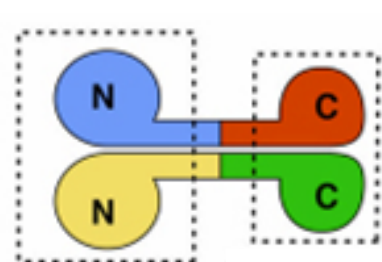




Поиск ингибиторов NDC80 для противоопухолевой терапии

Введение

Сейчас для химиотерапии рака чаще всего используются вещества, связывающиеся с микротрубочками и подавляющие их динамику. Это вызывает сильные побочные эффекты, так как перестройка микротрубочек нужна не только для деления клеток, но и, например, для работы нейронов. Чтобы избежать данных побочных эффектов, мы предлагаем блокировать не динамику микротрубочек, а только их взаимодействие с хромосомами при делении клеток. За это отвечает кинетохорный белковый комплекс NDC80, состоящий из четырех субъединиц: Ndc80, Nuf2, Spc24, Spc25.



■ Ndc80 (642 aa)
■ Nuf2 (464 aa)
■ Spc25 (224 aa)
■ Spc 24 (197 aa) Ciferri et al., Cell 2008

Методом молекулярного докинга было проверено около 60 тысяч веществ из базы Национального института рака США. Из них было отобрано 40, которые, согласно расчетам, должны связываться с NDC80 в месте его соединения с микротрубочкой.

Цель

Экспериментальная проверка способности некоторых отобранных нами веществ блокировать взаимодействие NDC80 и микротрубочек.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить рекомбинантный комплекс NDC80-GFP из клеток *E.coli*.
2. Методом TIRF-микроскопии проверить связывание с микротрубочкой в присутствии и отсутствии ингибиторов.

Методы и материалы

Получение NDC80

- Трансформировали *E. coli* плазмидой, содержащей гены химерного белка NDC80-GFP-6His (далее - целевой) под контролем промотора Lac - оперона и ген устойчивости к антибиотику.
- Выращивали бактерий в жидкой среде с антибиотиком для отбора трансформированных бактерий и с IPTG для экспрессии целевых белков.
- Лизировали бактерий и выделили смесь растворимых белков.
- Выделили целевые белки с помощью аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой.

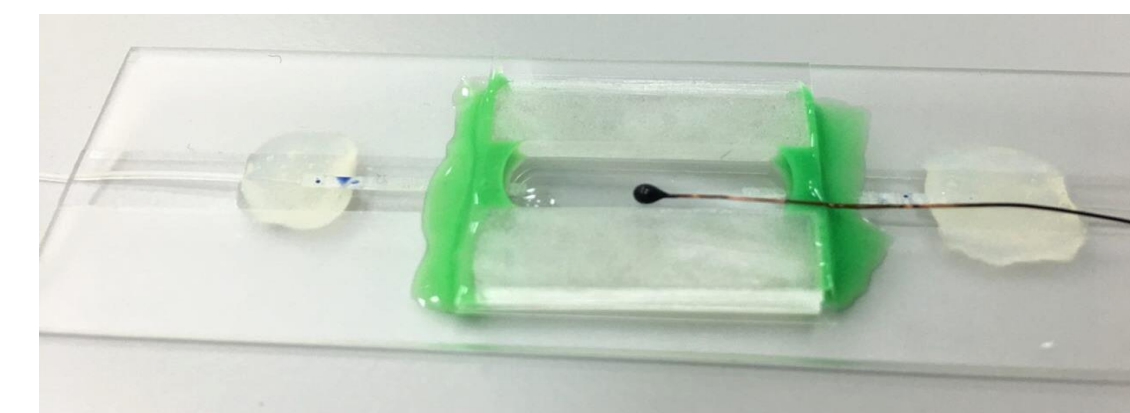


Аффинная хроматография

- Определили содержание целевых белков в полученных фракциях с помощью спектрофотометрии на длинах волн 280 нм (соответствует ароматическим аминокислотам) и 488 нм (соответствует GFP).
- Определили чистоту полученных целевых белков с помощью денатурирующего белкового гель-электрофореза (SDS-PAGE)

Изучение влияния потенциальных ингибиторов на связывание NDC80 с микротрубочками

- Собрали камеры проточной микроскопии. Камера имеет тонкую прямоугольную полость и трубочки для оттока и притока жидкости. Покровное стекло покрыто слоем гидрофобного вещества.



Проточная камера

- Подготовили камеры для микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF). Для этого инкубировали камеры сначала с раствором антител к микротрубочкам, затем с блокатором для защиты участков, на которые не сели антитела. После этого подали в камеру буфер с микротрубочками, которые сели на антитела.
- Для каждого из пяти потенциальных ингибиторов провели эксперимент:
 - Камеру промывали буфером для съемки, после чего в камеру подавали раствор белка NDC80-GFP. Фиксировали яркость микротрубочек. Чем ярче - тем больше белка связалось с микротрубочками.
 - Снова промывали камеру, и в нее снова подавали раствор белка NDC80-GFP, но с добавлением раствора исследуемого вещества. Фиксировали яркость микротрубочек.
 - Полученные фотографии обрабатывали в программе Fiji ImageJ. На основании сравнения средней яркости микротрубочек с ингибитором и без него сделали вывод о влиянии ингибитора на связывание NDC80 с микротрубочками

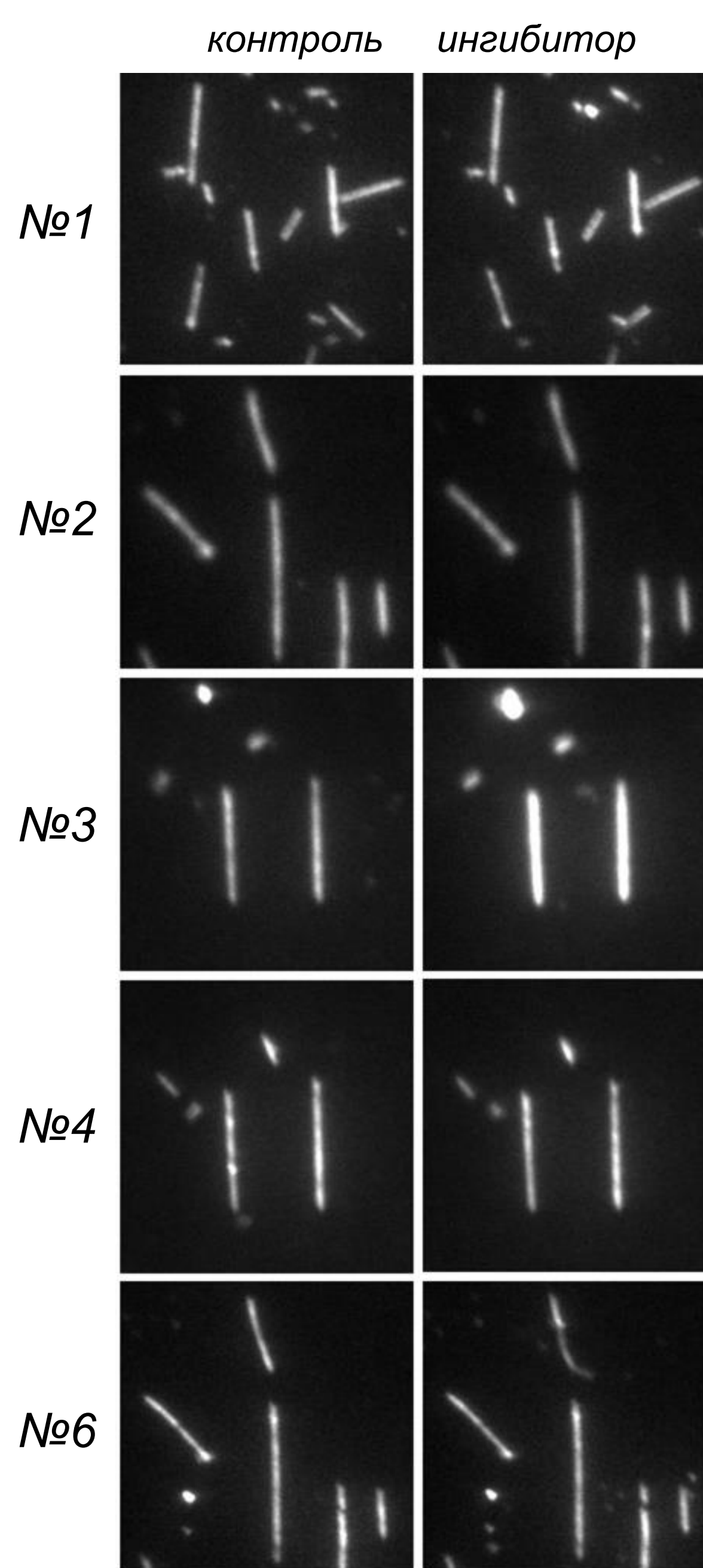
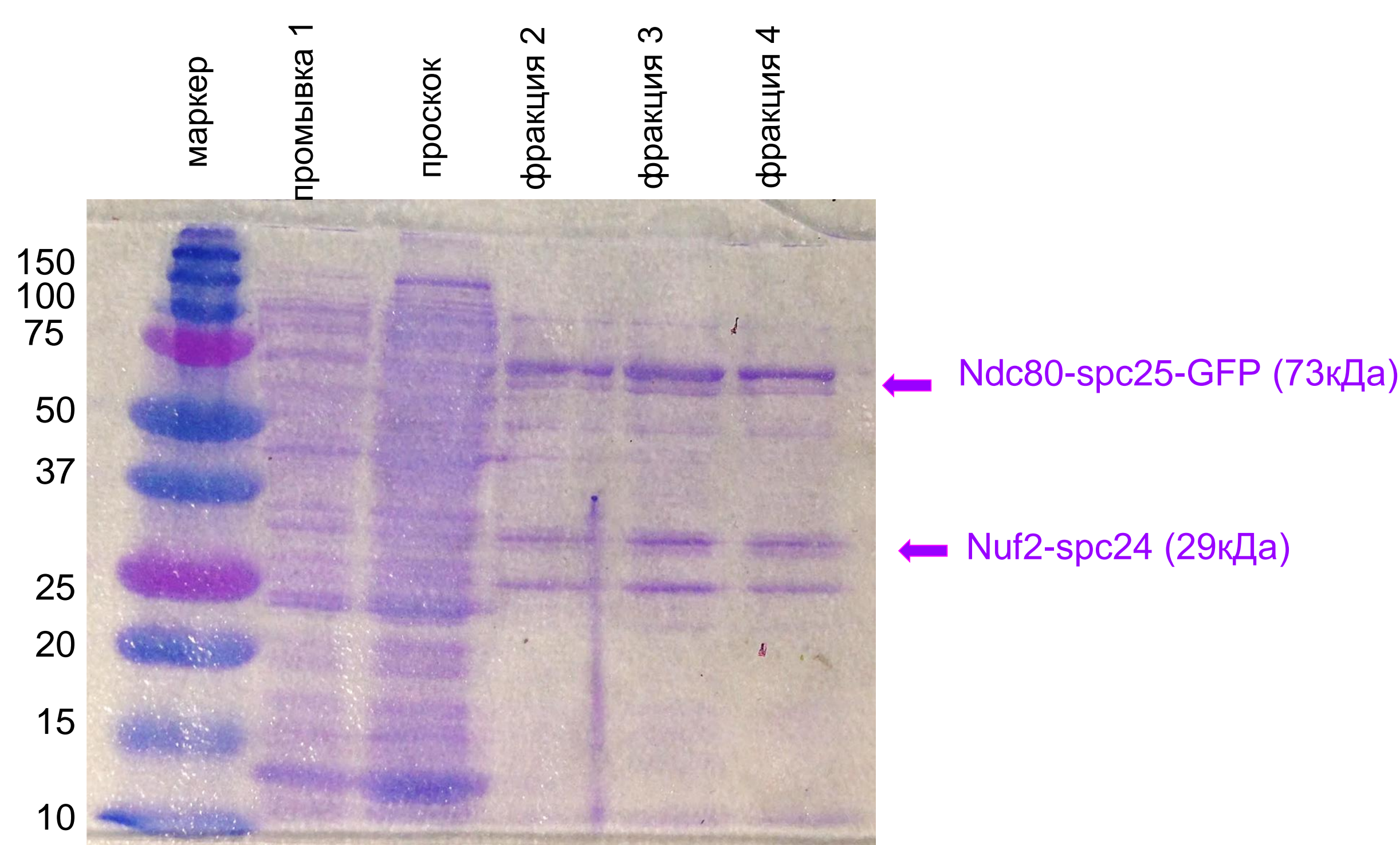
Результаты

1. Выделили белок NDC80-GFP из клеток *E.Coli*.

2. Определили концентрацию белков в пробе методом спектрофотометрии по формуле: $C=A/LE$, где: C-концентрация белков, L-путь луча в кювете (L=1 см), E-коэффициент экстинкции ($E_{280}=95285 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $E_{488}=44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), A-поглощение. Для белка третьей фракции $A_{280}=0.087$, $A_{488}=0.021$, что соответствует концентрации $c = 1.14 \text{ мкМ}$

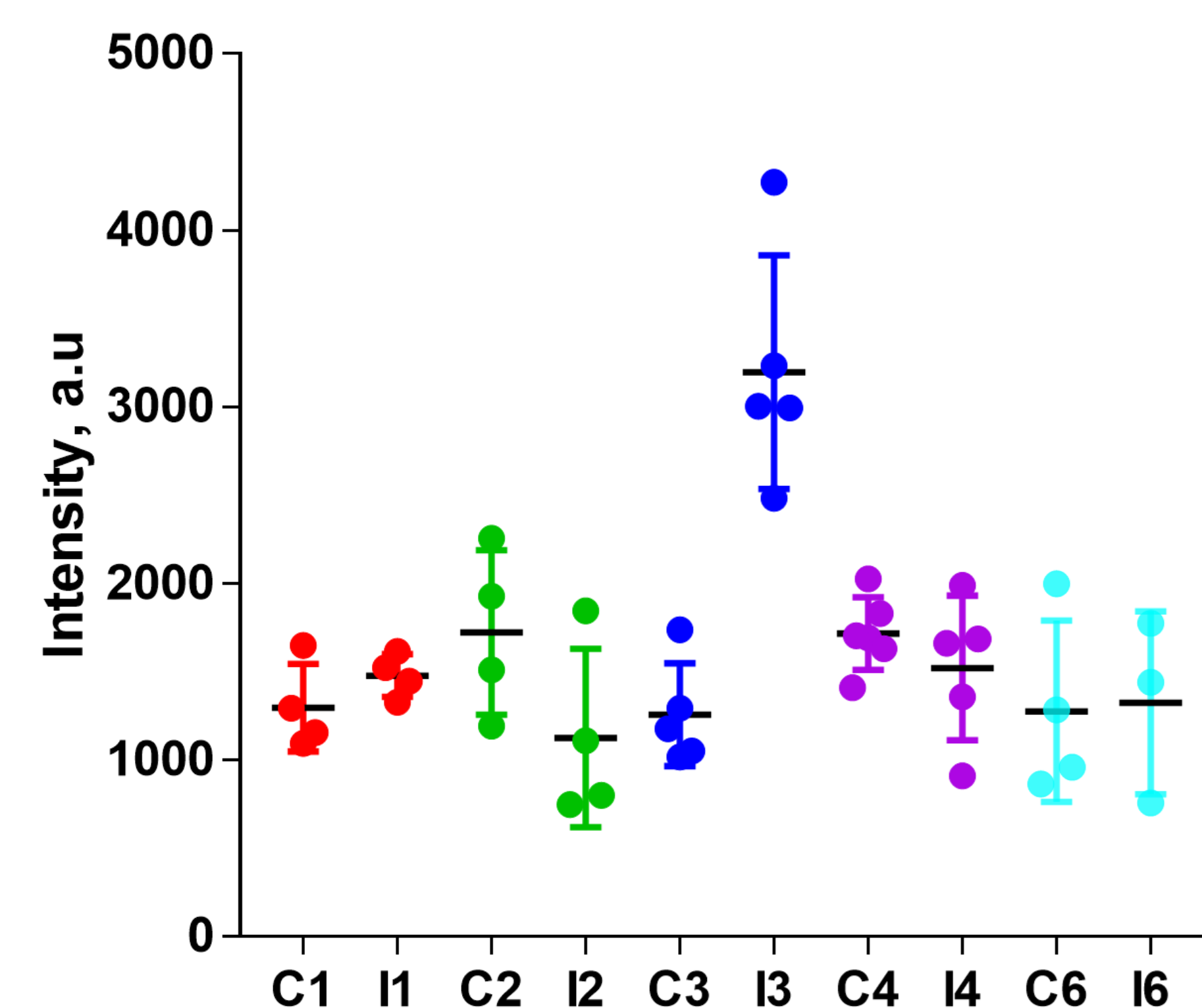


3. Исследовали полученные фракции методом электрофореза (молекулярная масса субъединиц целевого белка 73 и 29 кДа)



4. С помощью TIRF-микроскопии проверили 5 ингибиторов из топ-40 веществ-кандидатов базы NCI, предсказанных докингом.

5. Количественно обработали сигналы интенсивности свечения NDC80-GFP на микротрубочках в присутствии и отсутствии ингибиторов.



Выводы

1. Вещества под номерами 1, 2, 4 и 6 не показали достоверного влияния на связывание микротрубочек и NDC80.
2. Вещество номер 3 либо усиливает связывание микротрубочек и NDC80, либо иным образом с ними взаимодействует. Его свойства требуют более подробного изучения.
3. Возможно, на основе вещества номер 3 может быть создано средство химиотерапии рака более безопасное, чем традиционные.

