–791.
  - 60) Spiliotis E.T. Spatial effects – site-specific regulation of actin and microtubule organization by septin GTPases // Journal of Cell Science. 2018. Vol. 131, № 1.
  - 61) Sirajuddin M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins // Nature. 2007. Vol. 449, № 7160. P. 311–315.
  - 62) Leipe D.D. et al. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases // Journal of Molecular Biology. 2002. Vol. 317, № 1. P. 41–72.
  - 63) Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism // Nature. 1991. Vol. 349, № 6305. P. 117–127.
  - 64) Zhang J. et al. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP // Current Biology. 1999. Vol. 9, № 24. P. 1458–1467.
  - 65) Pan F., Malmberg R.L., Momany M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs // BMC Evolutionary Biology. 2007. Vol. 7, № 1. P. 103.
  - 66) Rodal A.A. et al. Actin and Septin Ultrastructures at the Budding Yeast Cell Cortex // Molecular Biology of the Cell. 2005. Vol. 16, № 1. P. 372–384.
  - 67) Bertin A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* septins: Supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008. Vol. 105, № 24. P. 8274–8279.
  - 68) Nagaraj S. et al. Role of Nucleotide Binding in Septin-Septin Interactions and Septin Localization in *Saccharomyces cerevisiae* // Molecular and Cellular Biology. 2008. Vol. 28, № 16. P. 5120–5137.
  - 69) Farkasovsky M. et al. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes // Biological Chemistry. 2005. Vol. 386, № 7.
  - 70) Frazier J.A. et al. Polymerization of Purified Yeast Septins: Evidence That Organized Filament Arrays May Not Be Required for Septin Function // Journal of Cell Biology. 1998. Vol. 143, № 3. P. 737–749.
  - 71) Fujishima K. et al. Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons // Journal of Neurochemistry. 2007. Vol. 102, № 1. P. 77–92.
  - 72) Xie Y. et al. The GTP-Binding Protein Septin 7 Is Critical for Dendrite Branching

- and Dendritic-Spine Morphology // *Current Biology*. 2007. Vol. 17, № 20. P. 1746–1751.
- 73) Nagata K.-I. et al. Biochemical and Cell Biological Analyses of a Mammalian Septin Complex, Sept7/9b/11 // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, № 53. P. 55895–55904.
- 74) Sellin M.E. et al. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes // *Molecular Biology of the Cell*. 2011. Vol. 22, № 17. P. 3152–3164.
- 75) Rosa H.V.D. et al. Molecular Recognition at Septin Interfaces: The Switches Hold the Key // *Journal of Molecular Biology*. 2020. Vol. 432, № 21. P. 5784–5801.
- 76) Danielle Karoline Silva Do Vale Castro et al. A complete compendium of crystal structures for the human SEPT3 subgroup reveals functional plasticity at a specific septin interface // *IUCrJ*. 2020. Vol. 7, № 3. P. 462–479.
- 77) Brausemann A. et al. Crystal structure of Cdc11, a septin subunit from *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Structural Biology*. 2016. Vol. 193, № 3. P. 157–161.
- 78) Mendonça D.C. et al. An atomic model for the human septin hexamer by cryo-EM // *Journal of Molecular Biology*. 2021. Vol. 433, № 15. P. 167096.
- 79) Weirich C.S., Erzberger J.P., Barral Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008. Vol. 9, № 6. P. 478–489.
- 80) Sirajuddin M. et al. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Vol. 106, № 39. P. 16592–16597.
- 81) Vetter I.R. The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions // *Science*. 2001. Vol. 294, № 5545. P. 1299–1304.
- 82) Kuo Y.-C. et al. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus // *Human Mutation*. 2012. Vol. 33, № 4. P. 710–719.
- 83) Vrabioiu A.M. et al. The Majority of the *Saccharomyces cerevisiae* Septin Complexes Do Not Exchange Guanine Nucleotides // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, № 4. P. 3111–3118.
- 84) Spiliotis E.T. Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases // *Cytoskeleton*. 2010.
- 85) Mendoza M., Hyman A.A., Glotzer M. GTP Binding Induces Filament Assembly of a Recombinant Septin // *Current Biology*. 2002. Vol. 12, № 21. P. 1858–1863.
- 86) Zent E., Wittinghofer A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle // *Biological Chemistry*. 2014. Vol. 395, № 2. P. 169–180.
- 87) Versele M., Thorner J. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4 // *Journal of Cell Biology*.

2004. Vol. 164, № 5. P. 701–715.
- 88) Huang Y.-W. et al. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2 // FEBS Journal. 2006. Vol. 273, № 14. P. 3248–3260.
- 89) Zent E., Vetter I., Wittinghofer A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation // Biological Chemistry. 2011. Vol. 392, № 8-9. P. 791–797.
- 90) Macedo J.N.A. et al. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation // Biochemical Journal. 2013. Vol. 450, № 1. P. 95–105.
- 91) McMurray M.A. et al. Septin Filament Formation Is Essential in Budding Yeast // Developmental Cell. 2011. Vol. 20, № 4. P. 540–549.
- 92) Kinoshita M. Assembly of Mammalian Septins // Journal of Biochemistry. 2003. Vol. 134, № 4. P. 491–496.
- 93) Bi E. Advances in Cytokinesis Research. Cytokinesis in Budding Yeast: The Relationship between Actomyosin Ring Function and Septum Formation. // Cell Structure and Function. 2001. Vol. 26, № 6. P. 529–537.
- 94) Versele M., Thorner J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual // Trends in Cell Biology. 2005. Vol. 15, № 8. P. 414–424.
- 95) Kinoshita M. Diversity of septin scaffolds // Current Opinion in Cell Biology. 2006. Vol. 18, № 1. P. 54–60.
- 96) Carim S.C., Kechad A., Hickson G.R. Animal Cell Cytokinesis: The Rho-Dependent Actomyosin-Anilloseptin Contractile Ring as a Membrane Microdomain Gathering, Compressing, and Sorting Machine // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020. V. 8.
- 97) Eggert U.S., Mitchison T.J., Field C.M. Animal Cytokinesis: From Parts List to Mechanisms // Annual Review of Biochemistry. 2006. Vol. 75, № 1. P. 543–566.
- 98) Gera N. et al. Tumor Treating Fields Perturb the Localization of Septins and Cause Aberrant Mitotic Exit // Plos One. 2015. V. 10, № 5.
- 99) Barral Y. et al. Compartmentalization of the Cell Cortex by Septins Is Required for Maintenance of Cell Polarity in Yeast // Molecular Cell. 2000. Vol. 5, № 5. P. 841–851.
- 100) Takizawa P.A. Plasma Membrane Compartmentalization in Yeast by Messenger RNA Transport and a Septin Diffusion Barrier // Science. 2000. Vol. 290, № 5490. P. 341–344.
- 101) Demarini D.J. et al. A Septin-based Hierarchy of Proteins Required for Localized Deposition of Chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall // Journal of Cell Biology. 1997. Vol. 139, № 1. P. 75–93.
- 102) Smith C. et al. Septin 9 Exhibits Polymorphic Binding to F-Actin and Inhibits Myosin and Cofilin Activity // Journal of Molecular Biology. 2015. V. 427, № 20. P.

3273-3284.

- 103) Zeng Y. et al. SEPT9\_i1 regulates human breast cancer cell motility through cytoskeletal and RhoA/FAK signaling pathway regulation // *Cell Death & Disease*. 2019. Vol. 10, № 10.
- 104) Joberty G. et al. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42 // *Nature Cell Biology*. 2001. Vol. 3, № 10. P. 861–866.
- 105) Sheffield P.J. et al. Borg/Septin Interactions and the Assembly of Mammalian Septin Heterodimers, Trimers, and Filaments // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, № 5. P. 3483–3488.
- 106) Bowen J.R. et al. Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia // *Journal of Cell Biology*. 2011. Vol. 194, № 2. P. 187–197.
- 107) Tooley A.J. et al. Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility // *Nature Cell Biology*. 2008. Vol. 11, № 1. P. 17–26.
- 108) Mizutani Y. et al. Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells // *Biological Chemistry*. 2013. Vol. 394, № 2. P. 281–290.
- 109) Shinoda T. et al. Septin 14 Is Involved in Cortical Neuronal Migration via Interaction with Septin 4 // *Molecular Biology of the Cell*. 2010. Vol. 21, № 8. P. 1324–1334.
- 110) Roeseler S. et al. Septins, a Novel Group of GTP-binding Proteins – Relevance in Hemostasis, Neuropathology and Oncogenesis // *Klinische Pädiatrie*. 2009. Vol. 221, № 03. P. 150–155.
- 111) Ihara M. et al. Cortical Organization by the Septin Cytoskeleton Is Essential for Structural and Mechanical Integrity of Mammalian Spermatozoa // *Developmental Cell*. 2005. Vol. 8, № 3. P. 343–352.
- 112) Singh R.K. et al. Septins disruption controls tumor growth and enhances efficacy of Herceptin. 2020.
- 113) Marcus E.A. et al. Septin oligomerization regulates persistent expression of ErbB2/HER2 in gastric cancer cells // *Biochemical Journal*. 2016. Vol. 473, № 12. P. 1703–1718.
- 114) Amir S. et al. MSF-A Interacts with Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and Augments Hypoxia-Inducible Factor Transcriptional Activation to Affect Tumorigenicity and Angiogenesis // *Cancer Research*. 2006. Vol. 66, № 2. P. 856–866.
- 115) Amir S., Mabweesh N.J. SEPT9\_V1 protein expression is associated with human cancer cell resistance to microtubule disrupting agents // *Cancer Biology & Therapy*. 2007. Vol. 6, № 12. P. 1926–1931.
- 116) Dolat L. et al. Septins promote stress fiber-mediated maturation of focal adhesions and renal epithelial motility // *Journal of Cell Biology*. 2014. Vol. 207, №

2. P. 225–235.
- 117) Fujiwara T. et al. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells // *Nature*. 2005. Vol. 437, № 7061. P. 1043–1047.
- 118) Harrington E.A. et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo // *Nature Medicine*. 2004. Vol. 10, № 3. P. 262–267.
- 119) Reynolds A. et al. Phenylureas CPPU and Thidiazuron Affect Yield Components, Fruit Composition, and Storage Potential of Four Seedless Grape Selections // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1992. Vol. 117, № 1. P. 85–89.
- 120) Vardi-Oknin D., Golan M., Mabweesh N.J. Forchlorfenuron Disrupts SEPT9\_i1 Filaments and Inhibits HIF-1 // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, № 8.
- 121) Blum W. et al. The phytohormone forchlorfenuron decreases viability and proliferation of malignant mesothelioma cells in vitro and in vivo // *Oncotarget*. 2019. Vol. 10, № 65. P. 6944–6956.
- 122) Pinto A.P. et al. Filaments and fingers: Novel structural aspects of the single septin from *Chlamydomonas reinhardtii* // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, № 26. P. 10899–10911.
- 123) Herrmann H., Aebi U. Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds // *Annual Review of Biochemistry*. 2004. Vol. 73, № 1. P. 749–789.
- 124) Fuchs E., Weber K. Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease // *Annual Review of Biochemistry*. 1994. Vol. 63, № 1. P. 345–382.
- 125) Steinert P.M., Roop D.R. Molecular and Cellular Biology of Intermediate Filaments // *Annual Review of Biochemistry*. 1988. Vol. 57, № 1. P. 593–625.
- 126) Tang D.D. Intermediate filaments in smooth muscle // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2008. Vol. 294, № 4.
- 127) Hohmann, Dehghani. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork // *Cells*. 2019. Vol. 8, № 4. P. 362.
- 128) Herrmann H. et al. Structure and Assembly Properties of the Intermediate Filament Protein Vimentin: The Role of its Head, Rod and Tail Domains // *Journal of Molecular Biology*. 1996. Vol. 264, № 5. P. 933–953.
- 129) Yasui Y. et al. Protein kinases required for segregation of vimentin filaments in mitotic process // *Oncogene*. 2001. Vol. 20, № 23. P. 2868–2876.
- 130) Izawa I., Inagaki M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies // *Cancer Science*. 2006. Vol. 97, № 3. P. 167–174.
- 131) Chou Y.-H. et al. Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin // *Cell*. 1990. Vol. 62, № 6. P. 1063–1071.

- 132) Prahlad V. et al. Rapid Movements of Vimentin on Microtubule Tracks: Kinesin-dependent Assembly of Intermediate Filament Networks // *Journal of Cell Biology*. 1998. Vol. 143, № 1. P. 159–170.
- 133) Svitkina T.M., Verkhovsky A.B., Borisy G.G. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. // *Journal of Cell Biology*. 1996. Vol. 135, № 4. P. 991–1007.
- 134) Gyoeva F.K., Gelfand V.I. Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin // *Nature*. 1991. Vol. 353, № 6343. P. 445–448.
- 135) Ip W. et al. Assembly of vimentin in vitro and its implications concerning the structure of intermediate filaments // *Journal of Molecular Biology*. 1985. Vol. 183, № 3. P. 365–375.
- 136) Lopez C.G. et al. Effect of ionic strength on the structure and elongational kinetics of vimentin filaments // *Soft Matter*. 2018. Vol. 14, № 42. P. 8445–8454.
- 137) Kaschula C.H. et al. The garlic compound ajoene covalently binds vimentin, disrupts the vimentin network and exerts anti-metastatic activity in cancer cells // *BMC Cancer*. 2019. Vol. 19, № 1.
- 138) Pérez-Sala D. et al. Vimentin filament organization and stress sensing depend on its single cysteine residue and zinc binding // *Nature Communications*. 2015. Vol. 6, № 1.
- 139) Styers M.L. et al. The Endo-Lysosomal Sorting Machinery Interacts with the Intermediate Filament Cytoskeleton // *Molecular Biology of the Cell*. 2004. Vol. 15, № 12. P. 5369–5382.
- 140) Gao Y.-S., Sztul E. A Novel Interaction of the Golgi Complex with the Vimentin Intermediate Filament Cytoskeleton // *Journal of Cell Biology*. 2001. Vol. 152, № 5. P. 877–894.
- 141) Gan Z. et al. Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration // *Cell Systems*. 2016. Vol. 3, № 3.
- 142) Leduc C., Etienne-Manneville S. Regulation of microtubule-associated motors drives intermediate filament network polarization // *Journal of Cell Biology*. 2017. Vol. 216, № 6. P. 1689–1703.
- 143) Petrie R.J., Koo H., Yamada K.M. Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix // *Science*. 2014. Vol. 345, № 6200. P. 1062–1065.
- 144) Eckes B. et al. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts // *J Cell Sci*. 1998. Vol. 111, № 13. P. 1897–1907.
- 145) Mendez M.G., Kojima S.I., Goldman R.D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition // *The FASEB Journal*. 2010. Vol. 24, № 6. P. 1838–1851.

- 146) Flitney E.W. et al. Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments // *The FASEB Journal*. 2009. Vol. 23, № 7. P. 2110–2119.
- 147) Davies P.F., Mundel T., Barbee K.A. A mechanism for heterogeneous endothelial responses to flow in vivo and in vitro // *Journal of Biomechanics*. 1995. Vol. 28, № 12. P. 1553–1560.
- 148) Northcott J.M. et al. Feeling Stress: The Mechanics of Cancer Progression and Aggression // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018. Vol. 6.
- 149) Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells☆ // *Acta Biomaterialia*. 2007. Vol. 3, № 4. P. 413–438.
- 150) Cross S.E. et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients // *Nature Nanotechnology*. 2007. Vol. 2, № 12. P. 780–783.
- 151) Staunton J.R. et al. Correlating confocal microscopy and atomic force indentation reveals metastatic cancer cells stiffen during invasion into collagen I matrices // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6, № 1.
- 152) Voutouri C. et al. Role of Constitutive Behavior and Tumor-Host Mechanical Interactions in the State of Stress and Growth of Solid Tumors // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, № 8.
- 153) Tseng Y. et al. Micro-organization and visco-elasticity of the interphase nucleus revealed by particle nanotracking // *Journal of Cell Science*. 2004. Vol. 117, № 10. P. 2159–2167.
- 154) Denais C.M. et al. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration // *Science*. 2016. Vol. 352, № 6283. P. 353–358.
- 155) Davidson P.M. et al. Nuclear Deformability Constitutes a Rate-Limiting Step During Cell Migration in 3-D Environments // *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2014. Vol. 7, № 3. P. 293–306.
- 156) Guck J. et al. Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence // *Biophysical Journal*. 2005. Vol. 88, № 5. P. 3689–3698.
- 157) Ma L. et al. Keratin Filament Suspensions Show Unique Micromechanical Properties // *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274, № 27. P. 19145–19151.
- 158) Liao G., Gundersen G.G. Kinesin Is a Candidate for Cross-bridging Microtubules and Intermediate Filaments // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273, № 16. P. 9797–9803.
- 159) Kim K.K. et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103, № 35. P. 13180–13185.
- 160) Wei J. et al. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion

- and metastasis via src regulation // *Anticancer Res.* 2008. Vol. 28, № 1A. P. 327-334.
- 161) Zeisberg M., Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis // *Journal of Molecular Medicine.* 2004. Vol. 82, № 3. P. 175–181.
- 162) Hay E.D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it // *Developmental Dynamics.* 2005. Vol. 233, № 3. P. 706–720.
- 163) Savagner P. The epithelial–mesenchymal transition (EMT) phenomenon // *Annals of Oncology.* 2010. Vol. 21. P. vii89–vii92.
- 164) Chaffer C.L. et al. Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2 // *Cancer Research.* 2006. Vol. 66, № 23. P. 11271–11278.
- 165) Yamada K.M., Sixt M. Mechanisms of 3D cell migration // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2019. Vol. 20, № 12. P. 738–752.
- 166) Helfand B.T. et al. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia // *Molecular Biology of the Cell.* 2011. Vol. 22, № 8. P. 1274–1289.
- 167) Pascalis C.D. et al. Intermediate filaments control collective migration by restricting traction forces and sustaining cell–cell contacts // *Journal of Cell Biology.* 2018. V. 217, № 9. P. 3031-3044.
- 168) Logue J.S. et al. Erk regulation of actin capping and bundling by Eps8 promotes cortex tension and leader bleb-based migration // *eLife.* 2015. Vol. 4.
- 169) Liu Y.-J. et al. Confinement and Low Adhesion Induce Fast Amoeboid Migration of Slow Mesenchymal Cells // *Cell.* 2015. Vol. 160, № 4. P. 659–672.
- 170) Ruprecht V. et al. Cortical Contractility Triggers a Stochastic Switch to Fast Amoeboid Cell Motility // *Cell.* 2015. Vol. 160, № 4. P. 673–685.
- 171) Bergert M. et al. Force transmission during adhesion-independent migration // *Nature Cell Biology.* 2015. Vol. 17, № 4. P. 524–529.
- 172) Paul C.D., Mistriotis P., Konstantopoulos K. Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces // *Nature Reviews Cancer.* 2016. Vol. 17, № 2. P. 131–140.
- 173) Qin Z., Kreplak L., Buehler M.J. Hierarchical Structure Controls Nanomechanical Properties of Vimentin Intermediate Filaments // *PLoS ONE.* 2009. Vol. 4, № 10.
- 174) Nöding B., Herrmann H., Köster S. Direct Observation of Subunit Exchange along Mature Vimentin Intermediate Filaments // *Biophysical Journal.* 2014. Vol. 107, № 12. P. 2923–2931.
- 175) Lavenus S.B. et al. A flexible network of vimentin intermediate filaments promotes migration of amoeboid cancer cells through confined environments // *Journal of Biological Chemistry.* 2020. Vol. 295, № 19. P. 6700–6709.

- 176) Meng J.-J. et al. Two-hybrid Analysis Reveals Fundamental Differences in Direct Interactions between Desmoplakin and Cell Type-specific Intermediate Filaments // *Journal of Biological Chemistry*. 1997. Vol. 272, № 34. P. 21495–21503.
- 177) Brown M.J. et al. Cutting Edge: Integration of Human T Lymphocyte Cytoskeleton by the Cytolinker Plectin // *The Journal of Immunology*. 2001. Vol. 167, № 2. P. 641–645.
- 178) Matsuzawa K. et al. Domain-Specific Phosphorylation of Vimentin and Glial Fibrillary Acidic Protein by PKN // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997. Vol. 234, № 3. P. 621–625.
- 179) Ratnayake W.S. et al. Oncogenic PKC- $\iota$  activates Vimentin during epithelial-mesenchymal transition in melanoma; a study based on PKC- $\iota$  and PKC- $\zeta$  specific inhibitors // *Cell Adhesion & Migration*. 2018. P. 1–17.
- 180) Russell R.L. et al. Uridine Phosphorylase Association with Vimentin // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276, № 16. P. 13302–13307.
- 181) Lopez-Egido J. Menin's Interaction with Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin Suggests a Role for the Intermediate Filament Network in Regulating Menin Activity // *Experimental Cell Research*. 2002. Vol. 278, № 2. P. 175–183.
- 182) Tzivion G., Luo Z.-J., Avruch J. Calyculin A-induced Vimentin Phosphorylation Sequesters 14-3-3 and Displaces Other 14-3-3 Partners in Vivo // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275, № 38. P. 29772–29778.
- 183) Kim H. et al. Regulation of cell adhesion to collagen via  $\beta$ 1 integrins is dependent on interactions of filamin A with vimentin and protein kinase C epsilon // *Experimental Cell Research*. 2010. Vol. 316, № 11. P. 1829–1844.
- 184) Ding I. et al. Cooperative roles of PAK1 and filamin A in regulation of vimentin assembly and cell extension formation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2020. Vol. 1867, № 9. P. 118739.
- 185) Brown K., Binder L. Identification of the intermediate filament-associated protein gyronemin as filamin. Implications for a novel mechanism of cytoskeletal interaction // *Journal of Cell Science*. 1992. Vol. 102, № 1. P. 19–30.
- 186) Ivaska J. et al. PKC $\epsilon$ -mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility // *The EMBO Journal*. 2005. Vol. 24, № 22. P. 3834–3845.
- 187) Paramio J.M., Jorcano J.L. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signaling? // *BioEssays*. 2002. Vol. 24, № 9. P. 836–844.
- 188) Ivaska J. et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling // *Experimental Cell Research*. 2007. Vol. 313, № 10. P. 2050–2062.
- 189) Green K.J., Talian J.C., Goldman R.D. Relationship between intermediate filaments and microfilaments in cultured fibroblasts: Evidence for common foci during cell spreading // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 1986. Vol. 6, № 4. P. 406–418.

- 190) Osmanagic-Myers S. et al. Plectin reinforces vascular integrity by mediating vimentin-actin network crosstalk // *Journal of Cell Science*. 2015.
- 191) Jiu Y. et al. Bidirectional Interplay between Vimentin Intermediate Filaments and Contractile Actin Stress Fibers // *Cell Reports*. 2015. V. 11, № 10. P. 1511-1518.
- 192) Jefferson J., Leung C., Liem R. Plakins: Goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004. Vol. 5. P. 542–553.
- 193) Bhattacharya R. et al. Recruitment of vimentin to the cell surface by beta3 integrin and plectin mediates adhesion strength // *J. Cell Sci*. 2009. V. 122. P. 1390-1400.
- 194) Sonnenberg A., Liem R.K. Plakins in development and disease // *Experimental Cell Research*. 2007. Vol. 313, № 10. P. 2189–2203.
- 195) Favre B. et al. Plectin interacts with the rod domain of type III intermediate filament proteins desmin and vimentin // *European Journal of Cell Biology*. 2011. Vol. 90, № 5. P. 390–400.
- 196) Foisner R. et al. Cytoskeleton-associated plectin: in situ localization, in vitro reconstitution, and binding to immobilized intermediate filament proteins. // *Journal of Cell Biology*. 1988. Vol. 106, № 3. P. 723–733.
- 197) Steinbock F. et al. Dose-dependent linkage, assembly inhibition and disassembly of vimentin and cytokeratin 5/14 filaments through plectin's intermediate filament-binding domain // *Journal of Cell Science*. 2000. Vol. 113, № 3. P. 483–491.
- 198) Nikolic B. et al. Basic amino acid residue cluster within nuclear targeting sequence motif is essential for cytoplasmic plectin-vimentin network junctions. // *Journal of Cell Biology*. 1996. Vol. 134, № 6. P. 1455–1467.
- 199) Choi H.-J. et al. Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure // *Nature Structural Biology*. 2002.
- 200) Kang H. et al. Structure of the Intermediate Filament-Binding Region of Desmoplakin // *Plos One*. 2016. Vol. 11, № 1.
- 201) Karashima T., Watt F.M. Interaction of periplakin and envoplakin with intermediate filaments // *Journal of Cell Science*. 2002. Vol. 115, № 24. P. 5027–5037.
- 202) Kazerounian S., Uitto J., Aho S. Unique role for the periplakin tail in intermediate filament association: specific binding to keratin 8 and vimentin // *Experimental Dermatology*. 2002. Vol. 11, № 5. P. 428–438.
- 203) Odintsova E. et al. Binding of the periplakin linker requires vimentin acidic residues D176 and E187 // *Communications Biology*. 2020. V. 3, № 1.
- 204) Fogl C. et al. Mechanism of intermediate filament recognition by plakin repeat domains revealed by envoplakin targeting of vimentin // *Nature Communications*. 2016. Vol. 7, № 1.

- 205) Chavez J. et al. Site-Specific Protein Adducts of 4-Hydroxy-2(E)-Nonenal in Human THP-1 Monocytic Cells: Protein Carbonylation Is Diminished by Ascorbic Acid // *Chemical Research in Toxicology*. 2009. Vol. 23, № 1. P. 37–47.
- 206) Stamatakis K., Pérez-Sala D. Prostanoids with Cyclopentenone Structure as Tools for the Characterization of Electrophilic Lipid-Protein Interactomes // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006. Vol. 1091, № 1. P. 548–570.
- 207) Oeste C.L., Pérez-Sala D. Modification of cysteine residues by cyclopentenone prostaglandins: Interplay with redox regulation of protein function // *Mass Spectrometry Reviews*. 2013. Vol. 33, № 2. P. 110–125.
- 208) Gharbi S. et al. Study of protein targets for covalent modification by the antitumoral and anti-inflammatory prostaglandin PGA1: focus on vimentin // *Journal of Mass Spectrometry*. 2007. Vol. 42, № 11. P. 1474–1484.
- 209) Stamatakis K., Sánchez-Gómez F.J., Pérez-Sala D. Identification of Novel Protein Targets for Modification by 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 in Mesangial Cells Reveals Multiple Interactions with the Cytoskeleton // *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005. Vol. 17, № 1. P. 89–98.
- 210) Kumar N. et al. Requirement of Vimentin Filament Assembly for  $\beta$ 3-Adrenergic Receptor Activation of ERK MAP Kinase and Lipolysis // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, № 12. P. 9244–9250.
- 211) Durham H. The effect of beta, beta'-iminodipropionitrile (IDPN) on cytoskeletal organization in cultured human skin fibroblasts // *Cell Biology International Reports*. 1986. Vol. 10, № 8. P. 599–610.
- 212) Satelli A., Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. Vol. 68, № 18. P. 3033–3046.
- 213) Pronk S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29, № 7. P. 845–854.
- 214) Voevodin V.V. et al. Supercomputer Lomonosov-2: Large Scale, Deep Monitoring and Fine Analytics for the User Community // *Supercomputing Frontiers and Innovations*. 2019. V. 6, № 2. P. 4–11.
- 215) Sastry G.M. et al. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments // *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2013. Vol. 27, № 3. P. 221–234.
- 216) Kim S. et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces // *Nucleic Acids Research*. 2021. Vol. 49, № D1. P. D1388-D1395.
- 217) Jacobson M.P. et al. On the Role of the Crystal Environment in Determining Protein Side-chain Conformations // *Journal of Molecular Biology*. 2002. Vol. 320, № 3. P. 597–608.
- 218) Dixon S.L., Smondyrev A.M., Rao S.N. PHASE: A Novel Approach to

Pharmacophore Modeling and 3D Database Searching // Chemical Biology Drug Design. 2006. Vol. 67, № 5. P. 370–372.

- 219) Friesner R.A. et al. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes // Journal of Medicinal Chemistry. 2006. Vol. 49, № 21. P. 6177–6196.
- 220) Case D.A. et al. The Amber biomolecular simulation programs // Journal of Computational Chemistry. 2005. Vol. 26, № 16. P. 1668–1688.
- 221) Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // Journal of Computational Chemistry. 2009.
- 222) Guedes I.A. et al. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery // Scientific Reports. 2021. Vol. 11, № 1.
- 223) Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS // Nucleic Acids Research. 2011. Vol. 39, № suppl.
- 224) Liu Y. et al. CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking // Acta Pharmacologica Sinica. 2019. Vol. 41, № 1. P. 138–144.
- 225) Bowers K.J. et al. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters // ACM/IEEE SC 2006 Conference (SC'06). 2006.
- 226) Scheres S.H. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination // Journal of Structural Biology. 2012. Vol. 180, № 3. P. 519–530.
- 227) Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nature Methods. 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.
- 228) Efremov Y. et al. Application of the Johnson–Kendall–Roberts model in AFM-based mechanical measurements on cells and gel. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015. Vol. 134. P. 131–139.
- 229) Ueber die Berührung fester elastischer Körper. // Journal für die reine und angewandte Mathematik (Crelles Journal). 1882. Vol. 1882, № 92. P. 156–171.
- 230) Efremov Y.M. et al. Measuring nanoscale viscoelastic parameters of cells directly from AFM force-displacement curves // Scientific Reports. 2017. Vol. 7, № 1.
- 231) Wu P.-H. et al. A comparison of methods to assess cell mechanical properties // Nature Methods. 2018. Vol. 15, № 7. P. 491–498.
- 232) Garabedian M.V. et al. 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.
- 233) Kim M.S. et al. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and

- mediates polymerization-dependent functions in abscission // *Journal of Cell Biology*. 2011. Vol. 195, № 5. P. 815–826.
- 234) Filimonov D.A. et al. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2014. Vol. 50, № 3. P. 444–457.
- 235) Morris G.M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function // *Journal of Computational Chemistry*. 1998. Vol. 19, № 14. P. 1639–1662.
- 236) Magalhães C.S.D. et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands // *Information Sciences*. 2014. Vol. 289. P. 206–224.
- 237) Bitencourt-Ferreira G., Azevedo W.F.D. Docking with SwissDock // *Methods in Molecular Biology Docking Screens for Drug Discovery*. 2019. P. 189–202.
- 238) Repasky M.P., Shelley M., Friesner R.A. Flexible Ligand Docking with Glide // *Current Protocols in Bioinformatics*. 2007.
- 239) Mastronarde D.N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements // *Journal of Structural Biology*. 2005. Vol. 152, № 1. P. 36–51.
- 240) Kinoshita M. // *Genome Biology*. 2003. Vol. 4, № 11. P. 236.
- 241) Etienne-Manneville S. Cdc42 - the centre of polarity // *Journal of Cell Science*. 2004. Vol. 117, № 8. P. 1291–1300.
- 242) Lipsky N., Pagano R. A vital stain for the Golgi apparatus // *Science*. 1985. Vol. 228, № 4700. P. 745–747.
- 243) Zhu X., Mitchell J.C. KFC2: A knowledge-based hot spot prediction method based on interface solvation, atomic density, and plasticity features // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2011. V. 79, № 9. P. 2671-2683.
- 244) Darnell S.J., Page D., Mitchell J.C. An automated decision-tree approach to predicting protein interaction hot spots // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2007. V. 68, № 4. P. 813-823.
- 245) Wang Y.-H., Chen Y.-H., Shen W.-H. Amikacin Suppresses Human Breast Cancer Cell MDA-MB-231 Migration and Invasion // *Toxics*. 2020. Vol. 8, № 4. P. 108.
- 246) Vallen E.A., Caviston J., Bi E. Roles of Hof1p, Bni1p, Bnr1p, and Myo1p in Cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular Biology of the Cell*. 2000. V. 11, № 2. P. 593-611.
- 247) Blondel M. et al. Degradation of Hof1 by SCFGrr1 is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast // *The EMBO Journal*. 2005. V. 24, № 7. P. 1440-1452.
- 248) Meitinger F. et al. Phosphorylation-dependent regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis // *Genes & Development*. 2011. V. 25, № 8. P. 875-888.

- 249) Spencer S. et al. PSTPIP: A Tyrosine Phosphorylated Cleavage Furrow-associated Protein that Is a Substrate for a PEST Tyrosine Phosphatase // *Journal of Cell Biology*. 1997. V. 138, № 4. P. 845-860.
- 250) Lee Y. Cancer Chemopreventive Potential of Procyanidin // *Toxicological Research*. 2017. Vol. 33, № 4. P. 273–282.
- 251) Riboli E., Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk // *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003. Vol. 78, № 3.
- 252) Zhao J. et al. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation–promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent // *Carcinogenesis*. 1999. Vol. 20, № 9. P. 1737–1745.
- 253) Gouvêa C.C.P., Avelar M. Procyanidin B2 cytotoxicity to MCF-7 human breast adenocarcinoma cells // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012. Vol. 74, № 4. P. 351.
- 254) Choi K.-C. et al. Procyanidin B3, an inhibitor of histone acetyltransferase, enhances the action of antagonist for prostate cancer cells via inhibition of p300-dependent acetylation of androgen receptor // *Biochemical Journal*. 2011. Vol. 433, № 1. P. 235–244.
- 255) Agarwal C. et al. A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen-activated protein kinases activation and inducing G1 arrest and differentiation // *Clin Cancer Res*. 2000. Vol. 6, № 7. P. 2921-2930.
- 256) Ye X. et al. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells // *Mol Cell Biochem*. 1999. Vol. 196, № 1-2. P. 99-108.
- 257) Chatelain K. et al. Cranberry and Grape Seed Extracts Inhibit the Proliferative Phenotype of Oral Squamous Cell Carcinomas // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011. Vol. 2011. P. 1–12.
- 258) Tyagi A., Agarwal R., Agarwal C. Grape seed extract inhibits EGF-induced and constitutively active mitogenic signaling but activates JNK in human prostate carcinoma DU145 cells: possible role in antiproliferation and apoptosis // *Oncogene*. 2003. Vol. 22, № 9. P. 1302–1316.
- 259) Agarwal C. Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release // *Carcinogenesis*. 2002. Vol. 23, № 11. P. 1869–1876.
- 260) Kaur M., Agarwal R., Agarwal C. Grape seed extract induces anoikis and caspase-mediated apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells: possible role

- of ataxia telangiectasia mutated–p53 activation // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006. Vol. 5, № 5. P. 1265–1274.
- 261) Liu J. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by grape seed procyanidin extract in human bladder cancer BIU87 cells // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016. Vol. 20, № 15. P. 3282-3291.
- 262) Kaur M. et al. Grape Seed Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells // *Nutrition and Cancer*. 2008. Vol. 60, № sup1. P. 2–11.
- 263) Hsu C.P. et al. Mechanisms of grape seed procyanidin-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells // *Anticancer Res*. 2009. Vol. 29, № 1. P. 283-289.
- 264) Engelbrecht A.-M. et al. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line // *Cancer Letters*. 2007. Vol. 258, № 1. P. 144–153.
- 265) Kaur M. et al. Grape Seed Extract Inhibits In vitro and In vivo Growth of Human Colorectal Carcinoma Cells // *Clinical Cancer Research*. 2006. Vol. 12, № 20. P. 6194–6202.
- 266) Khanna A., Taparia S. Effect of procyanidin-rich extract from natural cocoa powder on cellular viability, cell cycle progression, and chemoresistance in human epithelial ovarian carcinoma cell lines // *Pharmacognosy Magazine*. 2016. Vol. 12, № 46. P. 109.
- 267) Yamakoshi J. et al. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds // *Food and Chemical Toxicology*. 2002. Vol. 40, № 5. P. 599–607.
- 268) Mackenzie G.G. et al. Dimeric procyanidin B2 inhibits constitutively active NF- $\kappa$ B in Hodgkin's lymphoma cells independently of the presence of I $\kappa$ B mutations // *Biochemical Pharmacology*. 2008. Vol. 75, № 7. P. 1461–1471.
- 269) Shilpi A. et al. Mechanisms of DNA methyltransferase–inhibitor interactions: Procyanidin B2 shows new promise for therapeutic intervention of cancer // *Chemico-Biological Interactions*. 2015. Vol. 233. P. 122–138.
- 270) Meeran S.M. Proanthocyanidins inhibit mitogenic and survival-signaling in vitro and tumor growth in vivo // *Frontiers in Bioscience*. 2008. Vol. 13, № 13. P. 887.
- 271) Chung Y.-C. et al. Grape-Seed Procyanidins Inhibit the In Vitro Growth and Invasion of Pancreatic Carcinoma Cells // *Pancreas*. 2012. Vol. 41, № 3. P. 447–454.
- 272) Lewandowska U. et al. Procyanidins from Evening Primrose (*Oenothera paradoxa*) Defatted Seeds Inhibit Invasiveness of Breast Cancer Cells and Modulate the Expression of Selected Genes Involved in Angiogenesis, Metastasis, and Apoptosis // *Nutrition and Cancer*. 2013. Vol. 65, № 8. P. 1219–1231.
- 273) Lin Y.-S. et al. The chemoadjuvant potential of grape seed procyanidins on p53-related cell death in oral cancer cells // *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2011. Vol. 41, № 4. P. 322–331.

- 274) Dinicola S. et al. Grape seed extract suppresses MDA-MB231 breast cancer cell migration and invasion // *European Journal of Nutrition*. 2013. Vol. 53, № 2. P. 421–431.
- 275) Feng L.-L. et al. Effect of Grape Procyanidins on Tumor Angiogenesis in Liver Cancer Xenograft Models // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014. Vol. 15, № 2. P. 737–741.
- 276) Wang A. et al. Procyanidins Mitigate Osteoarthritis Pathogenesis by, at Least in Part, Suppressing Vascular Endothelial Growth Factor Signaling // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. Vol. 17, № 12. P. 2065.
- 277) Karasmanis E.P. et al. A Septin Double Ring Controls the Spatiotemporal Organization of the ESCRT Machinery in Cytokinetic Abscission // *Current Biology*. 2019. V. 29, № 13.
- 278) Lam M., Calvo F. Regulation of mechanotransduction: Emerging roles for septins // *Cytoskeleton*. 2018. Vol. 76, № 1. P. 115–122.
- 279) Nagata K.-I., Inagaki M. Cytoskeletal modification of Rho guanine nucleotide exchange factor activity: identification of a Rho guanine nucleotide exchange factor as a binding partner for Sept9b, a mammalian septin // *Oncogene*. 2004. Vol. 24, № 1. P. 65–76.
- 280) Poüs C., Klipfel L., Baillet A. Cancer-Related Functions and Subcellular Localizations of Septins // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2016. Vol. 4.
- 281) Desouza M., Gunning P.W., Stehn J.R. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis // *BioArchitecture*. 2012. Vol. 2, № 3. P. 75–87.
- 282) Januchowski R. et al. MDR Gene Expression Analysis of Six Drug-Resistant Ovarian Cancer Cell Lines // *BioMed Research International*. 2013. Vol. 2013. P. 1–10.
- 283) He L. et al. Inhibition of P-glycoprotein function by procyanidine on blood-brain barrier // *Phytotherapy Research*. 2009. Vol. 23, № 7. P. 933–937.
- 284) Zhao B.-X. et al. Grape Seed Procyanidin Reversal of P-glycoprotein Associated Multi-Drug Resistance via Down-regulation of NF- $\kappa$ B and MAPK/ERK Mediated YB-1 Activity in A2780/T Cells // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, № 8.
- 285) Su J. et al. Geometric confinement influences cellular mechanical properties II—Intracellular variances in polarized cells // *Molecular and Cellular Biomechanics*. 2007. Vol. 4, № 2. P. 105–118.
- 286) Mohammed F. et al. Molecular mechanism of intermediate filament recognition by plakin proteins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2020. Vol. 1867, № 11. P. 118801.
- 287) Sizar O., Rahman S., Sundareshan V. Amikacin // *StatPearls Publishing*. 2021.
- 288) Shirley M. Amikacin Liposome Inhalation Suspension: A Review in

- Mycobacterium avium* Complex Lung Disease // *Drugs*. 2019. Vol. 79, № 5. P. 555–562.
- 289) Stauffer W., Ravdin J.I. *Entamoeba histolytica*: an update // *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2003. Vol. 16, № 5. P. 479–485.
- 290) Wiwanitkit V. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2012. P. 323.
- 291) Fourmy D., Yoshizawa S., Puglisi J.D. Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 s rRNA // *Journal of Molecular Biology*. 1998. Vol. 277, № 2. P. 333–345.
- 292) Eustice D.C., Wilhelm J.M. Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics in eukaryotic protein synthesis // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1984. Vol. 26, № 1. P. 53–60.
- 293) Khan W., Sharma S.S., Kumar N. Bioanalytical method development, pharmacokinetics, and toxicity studies of paromomycin and paromomycin loaded in albumin microspheres // *Drug Testing and Analysis*. 2012. Vol. 5, № 6. P. 453–460.
- 294) Musa A.M. et al. Paromomycin for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Sudan: A Randomized, Open-Label, Dose-Finding Study // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010. Vol. 4, № 10.
- 295) Fernández M.M., Malchiodi E.L., Algranati I.D. Differential Effects of Paromomycin on Ribosomes of *Leishmania mexicana* and Mammalian Cells // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010. Vol. 55, № 1. P. 86–93.
- 296) Bojadzic D., Buchwald P. Toward Small-Molecule Inhibition of Protein–Protein Interactions: General Aspects and Recent Progress in Targeting Costimulatory and Coinhibitory (Immune Checkpoint) Interactions // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2018. V. 18, № 8. P. 674-699.
- 297) Vakhrusheva A. et al. The Role of Vimentin in Directional Migration of Rat Fibroblasts // *Cytoskeleton*. 2019. V. 76, № 9-10. P. 467–476.
- 298) Vakhrusheva A.V. et al. Procyanidin B3 as a Potential Inhibitor of Human Septin 9 // *Biophysics*. 2021. V. 66, № 6. P. 887–896.