

Изучение механизма устойчивости микротрубочек к противораковому препарату – Таксол.

Губанова Елизавета, Добросмыслов Ростислав, Игнатъева Елизавета, Кабановский Даниил, Шелепова Елена, Фомичева Светлана, Дашкевич Наталья, Никашин Борис, Сантана Эвелин, Серёгина Елена, Гудимчук Никита.

Школа Молекулярной и Теоретической Биологии 2017, La Universitat Pompeu Fabra, Centre for Genomic Regulation, Barcelona

Введение

Таксол – препарат, широко используемый для лечения онкологических заболеваний. Его действие направлено на угнетение клеточного деления. Однако в некоторых случаях у пациентов вырабатывается резистентность к препарату. Была выдвинута гипотеза о взаимосвязи между наличием $\beta 3$ изоформы тубулина и отсутствием ответа на терапию.

Цель

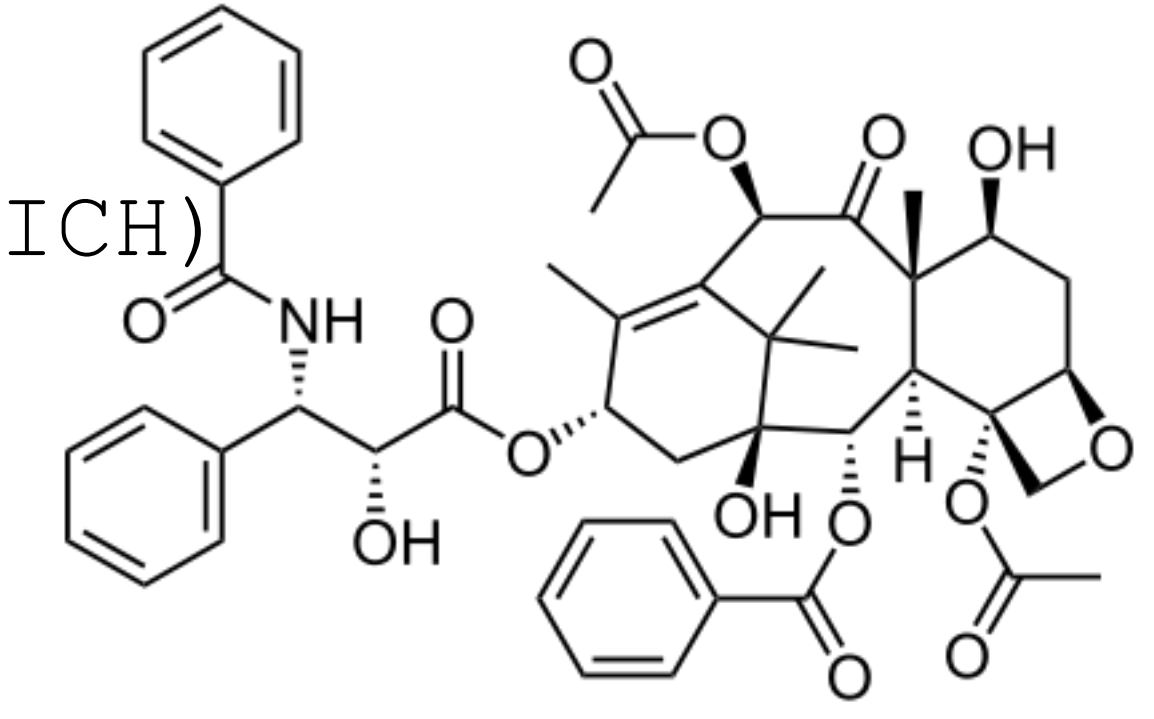
Экспериментально исследовать роль $\beta 3$ изоформы тубулина в механизме устойчивости к Таксолу, используя фракции очищенного белка.

Результаты

- Выделен белок EB1-GFP из клеточной культуры E.coli и получены три образца различной чистоты (sample 1, 2, 3) При измерении концентрации EB1-GFP по поглощению на 280 нм, самой концентрированной оказалась фракция 3-3 (101,78 микромоляр/л) (рис.1)
- Для проверки степени очистки белка и выбора наиболее подходящей фракции был использован электрофорез (рис.2)
- Для отделения $\beta 3$ -изоформы тубулина от общей смеси были применены магнитные шарики, содержащие антитела к данной изоформе (рис.3)
- Изучена динамика микротрубочек при помощи TIRF-микроскопии (рис.4) в различных условиях:
 - Тубулин, EB1
 - Тубулин, EB1 и Таксол (концентрации 0,1нМ; 1нМ; 10нМ, 0,25нМ)
 - Тубулин (без $\beta 3$ -изоформы), EB1
 - Тубулин (без $\beta 3$ -изоформы), EB1, Таксол (концентрации 0,1нМ; 0,25нМ)
- Полученные при микроскопии видео были обработаны в программе ImageJ, были построены кимограммы динамики микротрубочек (рис.5 а, б), с помощью чего были измерены скорости полимеризации и деполимеризации микротрубочек

Материалы и методы

- Клеточная культура E.coli, синтезирующая белок EB1
- Свиной/бычий Тубулин
- Таксол (Paclitaxel SIGMA-ALDRICH)



- Аффинная хроматография
- Денатурирующий белковый электрофорез в полиакриламидном геле
- Иммунопреципитация
- TIRF-микроскопия
- Спектрофотометрия



Рис. 1

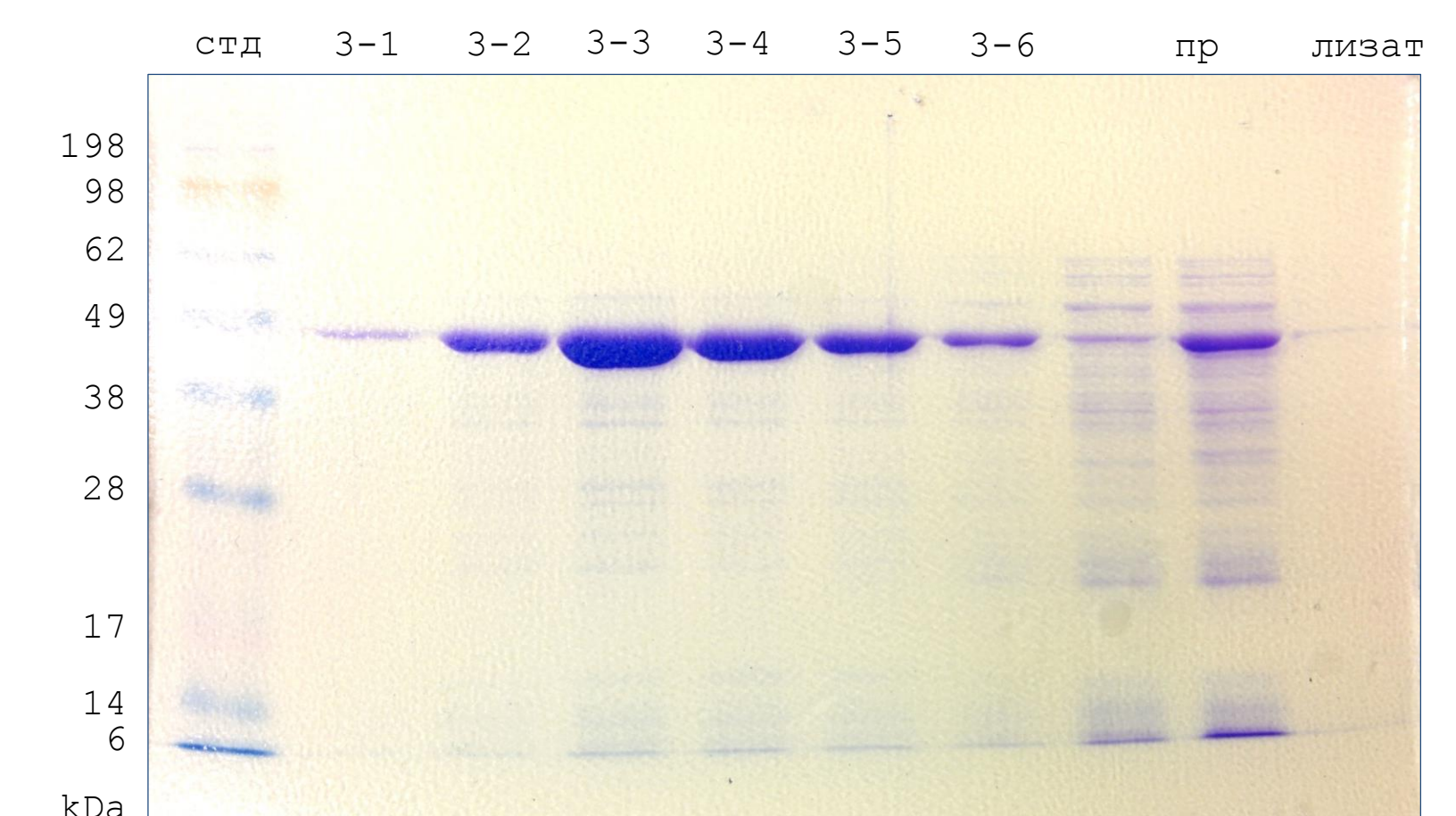


Рис. 2



Рис. 3

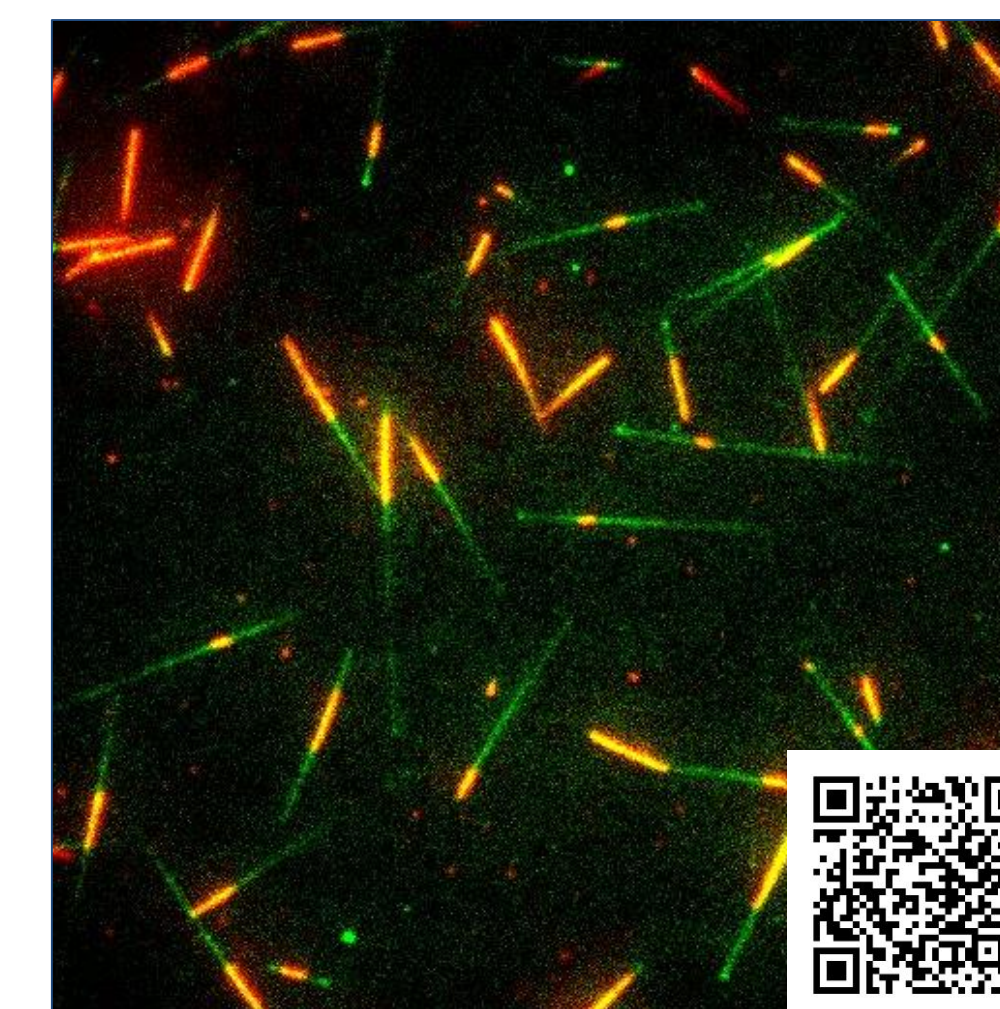
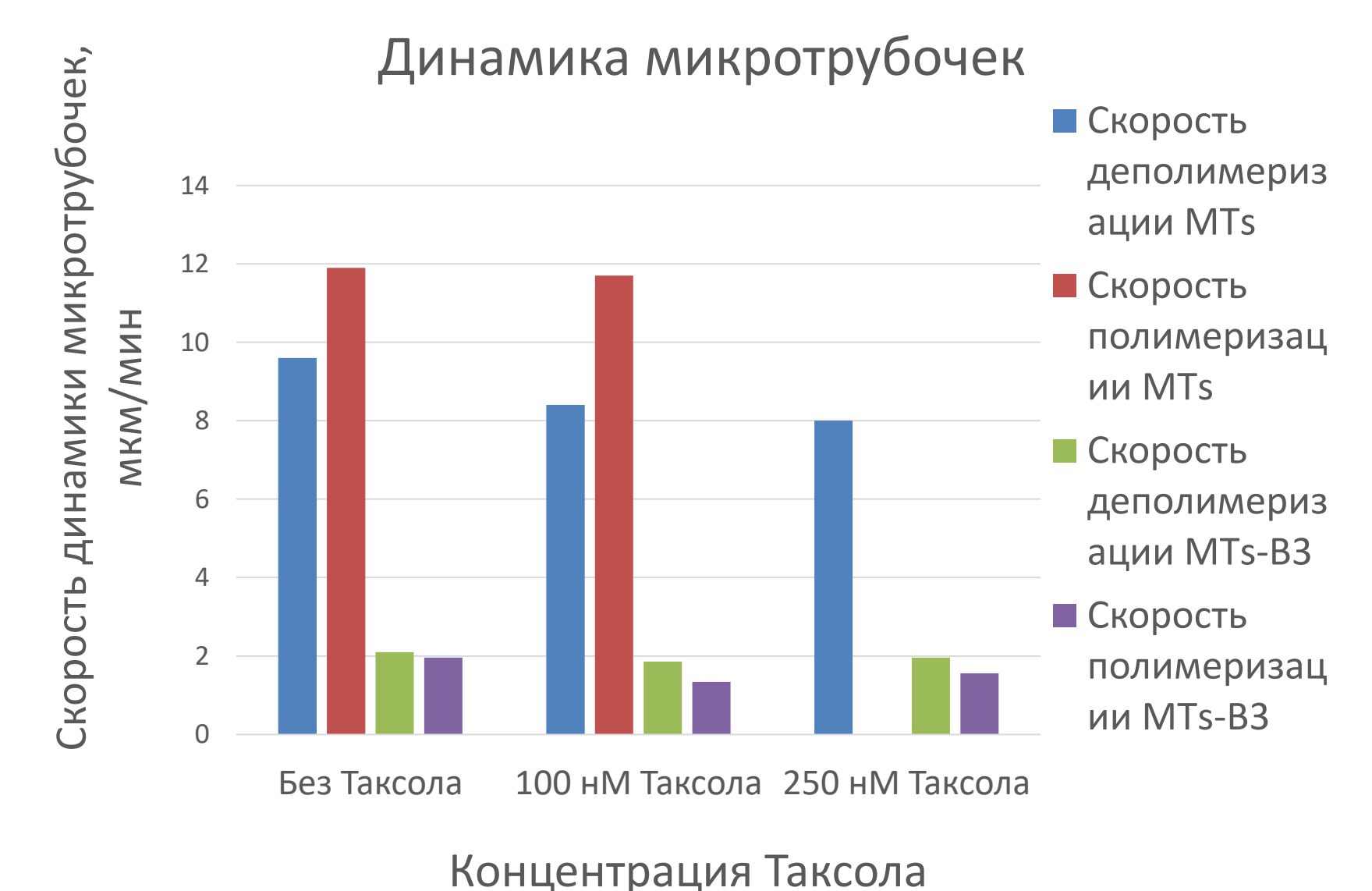
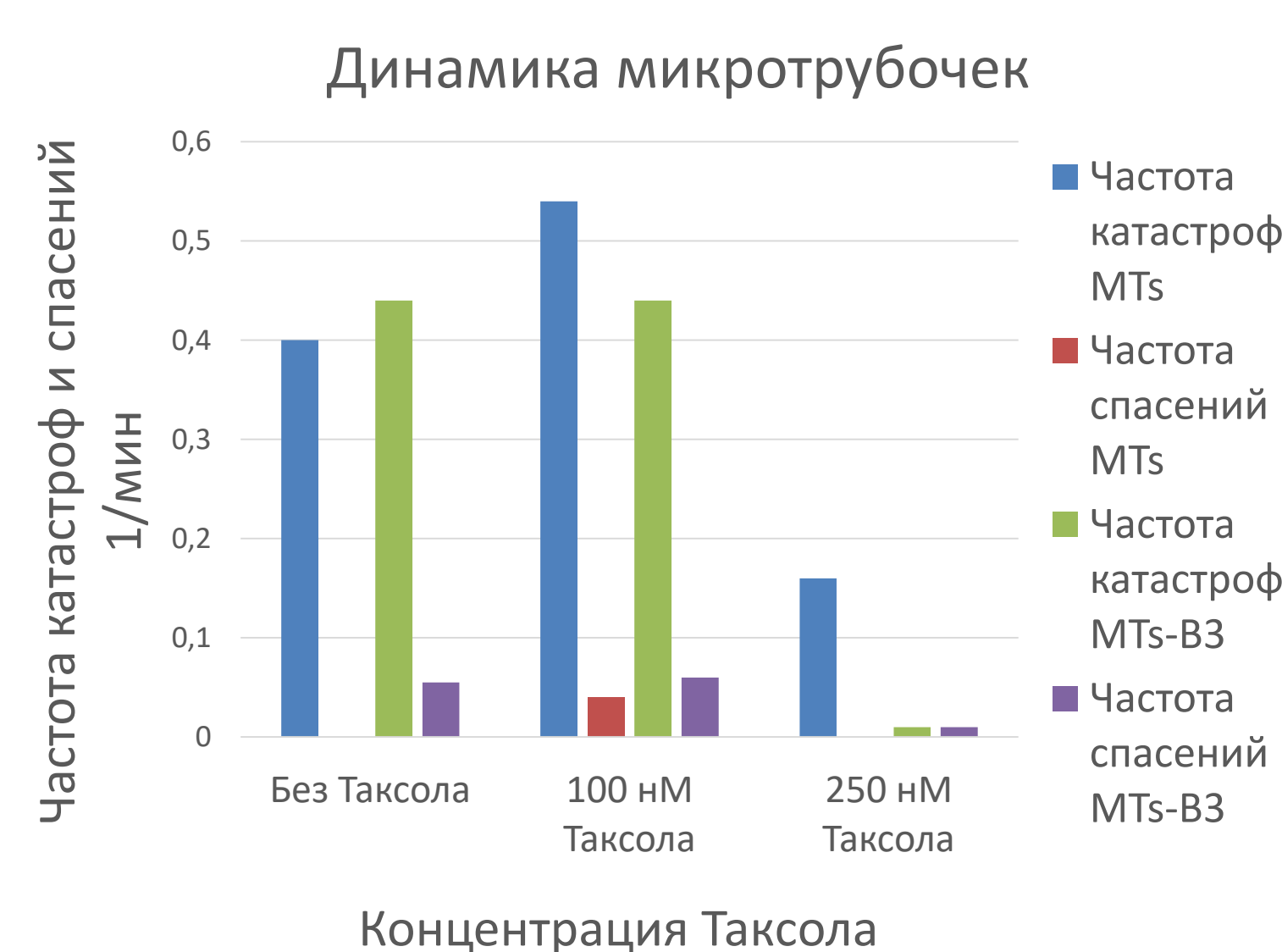
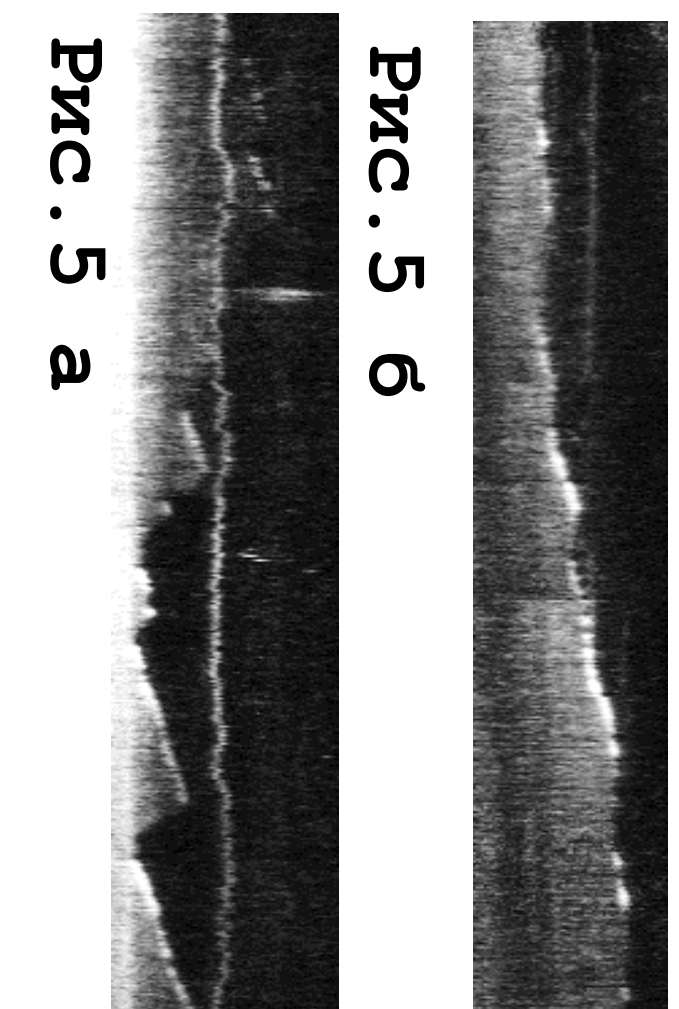


Рис. 4



Выводы

- $\beta 3$ -изоформа тубулина связана со скоростью полимеризации и деполимеризации.
- Таксол не оказывает существенного влияния на скорость, но влияет на частоту катастроф и спасений микротрубочек.
- $\beta 3$ -изоформа тубулина напрямую влияет на стабильность микротрубочек, в образце без этой изоформы отсутствуют катастрофы и спасения.