

Исследование влияния противоопухолевых лекарств на динамику микротрубочек

Багдасарян Офелия, Гармаева Даяна, Дюльдин Егор, Журлова Полина, Фрадкова Анастасия, Юшкевич Артемий, Дашкевич Наталья, Никашин Борис, Серёгина Елена, Гудимчук Никита

Лаборатория микротрубочек

ВВЕДЕНИЕ

Микротрубочки – это динамические полимеры белка тубулина, они могут переключаться между фазами удлинения и укорочения. Их динамику можно остановить с помощью ингибиторов, что часто используется в борьбе с ростом опухолевых клеток.

ЦЕЛЬ

Исследовать влияние и механизм действия новых противоопухолевых лекарств (таксол и/или эрибулин) на динамику микротрубочек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

- 1) Аффинная хроматография
- 2) Белковый электрофорез
- 3) Спектрофотометрия
- 4) Микроскопия
- 5) Полученные результаты микроскопии были обработаны в программе ImageJ

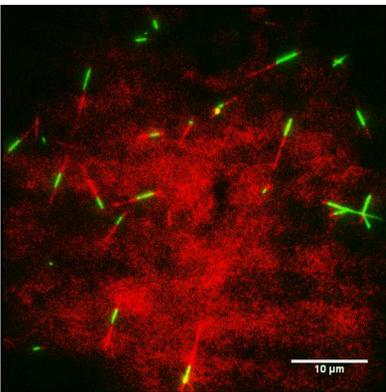


Рис. 2
Микротрубочки, растущие от затравок

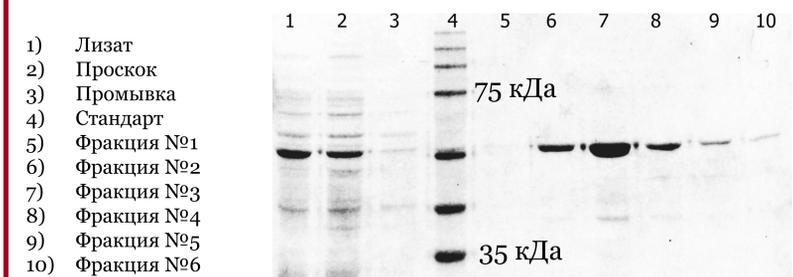
После очистки белка EB1 с помощью хроматографии мы получили 6 фракций (рис.1) с различными концентрациями, измеренными на спектрофотометре. Зная коэффициент экстинкции белка EB1, мы рассчитали концентрацию средней фракции = 11,6 µM.

Далее, денатурирующий электрофорез показал, что наш экстракт не содержит посторонних примесей. Вес полученного белка составляет ~ 60 кДа, что соответствует белку EB1. Однако, что-то пошло не так: белок выпал в осадок после разморозки. Хотя мы и провели ренатурацию белка, но это не дало результатов, поэтому мы решили исследовать лекарство отдельно от маркера EB1.

РЕЗУЛЬТАТЫ



Рис. 1 Фракции выделенного белка EB1



- 1) Лизат
- 2) Проскок
- 3) Промывка
- 4) Стандарт
- 5) Фракция №1
- 6) Фракция №2
- 7) Фракция №3
- 8) Фракция №4
- 9) Фракция №5
- 10) Фракция №6

Подготовив двухканальные камеры из силанизированного стекла (рис. 4), мы поместили в них затравки для роста микротрубочек (seeds) (рис. 2). С использованием TIRF-микроскопии мы снимали процесс полимеризации и деполимеризации микротрубочек без ингибиторов, в присутствии таксола (50 нМ и 150 нМ), эрибулина (500 нМ) и таксол+эрибулин (50 нМ, 500 нМ соответственно). В программе ImageJ мы строили кимограммы (рис. 3), по которым рассчитывали скорость полимеризации и деполимеризации.

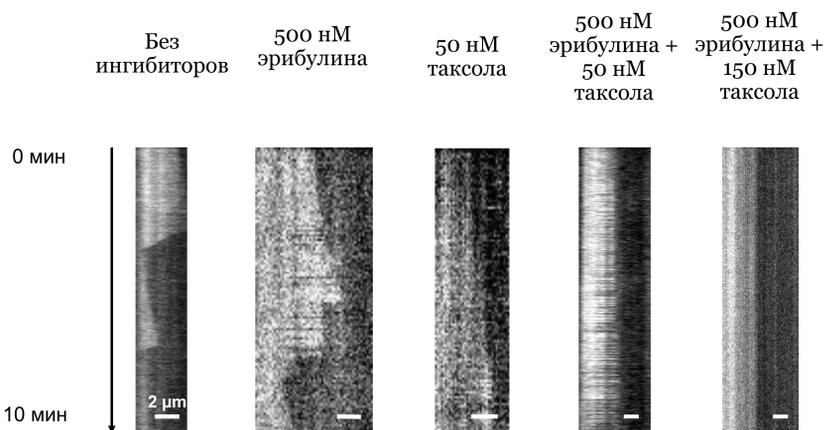


Рис. 3 Кимограммы (масштабный отрезок – 2 мкм)

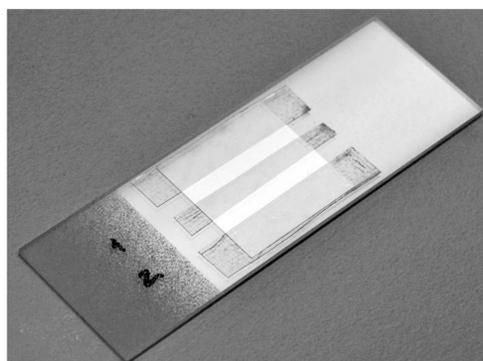
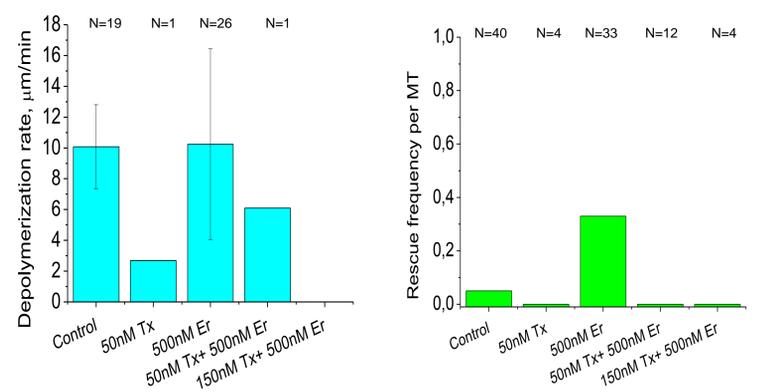
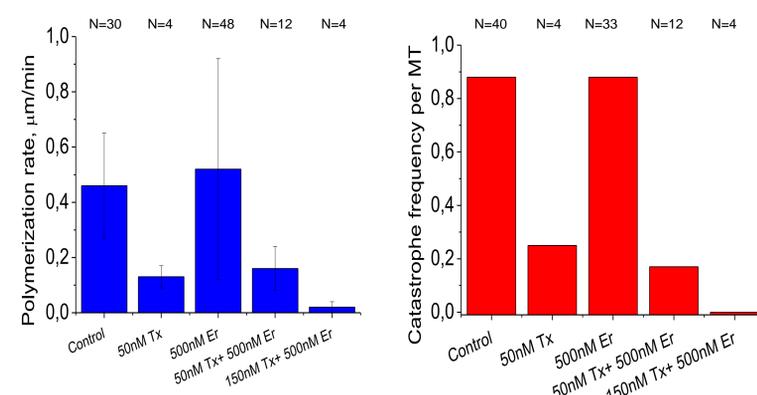


Рис. 4 Образец двухканальной камеры



ВЫВОДЫ

1. Эрибулин особо не повлиял на скорость полимеризации/деполимеризации микротрубочек, его результаты не сильно отличались от контрольного образца.
2. Эрибулин увеличивает количество спасений, влияния таксола на этот показатель выявлено не было.
3. Таксол подавляет рост, деполимеризацию и катастрофы микротрубочек.
4. Между смесью эрибулина с таксолом и таксолом не было выявлено значимых различий. Таким образом, гипотеза о синергии таксола и эрибулина не подтвердилась.

