

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



На правах рукописи

ПОПОВА ЮЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**РОЛЬ БЕЛКОВ EB1, MARS, NON3, MEI-38 И MAST
В КИНЕТОХОР-ЗАВИСИМОМ ФОРМИРОВАНИИ
МИКРОТРУБОЧЕК ВЕРЕТЕНА ДЕЛЕНИЯ
В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК S2
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

1.5.22. – клеточная биология

(биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Андреева Евгения Николаевна

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Клеточный цикл.....	16
1.2. Митоз	17
1.2.1. Формирование митотического веретена деления	20
1.2.2. Регуляция динамики микротрубочек	22
1.2.3. Регуляция длины митотического веретена деления	26
1.2.4. Структура и функции кинетохора	29
1.3. Белки, участвующие в сборке веретена деления.....	32
1.3.1. Белок Eб1.....	32
1.3.2. Белок Mars.....	35
1.3.3. Белок Non3	36
1.3.4. Белок Mei-38	38
1.3.5. Белок Mast.....	40
1.4. Методы деполимеризации микротрубочек.....	42
1.5. Культивируемые клеточные линии <i>D. melanogaster</i>	45
1.6. Заключение.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
2.1. Материалы.....	49
2.2. Методы	49
2.2.1. Молекулярно-биологические методы	49
2.2.1.1. Амплификация ДНК при помощи ПЦР	49
2.2.1.2. Электрофорез в агарозном геле	50
2.2.1.3. Выделение ДНК из агарозного геля.....	51
2.2.1.4. Лигирование фрагментов ДНК.....	51
2.2.1.5. Очистка лигазной смеси осаждением этанолом	51
2.2.1.6. Электрокомпетентные клетки <i>E. coli</i>	52

2.2.1.7. Трансформация электрокомпетентных клеток <i>E. coli</i>	52
2.2.1.8. ПЦР-проверка трансформированных клеток <i>E. coli</i>	53
2.2.1.9. Выделение плазмидной ДНК.....	53
2.2.1.10. Определение нуклеотидной последовательности ДНК (по Сэнгеру)	53
2.2.1.11. Синтез дцРНК.....	54
2.2.1.12. Очистка дцРНК перед проведением РНК-интерференции.....	55
2.2.1.13. Выделение тотальной РНК.....	55
2.2.1.14. Обратная транскрипция.....	55
2.2.1.15. Количественная ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.....	56
2.2.2. Биохимические методы	57
2.2.2.1. Приготовление белковых лизатов из клеток S2 <i>D. melanogaster</i> после процедуры РНК-интерференции.....	57
2.2.2.2. Электрофорез и Вестерн-блоттинг.....	58
2.2.3. Методы работы с клеточными культурами	59
2.2.3.1. Культивирование клеточных линий S2 <i>D. melanogaster</i>	59
2.2.3.2. РНК-интерференция	60
2.2.3.3. Индукция экспрессии трансгенов в культивируемых клетках S2 <i>D. melanogaster</i>	60
2.2.3.4. Деполимеризация микротрубочек коллемеидом либо холодом.....	61
2.2.3.5. Приготовление цитологических препаратов.....	62
2.2.3.5.1. Приготовление цитологических препаратов после коллемеидной обработки.....	62
2.2.3.5.2. Приготовление цитологических препаратов после холодной обработки	65
2.2.4. Микроскопия	65
2.2.4.1. Флуоресцентная микроскопия	65
2.2.4.2. Конфокальная микроскопия.....	65
2.2.5. Измерения количественных параметров клеток на основе их микрофотографий.....	66
2.2.5.1. Измерение размера полюсных микротрубочек после холодной обработки	66
2.2.5.2. Измерение длины веретена деления	66

2.2.5.3. Измерение интенсивности флуоресценции тубулина	67
2.2.6. Статистическая обработка данных	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	68
3.1. Подбор условий проведения колцевидной или холодной обработки клеток <i>S2 D. melanogaster</i>	68
3.1.1. Повторный рост микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров после колцевидной обработки клеток <i>S2 D. melanogaster</i>	68
3.1.2. Повторный рост микротрубочек после холодной обработки клеток <i>S2 D. melanogaster</i>	70
3.2. Исследование роли белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек веретена деления в культуре клеток <i>S2 D. melanogaster</i>	73
3.2.1. РНК-интерференция генов, кодирующих исследуемые белки, в клетках <i>S2 D. melanogaster</i>	73
3.2.1.1. Оценка эффективности процедуры РНК-интерференции	74
3.2.1.2. Митотические фенотипы, наблюдаемые после РНК-интерференции генов, кодирующих исследуемые белки, в клетках <i>S2 D. melanogaster</i>	75
3.2.2. Локализация eGFP-меченых белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в культуре клеток <i>S2 D. melanogaster</i>	83
3.2.3. Роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек после колцевидной обработки клеток <i>S2 D. melanogaster</i>	89
3.2.4. Локализация белков Eb1-eGFP, Mars-eGFP, Mei-38-eGFP и Mast-eGFP при повторном росте микротрубочек после колцевидной обработки трансгенных линий клеток <i>S2 D. melanogaster</i>	93
3.2.5. Роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек после холодной обработки клеток <i>S2 D. melanogaster</i>	96
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	101
4.1. Деполимеризация микротрубочек веретена деления	101

4.2. Роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек веретена деления в культуре клеток S2 <i>D. melanogaster</i>	102
4.3. Модель кинетохор-зависимого формирования микротрубочек веретена деления ..	109
ВЫВОДЫ	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- а.о. – аминокислотный остаток
- ВД – веретено деления
- гДНК – геномная ДНК
- ГДФ – гуанозиндифосфат
- ГТФ – гуанозинтрифосфат
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- дцРНК – двухцепочечная РНК
- е.а. – единица активности
- кДа – килодальтон
- кДНК – комплементарная ДНК
- КСС – контрольная система сборки (веретена деления)
- МТ – микротрубочка(и)
- о.е. – относительные единицы
- ПАТ – псевдо-ана-телофаза
- п.н. – пар(а) нуклеотидов
- ПРМТ – повторный рост микротрубочек
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РНК-и – РНК-интерференция
- УФ – ультрафиолетовое (излучение)
- ЦКП – центр коллективного пользования (ИМКБ СО РАН)
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- BSA (bovine serum albumin) – белок плазмы крови крупного рогатого скота
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4,6-диамидино-2-фенилиндол
- dNTP (deoxynucleoside triphosphate) – дезоксинуклеозидтрифосфат
- eGFP (enhanced green fluorescent protein) – усиленный зеленый флуоресцентный белок
- FBS (fetal bovine serum) – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота
- GST (glutathione S-transferase) – глутатион-S-трансфераза

MAP (microtubule-associated proteins) – белки, взаимодействующие с микротрубочками

MTOC (microtubule organization center) – центр организации микротрубочек

NLS (nuclear localization signal) – сигнал ядерной локализации

PBS (phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер

SDS (sodium dodecyl sulfate) – додецилсульфат натрия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Клеточное деление – естественный процесс, необходимый для увеличения числа клеток (рост тканей), поддержания гомеостаза и полового размножения (передача наследственной информации). Митоз – основной способ деления соматических клеток эукариот, обеспечивающий точную передачу генетической информации. Точность протекания данного процесса крайне важна для нормального развития многоклеточных организмов. Нарушения в расхождении хромосом во время митоза приводят к онкологическим заболеваниям и врожденным дефектам.

Веретено деления (ВД) представляет собой высокодинамичную клеточную структуру, которая обеспечивает правильную сегрегацию хромосом как во время митоза, так и во время мейоза. ВД состоит преимущественно из микротрубочек (МТ), растущих как от centrosом (в случае их наличия), так и от хромосом и/или кинетохоров. В клетках, содержащих centrosомы, формирование МТ происходит на centrosомах, рядом с хромосомами и/или кинетохорами и внутри ВД посредством кольцевого комплекса γ -тубулина (γ -TuRC; γ -tubulin ring complex), который встроен в centrosомы, обогащен вблизи кинетохор и связан с МТ ВД за счет взаимодействия с белковым комплексом augmin. Исследования, проведенные на культивируемых клетках млекопитающих и на различных типах соматических клеток дрозофилы, показали, что образование МТ только от хромосом и/или кинетохоров является достаточным для сборки функционального ВД. Однако на сегодняшний день знания о факторах, регулирующих данный процесс, ограничены и фрагментарны.

Существуют две основные сложности при изучении процесса кинетохор-зависимого формирования МТ в клетках: во-первых, данный процесс в норме протекает очень быстро; во-вторых, формирование МТ от centrosом и кинетохоров происходит почти одновременно. Для решения этих проблем используются различные подходы, позволяющие замедлить скорость данного процесса, физически разделить повторный рост МТ от centrosом и от хромосом и/или кинетохоров либо визуализировать их по отдельности. В настоящее время используется три основных подхода для изучения кинетохор-зависимого формирования МТ. Первым является прижизненное изучение формирования кинетохорных МТ (к-волокон) в centrosом-

содержащих клетках, экспрессирующих GFP-меченый тубулин. Вторым методом является использование клеточных моделей, лишенных функциональных centrosом, такие как цитоплазматические экстракты зрелых ооцитов *Xenopus laevis*, или клетки, дефектные по наиболее важным centrosомным белкам, необходимым для формирования МТ. Третий способ заключается в анализе повторного роста МТ ВД после деполимеризации МТ, вызванной обработкой клеток митостатиками (колцемидом, нокодазолом и т. д.) либо холодной обработкой.

В настоящей работе исследование кинетохор-зависимого роста МТ проводилось на культуре клеток S2 *D. melanogaster*. Использование метода РНК-интерференции (РНК-и) клеток S2 дрозофилы в исследованиях митоза имеет ряд преимуществ по сравнению с клетками млекопитающих. Во-первых, процедура РНК-и в клетках S2 дрозофилы очень проста, ее можно проводить путем обработки клеток двуцепочечными РНК (дцРНК) большого размера (400–800 п.н.) без использования трансфекционных агентов. Во-вторых, клетки S2 дрозофилы имеют очень «удобную» морфологию для визуализации ВД и хромосом как в фиксированных, так и в живых клетках. В-третьих, геном дрозофилы полностью секвенирован и хорошо аннотирован, а гены, контролирующие митоз, эволюционно высококонсервативны, что позволяет экстраполировать полученные в клетках S2 дрозофилы результаты РНК-и исследуемых генов на клетки млекопитающих. Ранее с помощью метода РНК и в клетках S2 дрозофилы был идентифицирован ряд консервативных белков, которые влияют на морфологию ВД.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является исследование участия белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в процессе кинетохор-зависимого формирования микротрубочек веретена деления в культивируемых клетках S2 *Drosophila melanogaster*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить характер повторного роста микротрубочек после их деполимеризации, вызванной обработкой колцемидом либо низкой температурой, в культивируемых клетках S2 дрозофилы.
2. Определить роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом росте микротрубочек после их деполимеризации, вызванной

обработкой колцемидом либо низкой температурой, в культивируемых клетках S2 дрософилы.

3. Установить внутриклеточную локализацию гибридных флуоресцентных белков Eb1-eGFP, Mars-eGFP, Non3-eGFP, Mei-38-eGFP и Mast-eGFP при деполимеризации микротрубочек веретена деления и в процессе повторного роста микротрубочек после колцемидной обработки соответствующих трансгенных линий клеток S2 дрософилы.

Научная новизна работы

В работе впервые изучено влияние использования различных отрицательных температур (0, -1 или -2°C) или колцемидной обработки, которые используются для деполимеризации МТ, на характер повторного роста МТ в клетках S2 дрософилы. Использование холодной (0°C) либо колцемидной обработки совместно с процедурой РНК-и генов, кодирующих исследуемые белки Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast, позволило впервые провести детальные исследования влияния данных белков на повторный рост МТ. Впервые показано, что РНК-и гена *mast*, *mei-38* или *mars* снижает динамику повторного роста МТ от хромосом и/или кинетохоров как после колцемидной, так и после холодной (0°C) обработок по сравнению с контролем, а также влияет на характер данного процесса. РНК-и гена *Eb1* снижает динамику кинетохор-зависимого повторного роста МТ и влияет на характер данного процесса только после колцемидной обработки. Снижение количества белка Non3 практически не влияет на динамику повторного роста МТ как после колцемидной, так и после холодной обработок. Впервые продемонстрирована локализация гибридных флуоресцентных белков Eb1-eGFP, Mars-eGFP, Mei-38-eGFP и Mast eGFP при полной деполимеризации МТ и в процессе восстановления ВД после колцемидной обработки соответствующих трансгенных линий клеток S2 дрософилы.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Результаты данной работы способствуют расширению фундаментальных знаний о формировании микротрубочек и веретена деления в процессе митоза на модели культивируемых клеток S2 дрософилы. Материалы работы могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических факультетов.

Практическая значимость данной научной работы заключается в подробном описании процедуры и результатов проведения холодной и колцемидной обработок клеток S2 дрозофилы для деполимеризации микротрубочек. Данные методы могут быть использованы при дальнейшем изучении молекулярных механизмов формирования веретена деления.

Положения, выносимые на защиту

На защиту выносятся следующие положения:

1. Реализация кинетохор- либо центросом-зависимого механизма повторной сборки веретена деления в клетках S2 дрозофилы определяется способом деполимеризации микротрубочек.
2. Корректная сборка и стабильность кинетохорных микротрубочек веретена деления в клетках S2 дрозофилы обеспечивается экспрессией генов, кодирующих белки Mast, Mars, Mei-38, но практически не зависит от белка Non3.

Апробация работы

Основные материалы данной работы были представлены на: международной конференции «Chromosome 2015», 24–28 августа 2015 г., Новосибирск, Россия; VIII всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015», 5–9 октября 2015 г., Новосибирск, Россия; II международной научной конференции «Наука будущего – наука молодых», 20–23 сентября 2016 г., Казань, Россия; V съезде биохимиков России, 4–8 октября 2016 г., Сочи, Россия; международной мини-конференции «Chromosomes and Mitosis 2016», 25 ноября 2016 г., Новосибирск, Россия; международной конференции «Chromosome 2018», 20–24 августа 2018 г., Новосибирск, Россия; 11th International conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology «BGRS\SB-2018», 20–25 августа 2018 г., Новосибирск, Россия; VI съезде биохимиков России, 1–6 октября 2019 г., Сочи, Россия.

Публикации

По результатам работы опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. Pavlova G.A., Galimova J.A., **Popova J.V.**, Munzarova A.F., Razuvaeva A.V., Alekseeva A.L., Berkaeva M.B., Pindyurin A.V., Somma M.P., Gatti M., Renda F. Factors governing the pattern of spindle microtubule regrowth after tubulin depolymerization // *Цитология*. – 2016. – V. 58. – № 4. – P. 299–303.
2. Andreyeva E.N., Ogienko A.A., Yushkova A.A., **Popova J.V.**, Pavlova G.A., Kozhevnikova E.N., Ivankin A.V., Gatti M., Pindyurin A.V. *Non3* is an essential *Drosophila* gene required for proper nucleolus assembly // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2019. – V. 23. – № 2. – P. 190–198.
3. Somma M.P., Andreyeva E.N., Pavlova G.A., Pellacani C., Bucciarelli E., **Popova J.V.**, Bonaccorsi S., Pindyurin A.V., Gatti M. Moonlighting in mitosis: analysis of the mitotic functions of transcription and splicing factors // *Cells*. – 2020. – V. 9. – № 6. – P. 1554–1581.
4. **Popova J.V.**, Pavlova G.A., Razuvaeva A.V., Yarinich L.A., Andreyeva E.N., Anders A.F., Galimova Y.A., Renda F., Somma M.P., Pindyurin A.V., Gatti M. Genetic control of kinetochore-driven microtubule growth in *Drosophila* mitosis // *Cells*. – 2022. – V. 11. – № 14. – P. 2127.

Материалы конференций:

1. **Popova J.V.**, Razuvaeva A.V., Munzarova A.F., Pavlova G.A., Pindyurin A.V., Gatti M. Dissection of the mechanisms underlying kinetochore-driven microtubule growth: analysis of the roles of Eb1, Mast/Orbit, Mars/Hurp and Mei-38/Tpx2 // *Материалы международной конференции «Chromosome 2015»*. – 2015. – с. 43.
2. **Попова Ю.В.**, Разуваева А.В., Мунзарова А.Ф., Павлова Г.А. Исследование механизмов, лежащих в основе кинетохор-зависимого роста микротрубочек у *Drosophila melanogaster*: анализ роли белков Eb1, Mast, Mars и Mei-38 // *Сборник материалов VIII Всероссийского с международным участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015»*. – 2015. – с. 113.
3. **Popova J.V.**, Pavlova G.A., Munzarova A.F., Renda F., Somma M.P., Pindyurin A.V., Gatti M. Genetic control of kinetochore-driven microtubule growth: An RNAi-based analysis in *Drosophila* S2 cells // *Сборник тезисов II международной научной конференции «Наука будущего – наука молодых»*. – 2016. – с. 274.

4. **Попова Ю.В.**, Павлова Г.А., Мунзарова А.Ф., Разуваева А.В., Ренда Ф., Сомма М.П., Пиндюрин А.В., Гатти М. Исследование генетического контроля кинетохор-зависимого роста микротрубочек в культуре клеток S2 *Drosophila melanogaster* при помощи РНК-интерференции // Научные труды V Съезда Биохимиков России. – 2016. – с. 71.
5. Павлова Г.А., **Попова Ю.В.**, Мунзарова А.Ф., Галимова Ю.А., Разуваева А.В., Ренда Ф., Сомма М.П., Пиндюрин А.В., Гатти М. Факторы, обуславливающие характер повторного роста микротрубочек веретена деления после деполимеризации тубулина у *Drosophila melanogaster* // Научные труды V Съезда биохимиков России. – 2016. – с. 70.
6. **Popova J.V.**, Pavlova G.A., Munzarova A.F., Razuvaeva A.V., Renda F., Somma M.P., Pindyurin A.V., Gatti M. Role of Eb1, Mars, Mast and Mei-38 proteins in kinetochore-driven microtubule growth in *Drosophila* S2 cells // Материалы международной мини-конференции «Chromosomes and Mitosis 2016». – 2016. – с. 9.
7. **Попова Ю.В.**, Павлова Г.А., Андреева Е.Н., Огиенко А.А., Юшкова А.А., Иванкин А.В., Кожевникова Е.Н., Пиндюрин А.В. Ранее неизвестные функции белка NON3 у *Drosophila melanogaster* // Материалы международной конференции «Chromosome 2018». – 2018. – с. 158.
8. **Popova J.**, Pavlova G., Andreyeva E., Ogienko A., Yushkova A., Ivankin A., Kozhevnikova E., Pindyurin A. The moonlighting functions of the NON3 protein in *Drosophila melanogaster* // Материалы 11-й Международной мультikonференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology «BGRS\SB-2018»). – 2018. – с. 223.
9. **Popova J.V.**, Pavlova G.A., Ogienko A.A., Andreyeva E.N., Yushkova A.A., Pindyurin A.V. Towards understanding the role of nucleolar NON3 protein in *Drosophila* mitosis // Научные труды VI Съезда Биохимиков России. – 2019. – с. 99.

Вклад автора

Автором самостоятельно выполнены следующие этапы настоящей работы: молекулярно-биологические методы (синтез двуцепочечных РНК (дцРНК), специфичных к исследуемым генам; количественная ПЦР в режиме реального

времени); методы работы с клеточными культурами (проведение процедуры РНК-и; индукция трансгенных линий клеток; деполимеризация микротрубочек низкими температурами либо колцемидом); цитологические методы (приготовление цитологических препаратов с их последующим непрямым иммуноокрашиванием и флуоресцентной либо конфокальной микроскопией). Конфокальная микроскопия и прижизненные съемки были проведены автором совместно с Андреевой Е.Н и Разуваевой А.В. Трансгенные клеточные линии были получены Яринич Л.А. Полуколичественная оценка экспрессии целевых белков методом Вестерн-блот анализа была проведена совместно с Андреевой Е.Н. Подготовка публикаций осуществлялась автором совместно с Гатти М., Пиндюриным А.В., Павловой Г.А, Андреевой Е.Н., Сомма М.П.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора научной литературы, описания использованных материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 252 наименований. Работа изложена на 135 страницах, содержит 28 рисунков, 13 таблиц.

Благодарности

Автор выражает большую благодарность руководителю проекта «Механизмы кинетохор-зависимого образования микротрубочек у *Drosophila*» (поддержанного в 2014–2016 гг. грантом Правительства РФ), профессору Маурицио Гатти (университет La Sapienza, Рим, Италия) за консультирование в фундаментальных научных вопросах. Автор выражает благодарность Алексею Валерьевичу Пиндюрину за научную консультацию при выполнении всех этапов настоящего исследования. Автор также признателен российским и зарубежным коллегам, в частности: Гере Алексеевне Павловой за помощь в области клеточных работ; Любови Александровне Яринич за получение трансгенных клеточных линий; Евгении Николаевне Андреевой за помощь в проведении прижизненных съемок интересующих образцов; Марии Патриции Сомма за помощь в подготовке публикаций; Алене Викторовне Разуваевой, АLINE Фирдинантовне Андерс (Мунзаровой) и Юлии Александровне Галимовой за помощь в постановке

экспериментов. Автор благодарит всех сотрудников лаборатории клеточного деления ИМКБ СО РАН за дружескую поддержку на всех этапах подготовки и выполнения данного исследования. Благодарность за неустанную моральную поддержку автор выражает своей семье и друзьям.

Работа выполнена в лаборатории клеточного деления ИМКБ СО РАН при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых (№ 14.Z50.31.0005) и гранта РФФИ (№ 18-34-00699 мол_а).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Клеточный цикл

Клеточный цикл – последовательность строго скоординированных по времени процессов, которые предшествуют последующему делению или гибели клетки. Эукариотический клеточный цикл подразделяют на четыре фазы: G_1 , S и G_2 (обобщенно называемые интерфазой) и M (митоз). Фаза митоза состоит из двух тесно связанных между собой процессов – конденсации и сегрегации хромосом и цитокинеза (процесса разделения цитоплазмы и органелл между двумя дочерними клетками) (подробнее митоз описан ниже). После деления каждая из дочерних клеток вступает в интерфазу и может начать новый цикл деления. Хотя различные стадии интерфазы обычно не являются морфологически различимыми, каждая ее фаза имеет отдельный набор специализированных биохимических процессов, которые готовят клетку к иницированию клеточного деления (Lodish et al., 2008).

После митоза, как правило, клетка вступает в G_1 -фазу (от англ. gap – промежуток; ее также называют фазой роста) интерфазы. На этом этапе биосинтетическая активность клетки, которая значительно замедлилась в ходе предшествующей M-фазы, возобновляется с высокой скоростью. В G_1 -фазе клетка увеличивается в размерах, происходит синтез мРНК и белков, увеличивается количество органелл (таких как митохондрии, рибосомы). При этом на протяжении всей G_1 -фазы клетка остается диплоидной (содержит двойной набор хромосом, специфический для конкретного вида), то есть в G_1 -фазе клетка еще только готовится к репликации ДНК (которая происходит в S-фазе) (Lodish et al., 2008). G_1 -фаза имеет важное значение, так как во время этого периода клетка определяет свои возможные пути развития: 1) продолжать клеточный цикл и впоследствии вступить в S-фазу (переход между фазами контролируется с помощью G_1/S -контролирующей системы) или 2) вступить в G_0 -фазу (фазу покоя) (Morgan, 2007).

Последующая S-фаза начинается одновременно с началом репликации ДНК. После того, как этот процесс завершен, все хромосомы полностью реплицированы (то есть каждая хромосома удвоена и, соответственно, состоит из двух (сестринских) хроматид). Таким образом, количество ДНК в клетке на данном этапе увеличивается

вдвое, при этом ploидность клетки остается неизменной (Nelson et al., 2002). Помимо удвоения ДНК, во время данной клеточной фазы в большинстве случаев происходит удвоение каждой из центриолей (внутриклеточных органелл эукариотической клетки, принимающих участие в формировании ВД) в случае их наличия. Находящаяся в клетке центриоль дублируется по консервативному механизму и образует новую дочернюю. Однако в формировании МТ (на стадии профазы) участвует только материнская центриоль (Билич, Крыжановский, 2009). Еще одним немаловажным событием во время S-фазы является синтез РНК и белков, связанных с ДНК (в том числе гистонов), необходимых для включения в состав новых хроматид (Билич, Крыжановский, 2009).

G₂-фаза (также называемая премитотическая или постсинтетическая) является последней из трех фаз интерфазной стадии клеточного цикла, не очень продолжительной по времени. Во время данной фазы происходит подготовка клетки к митозу за счет синтеза необходимых белков, в том числе тубулина, необходимого для формирования ВД, увеличение энергетических запасов (деление митохондрий и хлоропластов (у растений)). Также во время данной фазы происходит проверка целостности и отсутствия ошибок репликации ДНК (Lodish et al., 2008).

Фаза G₀ является периодом клеточного цикла, во время которого клетки не делятся, находятся в состоянии покоя. Клетки многоклеточных эукариот входят в фазу G₀ из контрольной точки в фазе G₁ либо в фазе G₂ и могут оставаться в таком состоянии в течение длительных периодов времени, часто навсегда, при этом они продолжают выполнять свои функции (как это бывает в случае нейронов). Некоторые клетки постепенно входят в фазу G₀ и считаются постмитотическими, к примеру, некоторые клетки печени, почек, желудка. Многие клетки не входят в G₀ и продолжают делиться в течение всей жизни организма, как в случае эпителиальных клеток (Cooper, 2000).

1.2. Митоз

Митоз – процесс непрямого деления соматических клеток эукариот, обеспечивающий точную передачу генетической информации дочерним клеткам (Ganem et al., 2005). Правильное протекание и завершение митоза зависит от определенных последовательных событий, которые тонко скоординированы во

времени и пространстве. Традиционно выделяют пять стадий митоза: профазу, прометафазу, метафазу, анафазу и телофазу (Рисунок 1).

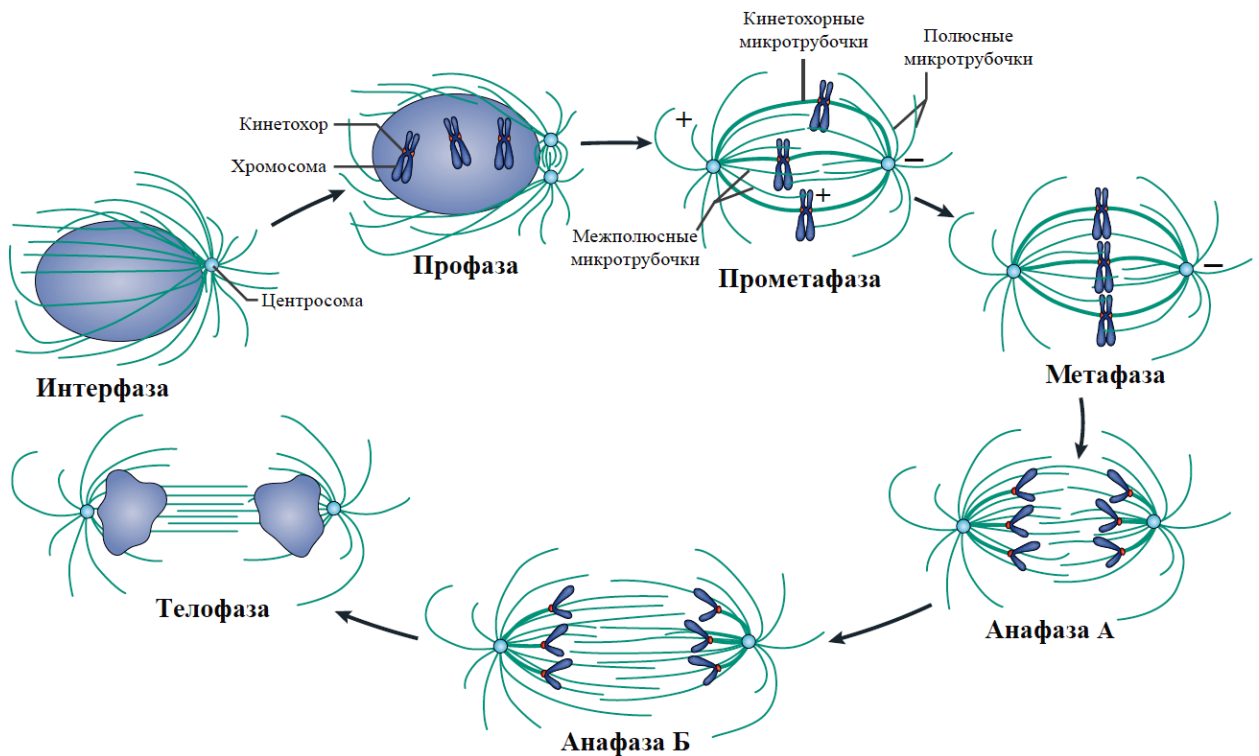


Рисунок 1. Стадии митоза (Walczak et al., 2010; с модификациями). Интерфаза – клетка готовится к будущему делению: происходит удвоение количества цитоплазмы, ДНК, клеточных белков и органелл. Профаза – хромосомы конденсируются и становятся различимыми, в цитоплазме начинает формироваться веретено деления. Прометафаза – ядерная оболочка распадается, микротрубочки веретена деления начинают взаимодействовать с хромосомами. Метафаза – хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости (на равном расстоянии от полюсов) веретена деления. Анафаза А – за счет деполимеризации плюс-концов кинетохорных микротрубочек происходит расхождение сестринских хроматид. Анафаза Б – сборка плюс-концов полюсных микротрубочек приводит к расхождению полюсов веретена деления. Телофаза – начинается деконденсация хромосом, вокруг сгруппированных хромосом возле каждого полюса деления формируется ядерная оболочка. Цитокинез (не показан на рисунке) – происходит распределение цитоплазмы и органелл материнской клетки между дочерними клетками. Plusом обозначен плюс-конец микротрубочек; минусом – минус-конец микротрубочек.

На стадии профазы происходит конденсация хромосом, каждая из которых состоит из двух сестринских хроматид. В конце профазы на центромерах (специфичных участках хромосом) формируется белковый комплекс, называемый кинетохором. Последующая стадия прометафазы начинается с распада ядерной оболочки, что позволяет полюсным (также называемых астральными) МТ взаимодействовать с конденсированными хромосомами и с МТ, растущими от кинетохоров. Это взаимодействие приводит к формированию кинетохорных МТ (также

называемые k-, кинетохорными или хромосомными волокнами), которые соединяют хромосомы с полюсами ВД (Gadde, Heald, 2004). Прикрепление кинетохоров сестринских хроматид к противоположным полюсам ВД посредством волокон МТ приводит к правильной ориентации хромосом, когда сестринские хроматиды ориентированы в направлении противоположных полюсов ВД. Начало выстраивания хромосом в экваториальной плоскости клетки является началом следующей стадии клеточного цикла – метафазы. Во время данной стадии клеточного деления в дополнение к кинетохорным МТ, правильная биполярная структура ВД обеспечивается и другими группами МТ, которые формируются от centrosom: межполюсными МТ, направленными к противоположным полюсам ВД и перекрывающимися в районе экватора ВД и полюсными МТ, которые направлены в сторону клеточного кортекса и могут взаимодействовать с ним (Gadde, Heald, 2004) (Рисунок 1).

После окончания выстраивания хромосом в экваториальной плоскости клетки (когда завершено обособление сестринских хроматид и их плечи расположены параллельно друг другу) начинается стадия анафазы, в которой сестринские хроматиды разделяются и двигаются в направлении противоположных полюсов ВД. Переход из стадии метафазы в стадию анафазы находится под строгим контролем и осуществляется при условии отсутствия нарушений в сборке ВД (Musacchio, 2011), а также при условии целостности ДНК и завершенности репликации. Выделяют два этапа анафазы – А и Б, которые отличаются механизмами, отвечающими за расхождение сестринских хроматид. В анафазе А хроматиды расходятся к полюсам за счет деполимеризации кинетохорных МТ на плюс-концах. Во время анафазы Б происходит расхождение самих полюсов ВД, что, в отличие от анафазы А, происходит за счет полимеризации плюс-концов полюсных МТ. Соответственно, в анафазе А участвуют моторные белки (белки, способные перемещаться по МТ, например, динеины и кинезины, использующие в качестве источника энергии АТФ (Kashina et al., 1996)), связанные с кинетохорами, а в анафазе Б – моторные белки, располагающиеся как на полюсах, так и в центре ВД. К концу анафазы сестринские хроматиды разделяются на две равные группы, расположенные в противоположных сторонах клетки. В телофазе, заключительной стадии митоза, ядерная оболочка собирается вокруг каждой группы хромосом с образованием двух дочерних ядер, внутри которых начинается деконденсация хромосом.

Как правило, окончание митоза совпадает с разделением тела материнской клетки (процессом цитокинеза). В клетках животных цитокинез опосредуется сужением актомиозинового сократительного кольца – промежуточной структуры, которая начинает формироваться в профазе и прометафазе и становится полностью функциональной в конце телофазы, и содержит F-актиновые нити и активный миозин II. Сократительное кольцо образуется прямо под плазматической мембраной на экваторе делящейся клетки, его активность приводит к образованию борозды деления, которая углубляется до тех пор, пока две дочерние клетки не окажутся полностью разделенными (Fededa, Gerlich, 2012).

1.2.1. Формирование митотического веретена деления

Митотическое ВД является высокодинамичной молекулярной машиной, преимущественно состоящей из МТ, который обеспечивает сегрегацию хромосом во время клеточного деления. Сборка ВД требует массовой полимеризации МТ и их организации в веретенообразную структуру с участием белков, взаимодействующих с МТ (microtubule-associated proteins; MAP) (Lemos et al., 2000).

В настоящее время существуют несколько моделей формирования ВД. Согласно классической модели «поиска и захвата» (Рисунок 2 А), МТ начинают формироваться от centrosом, которые у высших эукариот являются основными местами формирования МТ ВД. Centrosомы состоят из пары центриолей, окруженных перичентриолярным веществом; они содержат сотни различных белков, включая те, которые необходимы для удвоения centrosом и инициации роста МТ. В клетках, содержащих centrosомы, сборка ВД начинается с расхождения дочерних centrosом к противоположным сторонам клетки на стадии профазы митоза, при этом полюсные МТ могут случайным образом наталкиваться на кинетохоры после начала разрушения ядерной оболочки. В таком случае эти МТ захватываются и стабилизируются кинетохорными белками, превращаясь в кинетохорные МТ (Kirschner, Mitchison, 1986). Таким образом, функцией кинетохоров является формирование устойчивых контактов с полюсными МТ (Рисунок 2 А) (O'Connell, Khodjakov, 2007).

Однако модель «поиска и захвата» не объясняет сборку ВД в клетках, лишенных centrosом (например, в клетках высших растений или в мейотических

клетках животных). В таких клетках формирование ВД начинается с образования МТ в непосредственной близости от хромосом с помощью процесса, зависящего от активности белка ГТФазы Ran (Clarke, Zhang, 2008). Такие МТ вначале растут в случайных направлениях, но постепенно собираются вместе в биполярное ВД за счет активности моторных белков (Рисунок 2 Б).

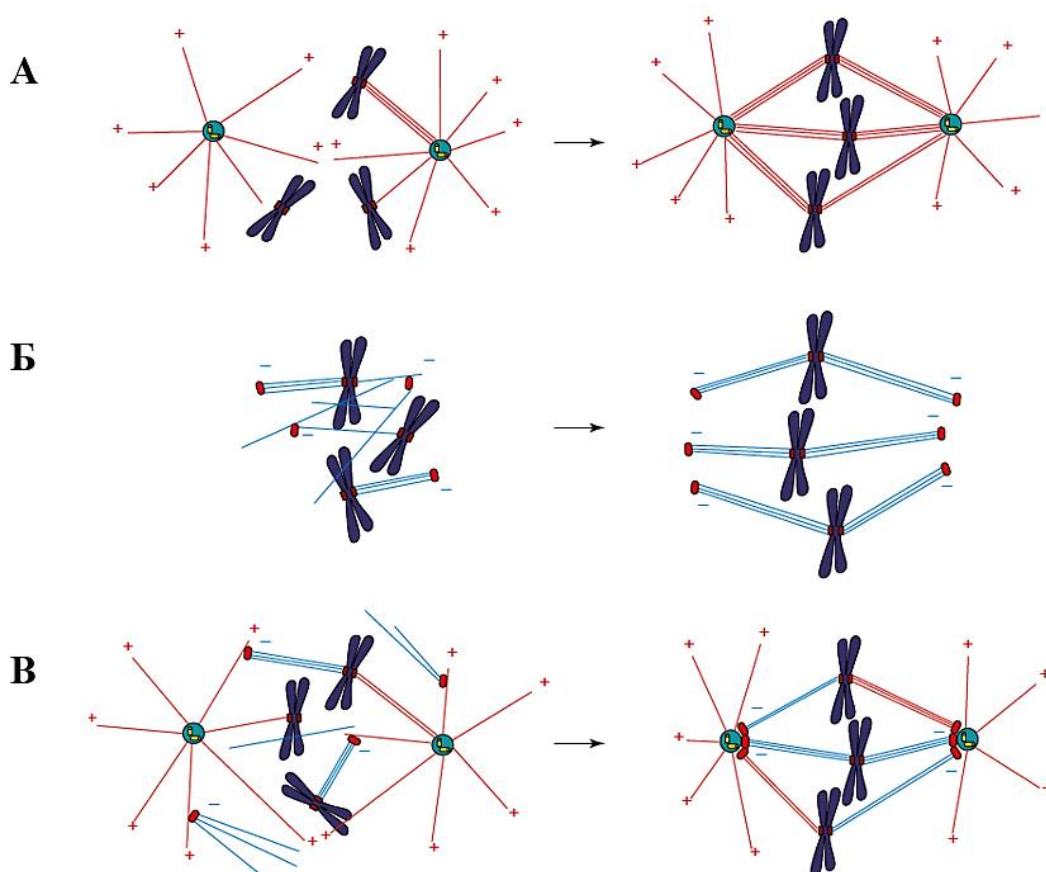


Рисунок 2. Способы формирования веретена деления (Wadsworth, Khodjakov, 2004). **А.** Сборка веретена деления путем «поиска и захвата». **Б.** Сборка веретена деления в клетках, лишенных centrosом. **В.** Комбинированный вариант образования веретена деления. Красным цветом показаны микротрубочки, инициировавшие свой рост от centrosом, синим – от кинетохоров; зеленым – centrosомы; желтым – центриоли.

Недавние исследования выявили, что и в клетках животных МТ начинают формироваться не только от centrosом, но и в непосредственной близости от кинетохоров. Такие кинетохор-зависимые пучки МТ наблюдали как в клетках млекопитающих, так и в клетках дрозофилы (Khodjakov et al., 2003; Maiato et al., 2004). В результате была предположена комбинированная модель формирования ВД (Рисунок 2 В). Согласно этой модели, МТ, начавшие формироваться от кинетохоров,

взаимодействуют с полюсными МТ, что и приводит к образованию кинетохорных волокон, которые соединяют хромосомы с полюсами ВД (Maiato et al., 2004).

1.2.2. Регуляция динамики микротрубочек

Митотическое ВД отличается высокой динамичностью, что обеспечивается постоянной полимеризацией и деполимеризацией составляющих его МТ. Динамичность МТ крайне важна для выполняемых ими функций в митозе: для формирования и позиционирования ВД, поиска кинетохоров и связывания с ними, выстраивания хромосом в экваториальной плоскости ВД и разделения сестринских хроматид. Помимо этого, динамичность МТ также играет ключевую роль в работе контрольной системы сборки (КСС) ВД (spindle assembly checkpoint; SAC) (Kline-Smith, Walczak, 2004).

МТ представляют собой полые цилиндрическими филаменты, состоящие из 13 протофиламентов, расположенных по кругу. Каждый протофиламент состоит из гетеродимеров, образованных α - и β -субъединицами тубулина, которые всегда единообразно ориентированы друг к другу по принципу «голова к хвосту», что обеспечивает полярность МТ. Скорости полимеризации на противоположных концах МТ сильно различаются. Рост (полимеризация) МТ преобладает на концах с β -субъединицами тубулина, в то время как для концов с α -субъединицами более характерен процесс диссоциации. Соответственно, первые концы МТ называются плюс-концами, а вторые – минус-концами. Менее динамичные минус-концы МТ располагаются на полюсах ВД возле centrosом, в то время как более динамичные плюс-концы контактируют с кинетохорами. При наличии достаточного количества свободных гетеродимеров тубулина рост МТ происходит спонтанно. Формирование МТ зависит от ГТФ, для чего перед присоединением свободных гетеродимеров к протофиламенту, ГТФ гидролизует до ГДФ (Kline-Smith, Walczak, 2004) (Рисунок 3). Помимо продолжительной полимеризации, на плюс-концах МТ может проходить и продолжительная деполимеризация (разборка). Динамическая нестабильность заключается том, что переход между двумя данными состояниями носит стохастический характер. Переключение МТ с роста на разборку называется «катастрофой», а с разборки на рост – «спасением» (Mitchison, Kirschner, 1984) (Рисунок 3).

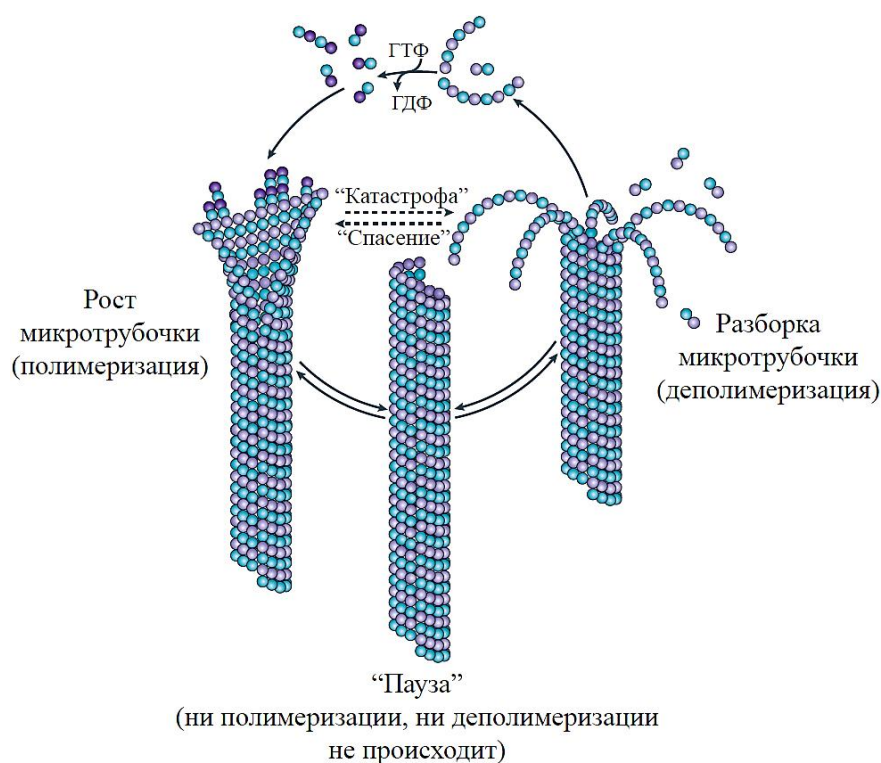


Рисунок 3. Схема динамической нестабильности микротрубочек (Conde, Caceres, 2009).

Одновременная разборка МТ на минус-концах и сборка на плюс-концах приводят к возникновению потока гетеродимеров тубулина внутри МТ в направлении полюсов ВД (Rogers et al., 2004; Mitchison, 2005). Добавление новых гетеродимеров тубулина со стороны кинетохоров и одновременная равнозначная их утрата на полюсах ВД приводит к стационарной длине МТ, наблюдаемой на стадии метафазы. Это состояние сохраняется до тех пор, пока «контрольная точка» сборки ВД не будет пройдена и клетка не вступит в анафазу. Предполагается, что функция потока гетеродимеров тубулина внутри МТ состоит в контроле длины ВД и в перемещении сестринских хроматид к противоположным полюсам ВД на стадии анафазы. Количественное определение скорости потока гетеродимеров тубулина внутри ВД является важным параметром для понимания поведения МТ во время митоза (Buster et al., 2007).

Исследования динамики ВД в культивируемых клетках S2 дрозофилы при помощи методов РНК-и и восстановления флуоресценции после обесцвечивания (fluorescent recovery after photobleaching; FRAP) показали, что баланс динамики плюс- и минус-концов МТ контролируется деятельностью по крайней мере шести различных белков (Fernandez et al., 2009). Белки Eb1 (End-Binding protein 1) (Rogers et al., 2002) и Mast (Inoue, et al., 2000; Maiato et al., 2005) взаимодействуют с плюс-

концами МТ и способствуют их полимеризации. Белки Klp10A и Klp59C (оба из семейства кинезинов-13) и белок Klp67A (из семейства кинезинов-8), наоборот, способствуют деполимеризации МТ (Rogers et al., 2004; Goshima, Vale, 2005). Белок Msps (Mini spindles) минимизирует стадию «паузы», во время которой не происходит ни полимеризации, ни деполимеризации МТ (Рисунок 3), и тем самым способствует их динамичности (Brittle, Ohkura, 2005).

Механизм деполимеризации кинетохорных МТ на минус-концах, локализующихся на полюсах ВД, относительно прост и зависит, прежде всего, от белка Klp10A. Снижение количества этого белка посредством РНК-и приводит к существенному снижению потока гетеродимеров тубулина внутри МТ, значительно замедляет скорость движения сестринских хроматид к полюсам деления и стимулирует удлинение ВД (Рисунок 4) (Ganem et al., 2005).

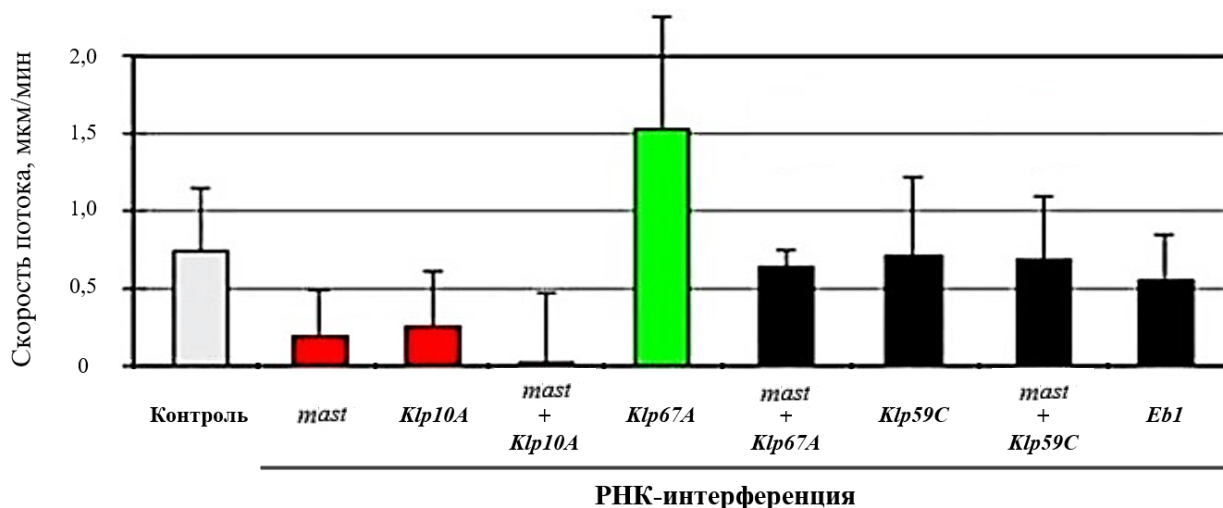


Рисунок 4. Скорость потока гетеродимеров тубулина внутри микротрубочек в направлении полюсов веретена деления после снижения количества указанных на рисунке белков посредством РНК-интерференции в клетках S2 дрозофилы (Buster et al., 2007). Статистически значимые различия по сравнению с контролем обозначены зеленым (больше, чем контроль) и красным (меньше, чем контроль) цветами, черным цветом обозначено статистически значимое отсутствие различия с контролем.

Регулирование динамики плюс-концов МТ является более сложным процессом и управляется с помощью группы совместно действующих белков. Во время метафазы гетеродимеры тубулина непрерывно присоединяются и отсоединяются от плюс-концов кинетохорных МТ. Скорость полимеризации этих концов МТ контролируется посредством функционального антагонизма между

белками, которые способствуют полимеризации или деполимеризации МТ. Так, снижение количества белка Mast (который способствует полимеризации МТ) приводит к укорачиванию и полному разрушению ВД, а также существенно снижает поток гетеродимеров тубулина внутри МТ. Одновременное снижение количества белков Mast и Klp10A приводит к полному блокированию потока гетеродимеров тубулина внутри МТ (Рисунок 4), но при этом восстанавливает нормальную длину ВД (Buster et al., 2007). Подобно белку Mast, белок Eb1, взаимодействующий с плюс-концами МТ, стабилизирует МТ за счет увеличения частоты стадии «спасения» и снижая время, проведенное МТ в состоянии «паузы». Снижение активности белка Eb1 увеличивает частоту aberrантных фенотипов ВД и значительно сокращает его длину (Rogers et al., 2002; Maiato et al., 2005), но не оказывает существенного влияния на скорость потока гетеродимеров тубулина внутри МТ (Рисунок 4).

Белки Klp67A и Klp59C локализируются на кинетохорах и способствуют деполимеризации кинетохорных МТ. Снижение количества белка Klp67A приводит к удлинению ВД и ускорению скорости потока гетеродимеров тубулина внутри МТ в полтора раза (Рисунок 4). Это указывает на то, что белок Klp67A является сильным супрессором потока гетеродимеров тубулина внутри МТ (Buster et al., 2007). Экспериментальные данные указывают на то, что белок Klp67A уменьшает общую скорость полимеризации плюс-концов МТ ВД посредством содействия разборке МТ (Gandhi et al., 2004). На основе этих наблюдений была предложена гипотеза о том, что поток гетеродимеров тубулина внутри МТ в направлении полюсов деления регулируется антагонистическими активностями на плюс-концах МТ, которые стабилизируют и дестабилизируют МТ. В соответствии с этой гипотезой, совместное снижение количества белков Klp67A и Mast восстанавливает скорость потока (Рисунок 4). В отличие от белка Klp67A, белок Klp59C существенно не влияет на поток гетеродимеров тубулина внутри МТ в направлении полюсов ВД. Тем не менее, белок Klp59C функционально противодействует белку Mast в регуляции этого потока, поскольку одновременное снижение количества этих белков приводит к картине, практически не отличающейся от контроля (Рисунок 4). По этой причине предполагается, что в иерархии белков, регулирующих динамику плюс-концов МТ, белок Klp59C находится ниже белка Klp67A и его функцией является поддержка разборки МТ после стадии «катастрофы» (Buster et al., 2007).

Также было предположено, что регуляторы динамичности МТ, но не потока гетеродимеров тубулина внутри МТ в направлении полюсов ВД как такового, ответственны за выстраивания хромосом в экваториальной плоскости ВД и установление нормальной длины ВД на стадиях профазы и метафазы. Поток гетеродимеров тубулина внутри МТ в направлении полюсов ВД, напротив, является важным фактором в регулировании движения сестринских хроматид на стадии анафазы А (Buster et al., 2007).

1.2.3. Регуляция длины митотического веретена деления

Нормальная длина митотического ВД достигается за счет координации между динамичностью МТ и силами, создаваемыми моторными белками. Цитогенетические скрининги выявили ряд факторов, регулирующих длину ВД. Среди выявленных факторов оказались белки, способствующие полимеризации и деполимеризации МТ, а также белки, способные связываться с соседними МТ и перемещать их друг относительно друга. Эти факторы действуют как по отдельности, так и совместно, для установления биполярности ВД и для поддержания его постоянной длины во время метафазы.

Было предложено несколько моделей поддержания и регулирования длины митотического ВД (Goshima, Scholey, 2010). Модулирование процессов полимеризации и деполимеризации МТ является важнейшим фактором, определяющим длину ВД. Как правило, снижение количества белков, усиливающих полимеризационную активность МТ, приводит к укорочению длины ВД, а снижение количества белков, усиливающих деполимеризационную активность МТ, – к удлинению ВД (Рисунок 5 А, Б).

Другой механизм, регулирующий длину ВД, заключается в скольжении смежных МТ друг относительно друга. Такое скольжение происходит, например, между межполюсными МТ, взаимодействующими друг с другом в антипараллельной ориентации в центральной части ВД, и опосредуется моторными белками, такими как Klp61F и Ncd дрозофилы (Рисунок 5 В). Белок Klp61F – это плюс-концевой моторный белок (Cole et al., 1994; Kashina et al., 1996), который связывает волокна МТ и опосредует их антипараллельное расхождение, тем самым

создавая усилие на полюса ВД (Goshima, Scholey, 2010) (Рисунок 5 В). Активность белка Klp61F имеет важное значение для биполярности ВД, но не для определения его длины, возможно, из-за того, что расхождение полюсных МТ компенсируется их деполимеризацией на полюсах ВД (Goshima et al., 2005) (Рисунок 5 А).

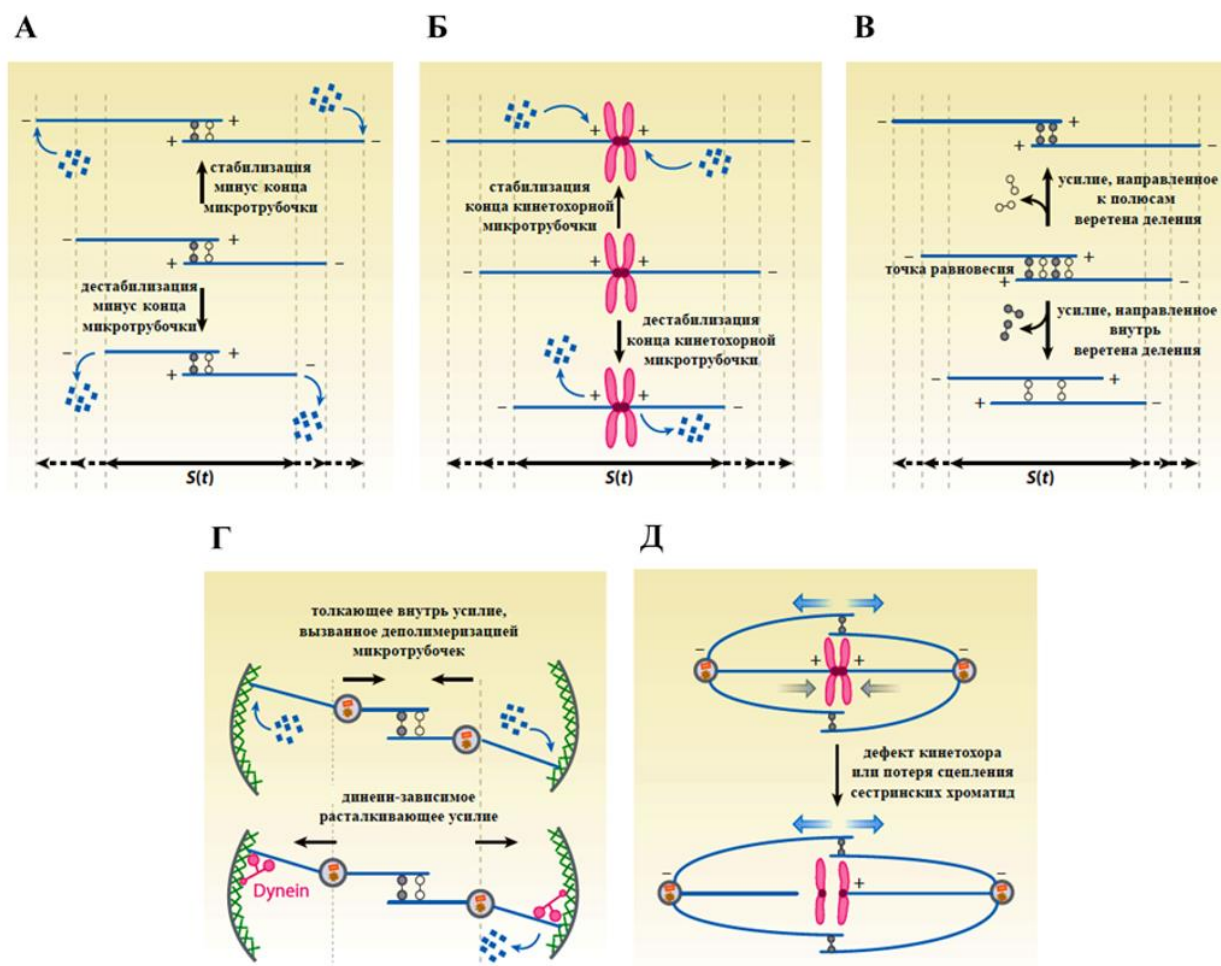


Рисунок 5. Механизмы, регулирующие длину веретена деления (Goshima, Scholey, 2010). Динамика длины веретена деления. **А.** Влияние полимеризации и деполимеризации минус-концов смежных, антипараллельных полюсных микротрубочек на длину веретена деления. **Б.** Полимеризация и деполимеризация плюс-концов микротрубочек на кинетохорах может удлинять и сокращать веретено деления. **В.** Скольжение наружу и внутрь антипараллельных смежных полюсных микротрубочек может удлинять и сокращать веретено деления. **Г** (верхняя часть). Полимеризация полюсных микротрубочек на клеточном кортексе оказывает воздействие на полюса веретена деления и приводит к его укорочению. **Г** (нижняя часть). Влияние моторных белков (расталкивающие усилие) на полюсные микротрубочки на клеточном кортексе удлиняют веретено деления. **Д.** Взаимодействия между сестринскими хроматидами и между кинетохорами и микротрубочками противодействует силе, вызванной скольжением антипараллельных полюсных микротрубочек. $S(t)$ – константная длина (расстояние) между полюсами веретена деления.

Эмбрионы дрозофилы, мутантные по гену *ncd*, характеризуются удлинёнными ВД, что указывает на роль белка Ncd в обеспечении схождения внутрь межполюсных МТ (Рисунок 5 В). Таким образом, белок Ncd – это минус-концевой моторный белок, который соединяет смежные параллельные или антипараллельные МТ и опосредует их скольжение друг относительно друга. Снижение количества белка Ncd в культивируемых клетках S2 дрозофилы вызывает серьёзные нарушения в организации полюсов ВД (Goshima et al., 2005). Предполагается, что в некоторых случаях белки Klp61F и Ncd могут выполнять антагонистические функции во время сборки и поддержания ВД (Brust-Masher et al., 2009).

Ещё одним белком, влияющим на скольжение МТ, является динеин. Цитоплазматический динеин является процессивным минус-концевым моторным белком, который локализуется на ВД, на клеточном кортексе и кинетохорах, и выполняет множественные функции в митозе. Предполагается, что динеин связывает антипараллельные межполюсные МТ и способствует их скольжению внутрь (Kardon, Vale, 2009) (Рисунок 5 В, Г). Молекулы динеина, располагающиеся на клеточном кортексе, предположительно, тянут полюсные МТ, что необходимо как для разделения полюсов, так и для удлинения ВД (Sharp et al., 2000). Снижение количества динеина приводит к возникновению различных дефектов при формировании ВД. В частности, в культивируемых клетках S2 дрозофилы снижение количества динеина препятствует взаимодействию МТ, формирующихся на разных полюсах ВД, и приводит к отсоединению центросом от ВД (Goshima et al., 2005).

Хромосомы также играют существенную роль в регуляции длины метафазного ВД во всех исследованных типах клеток эукариот. Рассмотрим упрощённую модель, в которой имеются только две пары межполюсных МТ, отходящих от противоположных полюсов ВД и одна пара кинетохорных МТ (Рисунок 5 Д). Полюсные МТ соединены друг с другом посредством моторных белков, которые расталкивают эти МТ. На стадии метафазы это расталкивающее усилие компенсируется натяжением между сестринскими хроматидами и кинетохор-зависимой регуляцией динамичности плюс-концов кинетохорных МТ. Нарушения взаимодействия между кинетохорами и МТ, а также ослабление связи между сестринскими хроматидами приводит к тому, что силы, вызванные работой моторных белков на антипараллельных полюсных МТ, начинают доминировать и расстояние

между полюсами ВД увеличивается (Рисунок 5 Д). Мутации генов, кодирующих как компоненты кинетохоров, так и белков, необходимых для удержания сестринских хроматид вместе (например, мутации гена *vtd*, кодирующего белок Ncd), как правило, приводят к удлинению ВД на стадии метафазы (Goshima et al., 2005).

1.2.4. Структура и функции кинетохора

Кинетохор – сложно организованная структура, которая функционирует как молекулярный каркас и как генератор силы при передвижении хромосом. Кроме того, кинетохоры также выполняют сигнальную функцию в регуляции расхождения сестринских хроматид (Foley, Kapoor, 2012). Электронно-микроскопические исследования показали, что кинетохор имеет трехслойную структуру, состоящую из электронно-плотных внутреннего и наружного слоев (O’Connell et al., 2012). Цитогенетические скрининги, биохимические и протеомные анализы выявили более сотни белков, локализующихся в кинетохоре (Takeuchi, Fukagawa, 2012) (Рисунок 6).

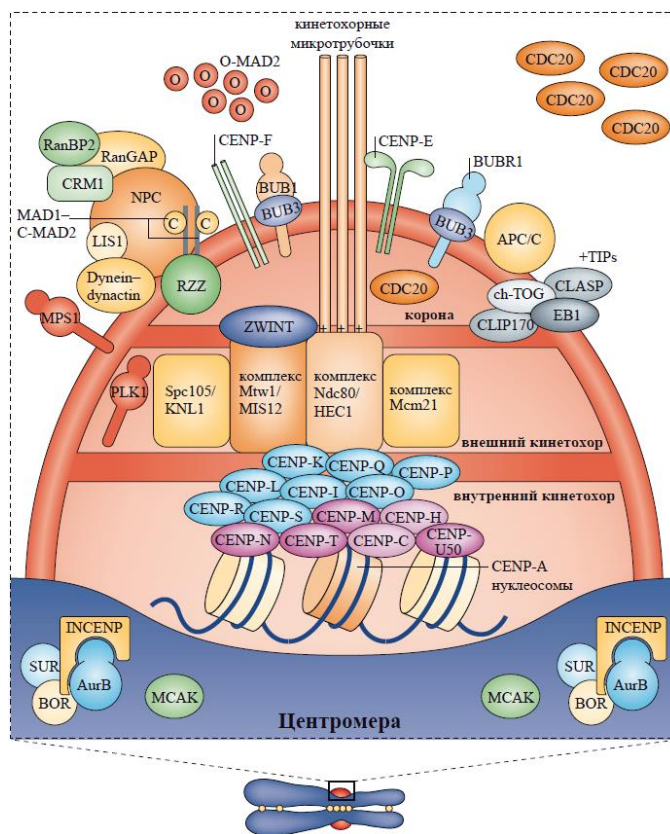


Рисунок 6. Структура кинетохора (Musacchio, Salmon, 2007; с модификациями). Описание в тексте.

Ключевым элементом формирования кинетохора является специфический вариант гистона H3 (CENH3 или CENP-A у млекопитающих, CID у дрозофилы, Cse4 у *S. cerevisiae*), создающего уникальную конфигурацию хроматина в центромерных районах хромосом. Гистон CENP-A у млекопитающих требуется для привлечения в определенном порядке дополнительных центромерных белков, которые необходимы для сборки кинетохора (Verdaasdonk, Bloom, 2011). Внешняя кинетохорная пластинка и располагающаяся снаружи от нее волокнистая корона собираются при вступлении клетки в митоз. Они содержат большое количество различных белковых комплексов, необходимых для осуществления трех основных функций кинетохора: 1) взаимодействие с МТ; 2) контроль прикрепления МТ; 3) регуляция динамики МТ.

Связывание МТ с кинетохором прежде всего зависит от белковой сети KMN (KNL1-Mis12-Ndc80) у *C. elegans* (Cheeseman et al., 2006), комплекса Skl1 у человека (Welburn et al., 2009) белка CENP-E у *Xenopus* (Wood et al., 1997), комплекса Ndc80 у дрозофилы (Maiato et al., 2006) (Рисунок 6). Белковый комплекс Mis12 служит основой для образования белковой сети KMN. Комплекс Ndc80, состоящий из белков Ndc80/Hec1, Nuf2, Spc24 и Spc25, способен непосредственно взаимодействовать с МТ и является ключевым связующим звеном между МТ и остальными компонентами кинетохора у эукариот (Foley, Kapoor, 2012). Кинезиноподобный плюс-концевой моторный белок CENP-E (CENP-meta у дрозофилы) также необходим для стабильного прикрепления МТ к кинетохорам при выравнивании хромосом на экваторе ВД (Kapoor et al., 2006).

В кинетохоре также локализованы и сигнальные молекулы, составляющие КСС ВД. Задача этого механизма заключается в запрете вступления клетки в стадию анафазы до тех пор, пока все хромосомы не сориентируются правильным образом на ВД (в экваториальной пластинке). Дефекты в работе КСС ВД приводят к преждевременному наступлению анафазы и в результате к анеуплоидии (Fang, Zhang, 2011). Основными компонентами КСС ВД являются эволюционно консервативные белки Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, Mad3/BubR1, Mps1 и Aurora B у *S. cerevisiae*, *Xenopus* и дрозофилы (Foley, Kapoor, 2012; Basu et al., 1999; Chen et al., 1996, 1998). Дополнительными белками, регулирующими работу КСС ВД в клетках высших эукариот, являются белковый комплекс RZZ (ROD-ZW10-ZWILCH) (Foley, Kapoor, 2012), минус-концевой моторный

белковый комплекс динеин/динактин, и взаимодействующие с ними белки CLIP-170, ZW10 и ROD у млекопитающих (Musacchio, Salmon, 2007).

Все эти белки КСС ВД локализуются на кинетохорах (Рисунок 6) и способны детектировать, все ли кинетохоры связаны с полюсами ВД посредством МТ правильным образом. До тех пор, пока это условие не выполнено, белки КСС ВД остаются активными. Основным эффектором КСС ВД является комплекс митотической «контрольно-пропускной точки» (mitotic checkpoint complex; MCC), который содержит белки Mad2, Mad3/BubR1, Bub3 у *S. cerevisiae* (Musacchio, Salmon, 2007). Комплекс MCC подавляет белок Cdc20, являющийся активатором комплекса APC/C (anaphase-promoting complex / cyclosome), содержащий митоз-специфичную убиквитин-лигазу E3, ответственную за переход из метафазы в анафазу (Рисунок 7).

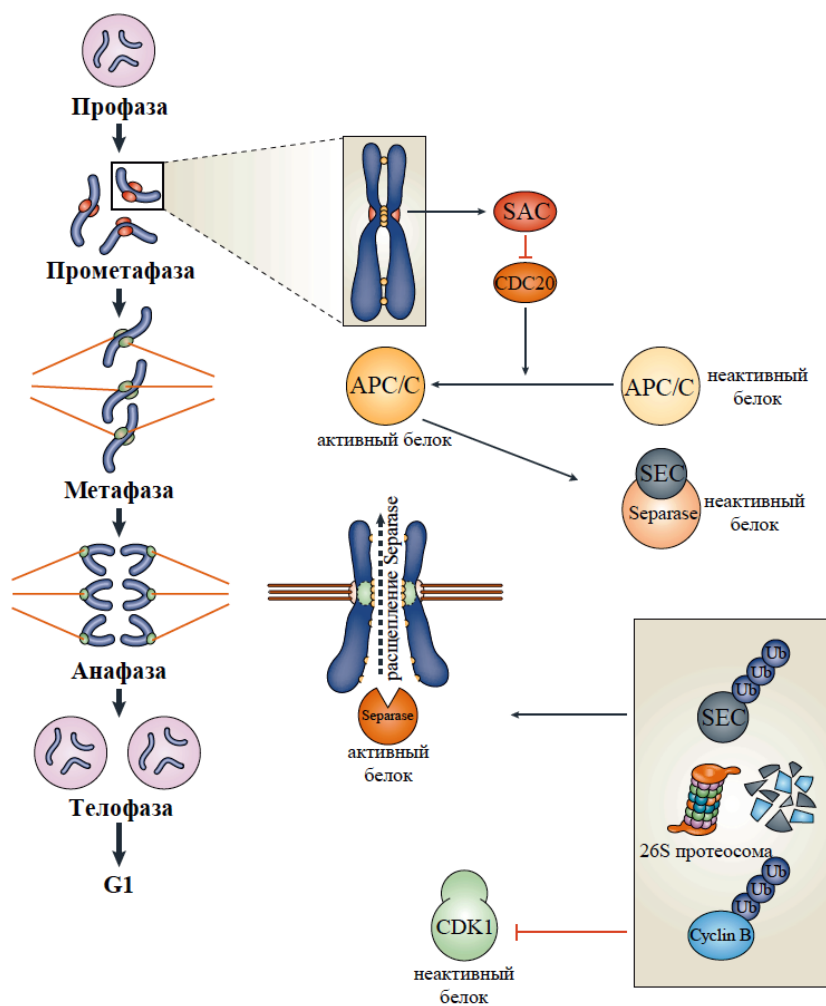


Рисунок 7. Функция контрольной системы сборки веретена деления (Musacchio, Salmon, 2007; с модификациями). Описание в тексте.

После того, как последняя хромосома располагается должным образом в ВД, КСС ВД выключается, что вызывает высвобождение белка Cdc20 и последующую активацию комплекса APC/C (Рисунок 7), и, в конечном счете, убиквитинирование белков Securin и Cyclin B. Убиквитинированные белки разрушаются белковыми комплексами, такими как протеосома 26S. Разрушение белка Securin, который является ингибитором протеазы Separase, приводит к протеолизу когезина и разделению сестринских хроматид, в то время как разрушение белка Cyclin B вызывает выход клетки из митоза (Kops, Shah, 2012) (Рисунок 7).

1.3. Белки, участвующие в сборке веретена деления

1.3.1. Белок Eb1

По своей природе МТ ВД являются динамичными структурами, что позволяет цитоскелету перестраиваться в ответ на внутренние и внешние сигналы. В стационарном состоянии отдельные МТ претерпевают переходы между фазами длительной полимеризации и деполимеризации. Такое поведение, известное как динамическая нестабильность (Conde, Caceres, 2009), обеспечивается гидролизом ГТФ после того, как происходит встраивание мономерного тубулина в МТ (Desai, Mitchison, 1997). Динамическая нестабильность регулируется различными белками семейства MAP, а также моторными белками, некоторые из которых способствуют сборке и стабильности МТ, тогда как другие отвечают за деполимеризацию МТ (Desai et al., 1999). Хотя большинство MAP связываются с МТ по всей длине, два семейства таких белков локализуются исключительно на плюс-концах растущих МТ: белки семейства CLASP (например, описанный ниже белок Mast) и белки семейства EB1 (end-binding proteins) (Schuyler, Pellman, 2001).

Впервые человеческий белок Eb1 был обнаружен в дрожжевом двугибридном скрининге по способности взаимодействовать с человеческим белком-супрессором APC (adenomatous polyposis coli; аденоматозный полипоз толстой кишки) (Su et al., 1995). Впоследствии гомологичные белки были обнаружены во многих организмах, включая *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans* (Tirnauer, Bierer, 2000; Su,

Qi., 2001). Белки семейства EB1 представляют собой небольшие (~35 кДа) белки, которые специфически распознают полимеризующиеся плюс-концы МТ (Tirnauer, Bierer, 2000; Schuyler, Pellman, 2001a). Такое взаимодействие белков Eb1 с МТ приводит к изменению структуры концов последних, вследствие чего происходит регуляция динамики полимеризации МТ, а также это служит «меткой» плюс-концов МТ в качестве сайта связывания для прочих белков (Schroer, 2001).

В клетках млекопитающих белок Eb1 взаимодействует с комплексом динеин/динактин (Bergueta et al., 1999). В цитоплазматических экстрактах ооцитов *Xenopus* белок Eb1 выполняет роль фактора, предотвращающего стадии «спасения» и «катастрофы» (Tirnauer et al., 2002a) (описание выше в тексте). Белок Mal3 *S. pombe* – гомолог белка Eb1 – также участвует в процессе митоза (Weinhauer et al., 1997). Хорошо изученным в настоящее время является гомолог белка Eb1 у *S. cerevisiae* – белок Vim1p. Данный белок выполняет, по крайней мере, три связанные функции: 1) локализуется на плюс-концах полюсных МТ, тем самым увеличивая динамическую нестабильность МТ (Tirnauer et al., 1999); 2) посредством взаимодействия с кортикальным белком Kar9 и белком миозином (Myo2p) связывает концы МТ с кортикальным слоем клетки для правильной ориентации ВД (Korinek et al., 2000; Lee et al., 2000; Miller et al., 2000; Yin et al., 2000); 3) косвенно участвует в КСС, которая регулирует процесс выхода клетки из митоза на стадию цитокинеза (Muhua et al., 1998).

Белки семейства EB1 содержат высококонсервативные N- и C-концевые домены. N-концевой домен необходим для связывания МТ (Juwana et al., 1999). C-конец белков семейства EB1 содержит coiled-coil домен, который обеспечивает параллельную димеризацию мономеров белка Eb1, а также может опосредовать белок-белковые взаимодействия (Akhmanova, Steinmetz, 2008). Так, для белка Vim1p *S. cerevisiae* показано, что его C-терминальный coiled-coil домен связывается с белком Kar9 (Miller et al., 2000).

Исследование локализации белка Eb1 в культивируемых клетках *S2* дрозофилы, обработанных конканавалином А (для их фиксации на предметном стекле и приобретения уплощенной, дисковидной морфологии), показало, что она полностью совпадает с отдельными МТ и демонстрирует кометоподобный (comet-like) градиент окрашивания на полимеризующемся дистальном конце МТ (Rogers et al., 2002), что характерно и для других плюс-концевых белков (Mimori-Kiyosue et al.,

2000). Такая локализация белка Eb1 на плюс-концах МТ сохраняется на протяжении всех стадий митоза. Помимо этого, наблюдается связывание белка Eb1 с дублированными центросомами в профазных клетках. Во время метафазы наиболее сильное связывание белка Eb1 происходит с плюс-концами полюсных МТ. На стадии телофазы белок Eb1 обогащен на межполюсных МТ, которые участвуют в процессе расхождения сестринских хроматид (Rogers et al., 2002). Данная локализация белка Eb1 в клетках S2 дрозофилы очень схожа с локализацией белков семейства EB1, которые ранее изучались на различных клеточных линиях позвоночных (Morrison et al., 1998; Tirnauer et al., 1999; Mimori-Kiyosue et al., 2000b). Исследование распределения белка Eb1 в эмбрионах дрозофилы на стадии синцитиальной бластодермы выявило схожую картину: данный белок локализуется на полюсах ВД и полюсных МТ, а также на межполюсных МТ и поперечной перетяжке (midbody) во время поздней анафазы и телофазы (Rogers et al., 2002).

Снижение количества белка Eb1 приводит к появлению абберантных фенотипов ВД в метафазных клетках, которые можно классифицировать по четырем категориям. Наиболее часто встречающимся фенотипом является полное отсутствие полюсных МТ, при этом клетки сохраняют свою биполярную симметрию, однако наблюдается «отсоединение» центросом от ВД. Следующим видом нарушений является отсутствие полюсных МТ, а также компактизация ВД в корзиноподобную (basket-like) сеть МТ, которая окружает хромосомы. В таких клетках полюса ВД почти неразличимы, но митотические хромосомы сохраняют свое положение в центре ВД. Третий тип нарушения формирования ВД характеризуется полным отсоединением полюсов ВД от пучков кинетохорных МТ, что приводит к формированию абберантных ВД. Четвертая категория нарушений характеризуется клетками с бочковидными (barrel-shaped) ВД, которые сохраняют симметричность, но при этом МТ не сфокусированы на полюсах ВД, а также отсутствуют полюсные МТ. Наблюдаемые фенотипы, по-видимому, не связаны с грубыми дефектами центросом, так как иммунофлуоресцентное окрашивание к белку Centrosomin показало наличие полюсов ВД и их функциональность (Rogers et al., 2002). Во время интерфазы отсутствие белка Eb1 не влияет на длину или распределение МТ и не оказывает очевидного влияния на морфологию клеток. Таким образом, белок Eb1 играет важную роль прежде всего в процессе сборки митотического ВД.

1.3.2. Белок Mars

Одним из белков, регулирующих клеточный цикл у млекопитающих (в том числе и у человека), является белок HURP (Hepatoma Up-Regulated Protein), впервые обнаруженный в гепатоклеточной карциноме человека из-за высокого уровня активности в данном типе опухоли (Tsou et al., 2003). Пептидный анализ показал, что белок HURP содержит домен GKAP (guanylate kinase associated protein) (Kim et al., 1997; Tsou et al., 2003). Домен GKAP был первоначально идентифицирован в белке, являющемся членом семейства MAGUK (membrane-associated guanylate kinase homologue family), играющем роль в цитоскелетной сигнализации и межклеточных контактах между синапсами и эпителиальными клетками (Sheng, Kim, 2000; Terpass et al., 2001; Caruana, 2002). Биохимические исследования показали, что белок HURP является потенциальной мишенью киназы Aurora-A – серин/треониновой киназы, регулирующей вступление клетки в митоз, созревание центросом и сборку ВД (Crane et al., 2004; Ducat et al., 2004; Yu et al., 2005). Также было показано, что белок HURP связан с белком ГТФазой Ran, который принадлежит к семейству Ras ГТФ-связывающих белков и высвобождает факторы, необходимые для сборки ВД, из комплекса Importin (Kalab, Heald, 2008). Белок HURP контролирует стабильность МТ для обеспечения правильного формирования ВД, что, таким образом, способствует прикреплению кинетохорных МТ к кинетохору (Wong, Fang, 2006). Из этого следует, что белок HURP участвует в сборке ВД, необходим для роста и стабилизации МТ (и, следовательно, для формирования ВД), а также регулирует выстраивание хромосом в экваториальной плоскости ВД во время митоза (Koffa et al., 2006; Sillje et al., 2006; Wong, Fang, 2006; Yang et al., 2008).

Белок Mars, дрозофилиный гомолог белка HURP, принадлежит к семейству белков GKAP и является фактором сборки ВД (Cesario, McKim, 2011). Было показано, что белок Mars экспрессируется в эмбрионах (в центральной нервной системе и головном мозге) и клетках зародышевого пути (высокий уровень экспрессии в предмейотических зародышевых клетках, но не был обнаружен в соматических и постмейотических клетках) (Bennett, Alphey, 2004). Исследования (как с использованием трансгенных мух, так и культивируемых клеток S2 дрозофилы) показали, что субклеточная локализация белка Mars динамически

изменяется во время клеточного деления. В интерфазных клетках белок Mars локализуется в ядре, но при этом не связывается с интерфазными МТ (Zhang et al., 2009). В клетках, находящихся на стадии профазы, белок Mars равномерно распределен в цитоплазме; при этом небольшое количество белка локализуется на митотическом ВД. С наступлением прометафазы количество белка на ВД значительно увеличивается рядом с centrosомами (Zhang et al., 2009). В метафазных клетках белок Mars концентрируется на межполюсных МТ, а также на полюсах ВД, при этом отсутствует на полюсных МТ (Yang et al., 2008; Zhang et al., 2009). Во время анафазы белок Mars локализуется только на минус-концах межполюсных МТ, после чего, начиная со стадии телофазы, происходит перемещение белка Mars в ядра дочерних клеток, при этом белок отсутствует на ВД (Zhang et al., 2009).

В клетках со сниженным количеством белка Mars (после процедуры РНК-и) нарушается формирование кинетохорных МТ, при этом полюсные и межполюсные МТ остаются нормальными. Из-за ошибок в сборке ВД наблюдались нарушения в выстраивании хромосом в экваториальной плоскости ВД на стадиях от профазы до метафазы и уменьшение длины ВД по сравнению с контролем (Yang et al., 2008). Помимо влияния на формирование кинетохорных МТ, снижение количества белка Mars влияет на локализацию γ -тубулина на ВД. Это указывает на то, что белок Mars может регулировать сборку ВД через активность γ -тубулина, чья функция в сборке ВД контролируется ГТФазой Ran (Carazo-Salas et al., 1999; Kalab et al., 1999; Wilde, Zheng, 1999; Schiebel, 2000). При этом в настоящее время механизм участия белка Mars в сборке кинетохорных МТ остается неясным.

1.3.3. Белок Non3

Многие аспекты организации и функции ядрышка эукариот консервативны от дрожжей до человека (Kressler et al., 2010). В настоящее время принято считать, что ядрышко является многофункциональной органеллой (Pederson, 1998; Boisvert et al., 2007; Shaw, Brown, 2012). При этом его первичная функция заключается в быстром производстве субъединиц рибосом. Однако 70% белков ядрышка задействованы в процессах, напрямую не имеющих отношения к биогенезу рибосом, а именно в

процессах метаболизма информационной РНК, формировании хроматина, репликации и репарации ДНК, контроле клеточного цикла (Scherl et al., 2002; Tafforeau et al., 2013).

У дрозофилы обнаружена прямая взаимосвязь между ядрышком и окружающим его гетерохроматином (Peng, Karpen, 2007; Paredes, Maggert, 2009). Белок гетерохроматина SUUR регулирует время репликации рибосомной ДНК, у мутантов по гену *SuUR* увеличивается число копий данной ДНК в политенных хромосомах слюнных желез (Belyaeva et al., 1998). Специфическая иммунопреципитация с последующим масс-спектрометрическим анализом, использованные для идентификации состава комплексов, содержащих белок SUUR, показала, что в состав SUUR-содержащих белковых комплексов с высокой вероятностью входит белок Non3 (Кожевникова Е.Н. и др., неопубликованные данные).

Белок Non3 дрозофилы и его ортолог у человека – белок RPF2 (Ribosome production factor 2 homolog) – относятся к семейству BRIX-домен-содержащих белков и мало изучены. Белки с BRIX-доменом (biogenesis of ribosomes in *Xenopus*) консервативны и встречаются от архей до человека (Eisenhaber et al., 2001). Биологическая функция некоторых таких белков лучше всего изучена у дрожжей. В частности, у *S. cerevisiae* белок RPF2 участвует в процессинге 27S предшественника рибосомной РНК в 25S рибосомную РНК и необходим для сборки 60S субъединицы рибосом (Morita et al., 2002). Кроме того, у *S. cerevisiae* и *A. nidulans* белок RPF2 связывается с белком RRS1 и в комплексе с рибосомными белками RpL5 и RpL11 участвует в связывании 5S рРНК, которая входит в большую 60S субъединицу рибосом (Zhang et al., 2007; Asano et al., 2015).

Показано, что ген *Non3* экспрессируется повсеместно и имеет наибольший уровень экспрессии в эмбрионах (0–12 ч), яичниках и семенниках дрозофилы (Gramates et al., 2017). Единственная мутация по гену *Non3*, которая была известна на начало выполнения данной работы, вызвана встраиванием трансгенной конструкции на основе Р-элемента в 5'-некодирующую область этого гена. Мухи, гомозиготные по этой мутации, погибают, в то время как гетерозиготы не имеют никаких видимых нарушений развития. Отрывочные экспериментальные данные по белкам Non3 и RPF2 получены только для культивируемых клеток дрозофилы и человека, но не для целого организма или отдельных тканей (Hirano et al., 2009; Moutinho-Pereira et al., 2013). В культивируемых клетках S2 дрозофилы гибридный флуоресцентный белок

Non3-eGFP выявляется исключительно в ядрышке на стадии интерфазы, причем его локализация не совпадает с маркером плотного фибриллярного компонента – белком Fibrillarin (Moutinho-Pereira et al., 2013). Было показано, что снижение количества белка Non3 посредством РНК-и приводит к формированию короткого ВД в клетках S2 дрозоды (Moutinho-Pereira et al., 2013). Это единственный, описанный на момент выполнения данной работы, фенотип при РНК-и гена *Non3*. Ранее для целого ряда белков с ядрышковой локализацией было показано, что снижение их количества в культивируемых клетках S2 дрозоды посредством РНК-и приводит к фенотипу «короткое ВД» (Moutinho-Pereira et al., 2013). В частности, это показано для ядрышкового белка NUCLEOSTEMIN 1 (NS1; ортолог у человека – NUCLEOSTEMIN) (Moutinho-Pereira et al., 2013). Однако, в настоящий момент не ясна природа данных нарушений – влияет ли отсутствие данных белков на сборку ВД напрямую либо опосредованно через нарушение биогенеза рибосом.

1.3.4. Белок Mei-38

Формирование нормального биполярного ВД является важным процессом, необходимым для правильной сегрегации хромосом. Сборка ВД зависит от совместного взаимодействия ряда MAP, что приводит к формированию МТ, а также влияет на динамику и организацию МТ (Karsenti, Vernos, 2001). Одним из таких высококонсервативных MAP, активность которого строго регулируется стадией клеточного цикла, является белок TPX2 у млекопитающих (targeting protein for Xklp2 [*Xenopus* kinesin-like protein 2]) (Wittmann et al., 2000; Alfaro-Aco et al., 2017). У дрозоды ортологом белка TPX2 является белок Mei-38 (Meiotic 38)/Ssp1/D-TPX2 (Wu et al., 2008; Goshima, 2011). У человека белок TPX2 также известен как REPP86 (restricted-expressed proliferation-associated protein 86) (Yao et al., 2018).

Кинезин-подобный белок Xklp2, содержащий N-терминальный моторный домен и C-терминальный домен, отвечающий за направленность полюсов ВД, является плюс-конец-направляющим МТ моторным белком. Тем не менее, белок Xklp2 накапливается на минус-концах МТ ВД во время митоза (Boleti et al., 1996; Wittmann et al., 1998). При помощи белка GST-Xklp2-Tail, содержащего 250 а.о. C-терминального домена белка Xklp2, было показано, что белок TPX2 опосредует

локализацию белка Xklp2 на минус-концах МТ во время митоза в экстрактах ооцитов *X. laevis*, а также влияет на правильное разделение и перемещение centrosом к полюсам ВД (Wittmann et al., 1998).

Исследование локализации белка TPX2 в культивируемых клетках *X. laevis* показало, что во время интерфазы белок TPX2 в небольшом количестве присутствует в ядре (имеет сигнал ядерной локализации; NLS). С началом митоза белок TPX2 располагается на митотическом ВД, а именно: во время профазы и прометафазы белок TPX2 располагается на полюсных МТ; во время метафазы полностью покрывает межполюсные МТ, однако отсутствует на полюсных МТ. В начале анафазы белок TPX2 сконцентрирован на полюсах ВД, во время поздней анафазы происходит его перераспределение в среднюю зону ВД (midzone), что приводит в дальнейшем на стадии телофазы к локализации белка TPX2 по обе стороны от поперечной перетяжки (midbody), при этом белок TPX2 отсутствует на centrosомах (Wittmann et al., 2000). Исследование локализации белка TPX2 в клетках HeLa показало схожую картину – данный белок локализуется в ядре во время S- и G₂-фазы, на МТ и полюсах ВД во время митоза (Perez, Malumbres, 2012; Neumayer et al., 2014).

Было показано, что N-терминальный домен белка TPX2 непосредственно взаимодействует с киназой Aurora-A (Kufer et al., 2002; Bayliss et al., 2003; Eyers et al., 2003; Tsai et al., 2003; Giubettini et al., 2011). В результате происходит процесс связывания, активации и локализации белка Aurora-A на ВД, что необходимо для правильной сборки ВД, функционирования centrosом и активации комплекса γ -TuRC (γ -tubulin ring complex) (Tsai, Zheng, 2005; Pinyol et al., 2013; Scrofani et al., 2015). Часть C-терминального домена белка TPX2 содержит α -спиральные повторы, которые необходимы для опосредованной белковым комплексом augmin стимуляции формирования МТ в экстрактах ооцитов *X. laevis* (Sanchez-Pulido et al., 2016; Alfaro-Aco et al., 2017). C-терминальный домен белка TPX2 взаимодействует с двумя митотическими кинезинами – Kif11/Eg5 и Kif15/Xklp2 (Wittmann et al., 2000; Eckerdt et al., 2008; Tanenbaum et al., 2009; Ma et al., 2010), опосредуя правильную локализацию данных моторных белков на ВД (Wittmann et al., 1998, 2000; Ma et al., 2010; Helmke, Heald, 2014). Хотя организация доменов белка TPX2 обычно схожа для всех многоклеточных организмов, все же есть исключения. У белка TPXL-1

(TPX2-like protein 1) *C. elegans* присутствует только домен, ответственный за активацию киназы Aurora-A (Ozlu et al., 2005).

Для *D. melanogaster* ортологом белка TPX2 является белок Mei-38, у которого отсутствуют домены, схожие с перечисленными выше, при этом белок Mei-38 имеет хоть и небольшую, но существенную гомологию с белком TPX2 (Goshima, 2011). Ген *mei-38/Ssp1* был идентифицирован в двух независимых исследованиях. Аллель гена *mei-38* впервые был обнаружен при генетическом скрининге самок *D. melanogaster* с повышенным уровнем нерасхождения X-хромосом (Baker, Carpenter; 1972). При полногеномном РНК-и скрининге, при котором изучалась морфология ВД, нокаут гена *mei-38* приводил к повышению процента клеток с нарушениями морфологии ВД: короткое, моноастральное биполярное и монополярное ВД (Goshima et al., 2007). Во время митоза и мейоза белок Mei-38 ко-локализуется с МТ ВД, при этом более активно с МТ, которые взаимодействуют с хромосомами и кинетохорными МТ. В клетках со сниженным количеством белка Mei-38 существенно снижена ко-локализация этого белка с кинетохорными МТ, что указывает на то, что белок Mei-38 необходим для стабильности кинетохорных МТ (Wu et al., 2008).

Прижизненная съемка гибридного флуоресцентного белка Mei-38-GFP в клетках S2 дрозофилы показала, что данный белок отсутствует в ядре, но ко-локализуется с центрами организации МТ (microtubule organization center; МТОС) во время профазы. На стадии прометафазы и метафазы связывание белка Mei-38-GFP с МТОС становится менее сильным, при этом отмечается ко-локализация с МТ ВД, в том числе и с кинетохорными, при этом белок Mei-38-GFP отсутствует на полюсах ВД (как наблюдалось для белка TPX2 у позвоночных). Во время анафазы белок Mei-38-GFP равномерно покрывает МТ ВД, при этом предпочтительнее связываясь с кинетохорными, а не с полюсными МТ (Goshima, 2011).

1.3.5. Белок Mast

Динамичность МТ регулируется MAP, в том числе ключевыми регуляторами – белками семейства CLASP. Белки семейства CLASP человека впервые были идентифицированы как CLIP (cytoplasmic linker protein)-ассоциированные белки (Akhmanova et al.; 2001). Они образуют семейство с двумя ранее

идентифицированными белками: белком Stu1 (супрессор мутации β -тубулина) у *S. cerevisiae* и белком Mast (Multiple asters)/Orbit/Chromosome bows (Chb) (названный так из-за специфического фенотипа ВД у мутантов) у дрозофилы (Pasqualone, Huffaker, 1994; Fedorova et al., 1997; Inoue et al., 2000; Lemos et al., 2000). Гомологичные члены семейства CLASP были идентифицированы у эукариот в качестве консервативных регуляторов динамики МТ (Hannak, Heald, 2006; Bratman, Chang, 2007).

В клетках млекопитающих белки семейства CLASP (белок CLASP1 и CLASP2) локализуются на полимеризующихся плюс-концах МТ. Связывание белков семейства CLASP с плюс-концами МТ зависит от белка Ebf1, которое опосредуется через Ebf1-связывающий SxPI мотив (Mimori-Kiyosue et al., 2005). На плюс-концах МТ белок CLASP2 снижает динамику МТ, активирует стадии «паузы», «стабилизации» и «спасения» МТ во время интерфазы (Akhmanova et al., 2001; Drabek et al., 2006; Sousa et al., 2007). Во время митоза белок CLASP1 локализуется на кинетохорах и способствует включению гетеродимеров тубулина в кинетохорные МТ (Maiato et al., 2003, 2005; Cheeseman et al., 2005; Pereira et al., 2006). Белок CLASP2 имеет консервативный С-терминальный домен, необходимый для связывания белка CLIP-170, а также N-терминальный домен TOG (Akhmanova et al.; 2001). Домен TOG выполняет функцию тубулин-связывающей платформы, в совокупности снижая динамику МТ (Widlund et al., 2011; Ayaz et al., 2012). В целом, белки семейства CLASP млекопитающих являются ключевыми пространственными регуляторами динамики интерфазных МТ, структуры и динамики ВД.

Белок Mast дрозофилы, входящий в семейство белков CLASP, индуцирует полимеризацию МТ на кинетохор-ассоциированных плюс-концах МТ (Inoue et al., 2000; Lemos et al., 2000; Fedorova et al., 1997). Филогенетический анализ показал, что белок Mast является высококонсервативным белком-ортологом человеческих белков (CLASP1 и CLASP2) и белков *C. elegans* (cls-1, cls-2 и cls-3), поскольку наблюдается высокая гомология а.о. между представителями семейства CLASP белков (*D. melanogaster*, человек, *C. elegans*).

Впервые мутантный аллель гена *Mast*, *mast^{P1}*, был идентифицирован Омелянчуком Л.В. и коллегами (Omelyanchuk et al., 1997). В дальнейшем было идентифицировано еще два аллеля, индуцированных встройкой Р-элемента: *mast^{P2}* и *mast^{P3}* (Lemos et al., 2000). Четвертый аллель, *mast^{P4}*, был получен путем

ремобилизации Р-элемента в линии *mast^{P1}* (Lemos et al., 2000). Количественная оценка распределения клеток по стадиям митоза указывает на то, что все мутантные аллели гена *mast* приводят к уменьшению числа клеток в профазе, значительному увеличению числа клеток в промета- и метафазе и уменьшению доли клеток, находящихся на стадии анафазы и телофазы. Количественная оценка различных типов митотических аномалий показала, что большинство аллелей гена *mast* значительно увеличивает долю полиплоидных клеток, а также приводит к образованию большого количества как монополярных, так и мультиполярных ВД (Inoue et al., 2000; Lemos et al., 2000). По степени влияния на жизнеспособность и возникновение специфических митотических фенотипов мутантные аллели располагаются в следующем порядке: $mast^{P2} < mast^{P1} < mast^{P3} < mast^{P4}$ (от меньшей к большей) (Lemos et al., 2000). В совокупности эти данные указывают на то, что мутации в гене *mast* вызывают серьезные нарушения в сегрегации хромосом, что приводит к аресту клеток на стадии промета- и метафазы.

Исследования внутриклеточной локализации белка Mast как в клетках дрозофилы, так и в клетках млекопитающих показали, что в интерфазе данный белок сосредоточен на МТОС и ко-локализуется с α -тубулином. Во время профазы белок Mast накапливается в МТОС, а со стадии метафазы - локализуется на центросомах, ВД, центромерах, сохраняя такую локализацию до стадии анафазы Б. При наступлении анафазы Б белок Mast концентрируется в центральной зоне ВД, ассоциированной с межполюсными МТ, при этом локализация на центросомах остается слабой вплоть до наступления телофазы. Во время поздней телофазы белок Mast локализуется по обе стороны от поперечной перетяжки, локализация на центросомах становится едва заметной (Inoue et al., 2000; Lemos et al., 2000; Maiato et al., 2003; D'Avino et al., 2005). В итоге такая локализация белка Mast указывает на то, что он ассоциируется с МТ в течение всего клеточного деления.

1.4. Методы деполимеризации микротрубочек

Многие годы для изучения процесса клеточного деления используются различные методы деполимеризации МТ ВД; это позволяет более детально изучать скорость пролиферации клеток, исследовать механизмы формирования ВД, идентифицировать

белки, участвующие в данном процессе. Природные вещества, способные связываться с тубулином или МТ, первоначально были выделены в виде экстрактов из различных растений. Они использовались в качестве лекарственных средств в течение тысячелетий, а в последние семь десятилетий приобрели первостепенное значение как в терапии рака, так и в качестве экспериментальных инструментов для понимания биологии МТ.

Колхицин (colchicine), выделенный из безвременника осеннего (*Colchicum autumnale*) (Santavy, Reichstein, 1950), известен дольше других митостатиков и играет центральную роль в появлении первых исследований МТ и молекулярных аспектов митоза. Использование колхицина впервые позволило провести процедуру ареста пролиферирующих клеток на стадии митоза (Pernice, 1889), и это открытие дало начало новой области исследования митоза в 1930-х годах, когда колхицин использовался для оценки скорости пролиферации у растений и животных. Колхицин является характерным анти-МТ и антимиотическим препаратом. Он способен связываться с β -тубулином, располагающимся рядом с α -тубулином в гетеродимере, в результате чего происходит изменение в конфигурации β -тубулина, что в итоге приводит к нарушению процесса полимеризации МТ (Ravelli et al., 2004; Barbier et al., 2010). Деполимеризующее действие колхицина является субстехиометрическим – только ~5% гетеродимеров тубулина должны быть связаны с колхицином для остановки клеток в митозе (Taylor, 1965), и подобное фракционное заполнение ингибирует полимеризацию оставшегося «чистого» (без воздействия колхицина) тубулина (Olmsted et al, 1973; Bergen, Borisy, 1983). Однако при добавлении к клеткам колхицина важно следить за временем инкубации и концентрацией, так как необходимо соблюдать равновесие между количеством препарата и тубулином.

Медленная скорость связывания и диссоциации колхицина стала основной причиной для использования колцемида (colcemid) и нокодазола (nocodazole) для рутинной деполимеризации МТ. Колцеמיד (также называемый демеколцин; demecolcine) – синтетический аналог колхицина. Первоначально использовался в качестве лекарственного препарата против рака из-за его низкой токсичности, в настоящее же время используется только в качестве инструмента для остановки клеток на стадии митоза в различных цитогенетических исследованиях. Связывание колцемида с тубулином происходит таким же образом, как и колхицина, но скорость связывания и диссоциации выше в 10 раз (Ray et al., 1984).

Колхицин и близкие к нему производные (в том числе и колцемид) эффективно преобразуются при воздействии длинноволнового УФ излучения в ряд сильно перегруппированных молекул (когда происходит изменение взаимного расположения атомов в молекуле, места кратных связей и их кратности), называемых люмиколхицинами (lumicolchicines) (Chapman et al., 1963). Люмиколхицины используются в качестве отрицательного контроля в исследованиях с использованием колхицина.

Еще одним препаратом, структурно напоминающим колхицин, является комбретастатин А4 (combretastatin А4), выделенный путем фракционирования экстрактов *Combretum cuftrum* (Pettit et al., 1995). Он связывается с тубулином быстрее, чем колхицин, но при этом показывает схожую картину деполимеризации МТ (Lin et al., 1989). Также было обнаружено нитробензольное производное комбретастатина А4 («клетчатый» комбретастатин; “caged” combretastatin), которое является удобным инструментом для пространственно-временного контроля полимеризации МТ с противоположными свойствами колцемида, поскольку данное вещество не инактивируется при воздействии УФ излучения, а наоборот происходит его активация (Wuhr et al., 2010). Так, фотоактивация «клетчатого» комбретастатина при использовании конфокальной микроскопии позволила осуществить локальную индукцию деполимеризации МТ в эмбрионах рыбок *zebrafish*, что выявило динеин-опосредуемую силу, которая «тянет» МТ к centrosomам (Hamaguchi, Hiramoto, 1986).

Нокодазол был разработан De Brabander и коллегами (De Brabander et al., 1976) и является, пожалуй, наиболее используемым препаратом для деполимеризации МТ клеточными биологами (не используется в качестве клинического препарата). Нокодазол связывается с β -тубулином и блокирует полимеризацию МТ, но механизм связывания изучен не так хорошо, как в случае колхицина. Добавление нокодазола к клеткам млекопитающих применяется для клеточного ареста в митозе, а при вымывании препарата происходит высвобождение клеток и их переход на стадию цитокинеза и G₁. Однако использование нокодазола с концентрацией выше ~500 нМ приводит к митотическому аресту, причем в клетках снижается количество либо совсем отсутствуют МТ, а также нарушена регуляция митотических киназ (De Brabander et al., 1976).

Помимо описанных выше способов деполимеризации МТ химическими веществами, существует иной метод – холодовая обработка, которую также активно применяют для исследования структуры и функций МТ. В основе данного метода находится теория динамического равновесия, разработанная Inoue (Inoue, 1952, 1964), согласно которой при любой обработке (холодом, колхицином и т. д.) происходит нарушение равновесия в гетеродимерах тубулина между α - и β -субъединицами. Однако так как холодовая обработка исключает воздействие каких-либо веществ на клетку, полученные результаты (при исследовании митоза, функций МТ, воздействия снижения количества белков на сборку ВД и т. д.) отображают картину, более схожую с той, что происходит в клетке, с которой не совершалось каких-либо манипуляций.

1.5. Культивируемые клеточные линии *D. melanogaster*

Культивируемые культуры клеток *D. melanogaster* стали неотъемлемой частью в разного рода исследованиях и являются удобной модельной системой для исследования процесса клеточного деления. Митоз дрозофилы – полузакрытый. Особенность данного типа митоза заключается в том, что в прометафазе ядерная оболочка не разрушается полностью, а лишь фрагментируется, образуя при этом контур из мембран, которые ограничивают область ВД, – так называемую оболочку ВД (Sazer et al., 2014; Strunov et al., 2016).

Клеточные линии дрозофилы первоначально были получены из эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития (Echalier et al., 1969; Какраков et al., 1969; Mosna, Dolfini, 1972; Schneider, 1972), которые по-прежнему являются наиболее распространенным исходным материалом для создания новых клеточных линий (Simcox et al., 2008; Lecland et al., 2013). Было обнаружено, что некоторые из этих клеточных линий обладают свойствами, характерными для гемоцитов (Lunstrum et al., 1988; Andres, Cherbas, 1992). В 80-90-е годы XX века клеточные линии также были получены из тканей личинок третьего возраста: имагинальных дисков (Ui et al., 1987; Currie et al., 1988) и нервных ганглиев (Ui et al., 1994). Например, клеточная линия fGS/OSS была получена из смеси зародышевых и соматических клеток оболочки яичников особей, мутантных по

гену *bam* (Niki et al., 2006); две производные линии клеток, полученные из fGS/OSS, содержат только соматические клетки (Saito et al., 2009).

Созданный в 2003 году центр «The *Drosophila* Genomics Resource Center» (DGRC) сделал доступными для научного сообщества более 150 разнообразных клеточных линий. Помимо этого, реализация проекта «Model Organism Encyclopedia of DNA elements» (modENCODE, 2007-2012) привела к получению огромного количества высококачественных общедоступных геномных данных о клеточных линиях дрозофилы, включая данные о хроматиновых метках (Kharchenko et al., 2011; Riddle et al., 2011, 2012), инсуляторах (Schwartz et al., 2012) и вариантах гистонов (Henikoff et al., 2009) для четырех «основных» клеточных линий: Kc167 и S2-DRSC (получены из эмбрионов); CME C1.8+ (получена из крыловых имагинальных дисков); ML-DmBG3-c2 (получена из нервных ганглиев). Помимо этого, были получены данные относительно транскрипционной активности генов в четырех «основных» и 23 дополнительных клеточных линиях (Cherbas et al., 2011; Wen et al., 2014; Brown et al., 2014). Только около 3000 генов экспрессируются на достаточном для идентификации уровне в клеточных линиях, на которых были проведены исследования проекта modENCODE (Cherbas et al., 2011). Некоторые из этих генов повсеместно экспрессируются во всех клеточных линиях на более высоком уровне, чем в интактном (не подвергавшемся экспериментальному воздействию) организме, что, вероятно, связано с пролиферацией и бессмертием данных клеточных линий. В целом, клеточные линии демонстрируют признаки и свойства, характерные для клеток-прародителей с наложением транскрипционных свойств, характерных для клеточных линий (Cherbas, Gong, 2014).

Клеточные линии, без сомнения, не являются «нормальными» клетками в классическом понимании этого слова. Так, при долгосрочном культивировании может происходить элиминация хромосом либо полиплоидизация (например, линии клеток S2 и Kc167 являются тетраплоидными), а также возникновение мутантных субпопуляций, из-за чего культура клеток становится неоднородной (Baust et al., 2017). Из-за отсутствия гуморального контроля со стороны организма повышается доля клеток с нарушением митоза (трех- и четырехполюсные ВД, асимметричное расхождение хромосом). По этим причинам необходимо тщательно подходить к выбору экспериментов, для которых конкретная клеточная линия подходит, а также

подтверждать полученные результаты *in vivo* (на уровне организма), так как во всех клеточных линиях произошли существенные геномные перестройки (Lee et al., 2014; Cherbas L, Cherbas P, 1997), из-за чего характеристики и свойства данных клеток не схожи с таковыми у исходных клеток.

В настоящее время культивируемые клетки S2 (Schneider's 2) дрозофилы широко используются многими лабораториями для изучения клеточной морфологии и процесса митоза благодаря простоте выполнения и высокой эффективности процедуры РНК-и. Важно отметить, что была описана вариабельность митоза даже в клетках, не подвергавшихся РНК-и, и поэтому при работе с данной культурой клеток рекомендуется тщательнее подходить к выбору контроля (Goshima, 2010). Линия S2 получена из поздних эмбрионов дрозофилы (20-24 часа после оплодотворения) в 1970 г. Было показано, что исходные клетки линии S2 имеют диаметр 5-11 мкм (Schneider, 1972); кариотип женский, тетраплоидный (Lee et al., 2014); клетки имеют округлую форму, иногда образуют небольшие выросты; митотический индекс составляет $6,05 \pm 0,77$ (Strunov et al., 2016). Данные транскриптомного анализа показали, что клетки линии S2 дрозофилы произошли из клеток гемоцитарного ряда и экспрессируют некоторые маркеры, характерные для кристаллических и плазматических клеток (Cherbas et al., 2011). При использовании световой микроскопии было установлено, что ВД в линии клеток S2, как и во многих других клетках дрозофилы (за исключением мейоза ооцитов), является амфиастральным, то есть формируется centrosомо-зависимым способом, но в случае утраты МТОС клетки способны прибегать к альтернативному, анастральному кинетохор-зависимому способу (Kwon et al., 2004).

1.6. Заключение

Кинетохор-зависимое формирование МТ вносит большой вклад в процесс сборки функционального ВД, играющего ключевую роль в клеточном делении. В последние годы появляется все больше данных о множестве белков и белковых комплексах, задействованных в формировании кинетохорных волокон МТ, для которых характерна определенная локализация и функции на каждой стадии клеточного деления. Так, в исследованиях на клетках человека, лягушки и дрозофилы

был идентифицирован ряд белков, контролирующих кинетохор-зависимое формирование МТ. В исследованиях на клетках человека было показано, что данный процесс ингибируется при снижении количества белков TPX2, HURP, Aurora A, Aurora B или INCENP, но при этом не происходит нарушения формирования МТ от centrosom (Tulu et al., 2006; Torosantucci et al., 2008; Kallio et al., 2002; Koffa et al., 2006; Casanova et al., 2008). В клетках мозга личинок дрозофилы кинетохор-зависимый повторный рост МТ ингибируется снижением количества белка Misato (Mst), взаимодействующего с комплексами Tubulin Chaperone Protein-1 (TCP-1) и Tubulin Prefoldin, которые также необходимы для кинетохор-зависимого повторного роста МТ (Mottier-Pavie et al., 2011; Palumbo et al., 2015). Другими факторами, необходимыми для эффективного повторного роста МТ от хромосом и/или кинетохоров в соматических клетках дрозофилы являются МТ-связывающий белок Ensconsin (Ens), гомологичный белку MAP7 человека (Gallaud et al., 2014), γ -тубулин и МТ-полимераза Msps (TOGp) (Bucciarelli et al., 2009). Также в клетках млекопитающих при снижении количества комплекса MCRS1-KANSL1-KANSL3, взаимодействующего с минус-концами МТ (Meunier, Vernos, 2011; Meunier et al., 2015), и из-за нарушений в привлечении тубулина на кинетохоры комплексом Nup107-160 (Mishra et al., 2010) кинетохор-зависимый повторный рост МТ снижается. Результаты вышеописанных исследований указывают на то, что факторы, участвующие в кинетохор-зависимом росте МТ, активно изучаются на момент написания данной работы. Однако, несмотря на это, механизм и большинство белков-участников кинетохор-зависимого формирования ВД в настоящее время все еще остаются плохо изученными и требуют тщательного исследования.

По результатам анализа литературных данных, для данного исследования были отобраны следующие белки: 1) для которых ранее было показано участие в сборке ВД, таких как белки Mars (HURP; здесь и далее в скобках указан человеческий гомолог) и Mei-38 (TPX2); 2) факторов, связанных с плюс-концами МТ – белков Eb1 (MAPRE1/EB1) и Mast (CLASP1); 3) малоизученного белка Non3 (RPF2), который вероятно играет роль в формировании ВД. Использование процедуры РНК-и в сочетании с методом коллемеидной либо холодной обработки клеток позволит детально изучить роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei 38 и Mast в процессе повторного роста МТ от хромосом и/или кинетохоров в культивируемых клетках S2 дрозофилы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В качестве материала для исследования были использованы эмбриональные клеточные линии S2 *D. melanogaster* дикого типа (Schneider, 1972), любезно предоставленные профессором Маурицио Гатти (университет La Sapienza, Рим, Италия) и трансгенные линии клеток S2 дрозофилы, экспрессирующие гибридный белок mCherry- α -тубулин либо mScarlet- α -тубулин в сочетании с исследуемыми белками, слитыми с флуоресцентным белком eGFP, полученные Яринич Л.А. (сотрудник лаборатории клеточного деления (ЛКД) ИМКБ СО РАН) (Таблица 6, см. п. 2.2.3.3.).

2.2. Методы

2.2.1. Молекулярно-биологические методы

2.2.1.1. Амплификация ДНК при помощи ПЦР

Фрагменты ДНК изучаемых генов (для последующего синтеза молекул дцРНК и выполнения процедуры РНК-и) получали при помощи метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы геномную ДНК (гДНК) или кДНК-библиотеку, созданную на основе мРНК 0–24-часовых эмбрионов *D. melanogaster*, а также специфические олигонуклеотидные праймеры (Таблица 1; кроме праймеров pBS-F1 и pBS-R1).

Реакционная смесь объемом 50 мкл включала в себя: 10 мкл 5× буфера HF для Phusion-полимеразы (ThermoScientific, США); 4 мкл 2,5 мМ dNTP (дезоксинуклеозидтрифосфата) (эквимольной смеси dATP, dCTP, dGTP, dTTP); по 2 мкл 10 мкМ прямого и обратного праймера; 0,5 мкл Phusion-полимеразы (2 е.а./мкл); 1 пг кДНК-матрицы (в случае гДНК использовали 10 нг). Реакцию ПЦР проводили на амплификаторе Bio-Rad (США) по следующей программе: денатурация ДНК 98°C – 1 мин с последующей амплификацией (35 циклов):

98°C – 30 сек; 45–62°C (в зависимости от температуры отжига праймеров) – 20 сек; 72°C – 1,5 мин. После циклической амплификации – элонгация при 72°C – 5–10 мин.

Таблица 1. Характеристика олигонуклеотидных праймеров, использованных для амплификации интересующих фрагментов ДНК.

Название праймера	Последовательность праймера (5'→3') *	Температура отжига, °C **	Ожидаемый размер продукта ПЦР, п.н.
Mars-5'	*tgaactcgcgct	54,1	614 (гДНК или кДНК)
Mars-3'	*aactgctgcaga	46,5	
Mast-5'	*cgttctcggagc	66,4	950 (гДНК или кДНК)
Mast-3'	*atgtccacgaag	53,9	
Non3-5'	*tggtgctggccag	59,8	770 (гДНК) 724 (кДНК)
Non3-3'	*gcgtctgtgctaag	60,5	
mei-38-5'	*cgtccaaggatg	45,1	653 (гДНК или кДНК)
mei-38-3'	*tggaagggtctg	45,7	
Eb1-5'	*tgctgccgcgca	63,4	547 (гДНК) 363 (кДНК) ****
Eb1-3'	*tggtgcatcgtcaggc	60,2	
pBS-F1 ***	cagggttttcccagtcacgac	62,6	зависит от размера встройки
pBS-R1 ***	ggctttacactttatgcttcc	59,3	

* На 5' конце олигонуклеотидных праймеров располагается последовательность ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГАГГ (5'→3') – последовательность промотора РНК-полимеразы Т7 (Milligan et al., 1987) (не показана в таблице). ** Расчетная температура отжига уникальных частей олигонуклеотидных праймеров (без последовательности промотора РНК-полимеразы Т7). Расчет температуры производился при помощи онлайн-ресурса New BioLabs Tm Calculator v.1.9.7 (<http://tmcaculator.neb.com>). *** Данные праймеры специфичны к векторной ДНК pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, США), они фланкируют место клонирования встройки в данный вектор. **** При амплификации ПЦР-фрагмента с использованием данных праймеров в качестве матрицы использовали кДНК-библиотеку.

2.2.1.2. Электрофорез в агарозном геле

Фрагменты ДНК, полученные после амплификации, смешивали с 10× раствором для нанесения (50% глицерин; 0,2% бромфеноловый синий) в соотношении 10:1 и разделяли в 1% агарозном геле, приготовленном на 1× ТАЕ буфере (40 мМ Трис-НСl (рН 8,0); 20 мМ уксуснокислый натрий; 1 мМ ЭДТА) с 10 мкг/мкл бромистого этидия, при напряженности поля 2,5 В/см 40–60 мин. Результат электрофореза детектировали под УФ излучением на приборе ChemiDoc

XRS System (Bio-Rad, США). Фрагмент геля, содержащий нужный ПЦР-продукт, вырезали для дальнейшей очистки.

2.2.1.3. Выделение ДНК из агарозного геля

Выделение фрагмента ДНК из агарозного геля проводилось с использованием набора «Для элюции ДНК из агарозного геля» (Биосилика, Россия) по прилагаемой фирмой-производителем методике.

2.2.1.4. Лигирование фрагментов ДНК

Расчет соотношения количества вектора и вставки осуществляли исходя из молярного соотношения вектор/вставка, равного 1:3. Реакцию лигирования проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, включающей в себя: 1 е.а./мкл ДНК-лигазы фага T4; 2 мкл 10× реакционного буфера (50 мМ Трис-НСl (рН 7,8 при 25°C); 10 мМ MgCl₂; 10 мМ ДТТ; 1 мМ АТФ; 25 мкг/мл БСА); 37,5 фмоль встраиваемого фрагмента ДНК; 12,5 фмоль векторной ДНК pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, США). Лигирование проводили при 4°C 12–14 часов.

2.2.1.5. Очистка лигазной смеси осаждением этанолом

Так как лигазная смесь является токсичной для клеток *E. coli*, то перед трансформацией ее необходимо очистить. Для этого к лигазной смеси добавляли: 40 мкл деионизованной воды; 5 мкл 3М NaAc (рН 5,2); 125 мкл 96% этанола. Затем смесь инкубировали при -70°C 30 мин, после центрифугировали ($18 \times 10^3 g$, 4°C, 20 мин). Полученный осадок промывали 500 мкл охлажденного 70% этанола, после чего центрифугировали ($18 \times 10^3 g$, 4°C, 10 мин). Осадок сушили при комнатной температуре 15–20 мин, после ресуспендировали в 20 мкл деионизованной воды.

2.2.1.6. Электрокомпетентные клетки *E. coli*

Приготовление стартовой культуры: петлей либо стерильной зубочисткой вносили одну колонию штамма Top-10 бактерий *E. coli* в пробирку с 10 мл среды LB (10 г/л NaCl; 10 г/л триптон; 5 г/л дрожжевой экстракт; pH 7,5), стерилизованной автоклавированием, содержащей 12 мкг/мл тетрациклина (Applichem, Германия). Инкубировали в течение ночи на орбитальном шейкере (37°C, 250 об/мин). Затем 1 мл стартовой культуры вносили в 1 литр свежей среды LB и наращивали на орбитальном шейкере при 37°C до лог-фазы $D_{600} \sim 0,5-0,7$ (около 2,5–3 часов). Клетки охлаждали на льду 20 мин и центрифугировали ($2,5-3 \times 10^3 g$, 4°C, 10 мин). Осадок полученных электрокомпетентных клеток промывали деионизованной водой с последующим центрифугированием ($2,5-3 \times 10^3 g$, 4°C, 5 мин). Осадок клеток разводили в 1 мл 10% глицерина и аликвотировали получившуюся клеточную суспензию по 40 мкл в пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf, Германия), после чего хранили при -70°C для последующей трансформации.

2.2.1.7. Трансформация электрокомпетентных клеток *E. coli*

Кювету с зазором 0,1 см, используемую для электропорации (Bio-Rad, США), предварительно охлаждали на льду 10 мин. $\sim 1,5 \times 10^8$ электрокомпетентных клеток *E. coli* в объеме 40 мкл оттаивали на льду 10 мин, добавляли к ним 1 мкл очищенной лигазной смеси и выдерживали на льду 5 мин. Затем переносили смесь в охлажденную кювету и подвергали электропорации при помощи прибора Gene PulserX cell Microbial System (Bio-Rad, США) при 1,8 кВ, 25 мкФ, 200 Ом, после чего клеточную суспензию немедленно вымывали из кюветы добавлением 500–1000 мкл предварительно нагретой до 37°C среды LB и переносили в пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf, Германия). Клетки инкубировали на орбитальном шейкере при 37°C и 220 об/мин 45–60 мин. Далее 100 мкл полученной клеточной суспензии высевали на чашки Петри с селективной питательной средой (LB-агар) содержащей 100 мкг/мл ампициллина (СИНТЕЗ, Россия) и 40 мкг/мл X-gal (Fermentas, США) и растирали стерильным шпателем или стерильными стеклянными шариками. Клетки

выращивали в термостате 16–18 часов при 37°C до появления колоний, чашки с которыми затем хранили при 4°C (не более двух недель).

2.2.1.8. ПЦР-проверка трансформированных клеток *E. coli*

Проверку наличия встраивания фрагмента в плазмидный вектор pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, США) в колониях, полученных после трансформации бактерий *E. coli*, проверяли методом ПЦР (см. п. 2.2.1.1.). В качестве матрицы использовались отдельные колонии, предварительно ресуспендированные в 10 мкл деионизованной воды, пробирки с которыми во время проведения ПЦР-проверки хранились при 4°C. Для проверки использовались праймеры pBS-F1 и pBS-R1, специфичные к последовательности вектора и фланкирующие место клонированной встройки (Таблица 1). Размеры вставки определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (см. п. 2.2.1.2.). Отобранные клоны бактерий использовали для наработки плазмидной ДНК.

2.2.1.9. Выделение плазмидной ДНК

Колонии клеток *E. coli*, содержащие (предположительно) правильные плазмидные конструкции, инкубировали на орбитальном шейкере в 10 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина (СИНТЕЗ, Россия), при 37°C и 220 об/мин 16–18 часов. Плазмидную ДНК из полученных клеток выделяли набором «Для выделения плазмидной ДНК» (Биосилика, Россия) по прилагаемому фирмой-производителем протоколу. Концентрацию полученного раствора ДНК определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США), чистоту препарата плазмидной ДНК определяли по соотношениям A_{260}/A_{280} (в норме $\geq 1,9$) и A_{260}/A_{230} (в норме ≥ 2).

2.2.1.10. Определение нуклеотидной последовательности ДНК (по Сэнгеру)

Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit»

(ThermoScientific, США). Реакционная смесь объемом 10 мкл включала: 2 мкл 5× буфера BigDye Terminator; 0,6 мкл BigDye Terminator v3.1; 1 мкл 10 мкМ праймера; 300 нг ДНК. Условия реакции: предварительная денатурация ДНК при 96°C – 1 мин с последующей амплификацией (35 циклов): 96°C – 30 сек, 56°C – 30 сек, 60°C – 4 мин. Для секвенирования использовались праймеры pBS-F1 и pBS-R1, специфичные к последовательностям вектора и фланкирующие место клонированной встройки (Таблица 1).

После окончания реакции полученную смесь очищали следующим образом: добавляли 50 мкл деионизованной воды, затем образец переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (Eppendorf, Германия) и добавляли 90 мкл изопропанола (конечная концентрация в растворе 60%), инкубировали при комнатной температуре 20 мин, предварительно закрыв образцы от воздействия света фольгой. Далее центрифугировали (14×10^3 g, 22°C, 20 мин). После отбирали супернатант и промывали осадок 200 мкл охлажденного 70% этанола с последующим центрифугированием (14×10^3 g, 4°C, 10 мин). Данную процедуру отмывки повторяли еще один раз. Затем отбирали супернатант, оставляя ~15–20 мкл жидкости. Полученный фрагмент ДНК высушивали при помощи центрифуги Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Германия) в режиме V-AL 30 мин при комнатной температуре. Секвенирование проводили с помощью капиллярного секвенатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) на базе центра коллективного пользования (ЦКП) ИМКБ СО РАН.

2.2.1.11. Синтез дцРНК

Синтез дцРНК осуществляли методом *in vitro* транскрипции при использовании ДНК-зависимой РНК-полимеразы T7 (ThermoScientific, США) и RiboLock RNase Inhibitor (40 е.а./мкл) (ThermoScientific, США) согласно прилагаемым фирменным протоколам. При этом соблюдался ряд правил (применялись для всех процедур, связанных с работой с РНК): работа в специальном ламинарном боксе для работ только с РНК, обработанном реагентом RNase Zap (Ambien, Литва), использование отдельного набора пипеток (для работ только с РНК) и наконечников с фильтрами.

2.2.1.12. Очистка дцРНК перед проведением РНК-интерференции

Очистку дцРНК от ДНК проводили с использованием фермента DNase I (1 е.а./мкл) (Megascript Kit, Life Technology, Ambion, Литва). К каждому 150 мкл дцРНК добавляли 2 мкл фермента DNase I и инкубировали смесь при 37°C 15 мин. Далее добавляли 600 мкл 96% этанола и 150 мкл раствора, содержащего 5 мМ ацетат аммония и 100 мМ ЭДТА. Смесь инкубировали при -20°C 1 час, затем центрифугировали (18×10^3 g, 4°C, 30 мин). Отбирали супернатант, оставляя ~100 мкл жидкости. Промывали осадок 700 мкл охлажденного (при -20°C) 70% этанола, центрифугировали (18×10^3 g, 4°C, 30 мин). Осадок сушили при 37°C 10–15 мин и растворяли в 50 мкл стерильной воды, свободной от ДНКаз и РНКаз (Биолабмикс, Россия).

2.2.1.13. Выделение тотальной РНК

Для выделения тотальной РНК использовали $2-3 \times 10^6$ клеток S2 дрозофилы и реагент «RNAzol® RT» (Molecular Research Center, Inc., США). Процедуру выполняли в полном соответствии с инструкцией производителя. Геномную ДНК удаляли при помощи «RapidOut DNA Removal Kit» (ThermoScientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. После концентрации РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США), и по соотношению A_{260}/A_{280} (в норме $\geq 1,9$) оценивали чистоту выделенного препарата. Чистоту и качество полученной тотальной РНК также проверяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле (см. п. 2.2.1.2.). Пробы тотальной РНК хранили при -70°C в течение 1 года.

2.2.1.14. Обратная транскрипция

Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции в 20 мкл реакционной смеси с использованием «RevertAid reverse transcriptase» (ThermoScientific, США) и «RNaseOut Recombinant RNase Inhibitor» (ThermoScientific, США). 2 мкг тотальной РНК, растворенной в 12,5 мкл стерильной воды, свободной от ДНКаз и РНКаз (Биолабмикс, Россия), смешивали с 1 мкл 50 мМ

олиго-(dT)₂₀ праймера (Биоссет, Россия), с последующим отжигом праймеров на матрице РНК при 65°C 5 мин в амплификаторе с последующим немедленным охлаждением в течение 2 мин на льду. Далее 13,5 мкл полученного образца добавляли к реакционной смеси, содержащей: 4 мкл 5× First-Strand Buffer (ThermoScientific, США); 1 мкл RNaseOut Recombinant RNase Inhibitor; 0,5 мкл RevertAid reverse transcriptase (200 е.а./мкл); 1 мкл 10 мМ dNTP. Реакцию проводили 1 час при 42°C. Для приготовления контроля на загрязнение гДНК (no-reverse transcription control; NRT) к образцу кДНК добавлялась реакционная смесь, в которой RNaseOut Recombinant RNase Inhibitor и RevertAid reverse transcriptase были заменены на эквивалентное количество воды, свободной от ДНКаз и РНКаз (Биолабмикс, Россия). Пробы кДНК хранили при -20°C.

2.2.1.15. Количественная ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени

Полученную в ходе обратной транскрипции кДНК разводили в 20 раз деионизованной водой и в количестве 5 мкл раствора кДНК добавляли к реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей: 12,5 мкл 2× HS-qPCR SYBR Blue (Биолабмикс, Россия); по 1,25 мкл 10 мМ праймеров (Таблица 2); 5 мкл деионизованной воды. Количественную ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) согласно протоколу производителя. Дизайн праймеров (Таблица 2) выполняли, используя программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>).

Для каждой пары праймеров эффективность определяли путем построения стандартной кривой с использованием разведений кДНК, полученной из клеток *S2* дрозофилы дикого типа, в соответствии с ранее опубликованными рекомендациями (Bustin et.al., 2009). Уровень экспрессии мРНК исследуемых генов был нормализован относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства *RpL32*. В качестве контроля на загрязнение гДНК использовались образцы, которые были синтезированы в отсутствие ревертазы (NRT); образцы, в которых кДНК была заменена деионизованной водой (no-template control; NTC), использовались в качестве отрицательного контроля. Температурный режим ПЦР включал начальную

денатурацию 5 мин при 95°C и последующие 39 циклов: 95°C – 15 сек; 60°C – 30 сек; 72°C – 30 сек. Специфичность целевого продукта устанавливали с помощью аналитического плавления по завершении процесса амплификации в диапазоне температур от 65°C до 95°C (шаг: + 0,05°C/сек). Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 2.1. Количество продукта амплификации рассчитывали по формуле $N = \Delta\Delta Cq$ с учетом разведения, где N – число копий гена, присутствовавших в реакции, Cq (quantification cycle) – количество циклов амплификации (Bustin et.al., 2009).

Таблица 2. Характеристика праймеров, использованных для анализа уровня экспрессии генов с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

Название праймера	Последовательность праймера (5'→3')	Температура отжига, °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Эффективность, %
RpL32-RT-F	ctaagctgtcgcacaaatgg	59	148	100,0
RpL32-RT-R	aggaacttcttgaatccgggtg			
Mast-RT-F	agacgctgagaaataaactagatgc	60	147	106,6
Mast-RT-R	gcagctttgggtgcatgtgta			
Mars-RT-F	cagacgacgggttaagaagaca	60	121	105,9
Mars-RT-R	gcgagacactaacaacgga			
mei-38-RT-F	tttgccagtcggacttcca	60	165 (mei-38-A) 168 (mei-38-B)	101,7
mei-38-RT-R	ctgttcccggccgatctct			
Eb1-RT-F	tctgcacaggtgcagcttactgtca	60	140	102,9
Eb1-RT-R	cttcttgaagcccgcctgca			
Non3-RT-F	cgcttttacgcatcaggaacc	60	113	102,8
Non3-RT-R	cttccttccgtccaaaaacagc			

2.2.2. Биохимические методы

2.2.2.1. Приготовление белковых лизатов из клеток *S2 D. melanogaster* после процедуры РНК-интерференции

Исследуемые образцы клеток промывали буфером 1× PBS (137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 10 мМ Na₂HPO₄; 2 мМ KH₂PO₄) (Sigma-Aldrich, США) с последующим лизисом в буфере RIPA (50 мМ Трис-HCl (pH 8,0); 150 мМ NaCl; 1% TritonX-100;

0,5% дезоксихолат натрия; 0,1% SDS; 1 мМ ЭДТА; 0,5 мМ ЭГТА (этиленгликольтетрауксусная кислота)) в присутствии 1 мМ ДТТ, 1 мМ Na₂S₂O₅ и «Halt Protease and Phosphatase Inhibitor cocktail» (ThermoScientific, США). Клеточный детрит удаляли центрифугированием (15×10³ g, 4°C, 15 мин). Концентрацию белка в полученных лизатах определяли по методу Лоури с использованием набора «Pierce Microplate BCA Protein assay Kit – Reducing Agent Compatible» (ThermoScientific, США) согласно протоколу производителя.

2.2.2.2. Электрофорез и Вестерн-блоттинг

Электрофоретическое разделение белков проводили в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (в присутствии SDS) с использованием камеры для вертикального электрофореза (Bio-Rad, США). Состав электродного буфера: 2,5 мМ Трис-НСl; 1,92 мМ глицин; 0,01% SDS. Электрофорез осуществляли при постоянном напряжении 100 В в концентрирующем геле, 110–120 В в разделяющем геле (Таблица 3).

Таблица 3. Составы концентрирующего и разделяющего полиакриламидных гелей.

Компоненты	Концентрирующий гель (5%)	Разделяющий гель (10%)
деионизованная вода	2,85 мл	4,1 мл
30% акриламид: бисакриламид (37,5:1)	0,85 мл	3,3 мл
0,5 М Трис-НСl (рН 6,8)	1,25 мл	–
1,5 М Трис-НСl (рН 8,8)	–	2,5 мл
10% SDS	50 мкл	100 мкл
10% персульфат аммония	25 мкл	50 мкл
TEMED	5 мкл	10 мкл

Разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (размер пор 0,45 мкм) (Bio-Rad, США). Мокрый перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в буфере для переноса (2,5 мМ Трис-НСl; 19,2 мМ глицин; 20% метанол) при постоянном токе 250 мА 1,5 часа. Далее мембрану блокировали в растворе PBST (1×PBS; 0,1% Triton-X100), содержащем 2% сухого

молока, 30 мин при комнатной температуре. Инкубацию с поликлональными первичными антителами (Таблица 4) проводили в течение 12–14 часов при 4°C. После трехкратной промывки в растворе PBST мембраны инкубировали с вторичными антителами (антитела козы против мыши IgG, разведение 1:3500; Life Technology, кат. № G-21040), конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP-конъюгаты), при комнатной температуре 1 час. Детекция производилась после трехкратной промывки мембран раствором PBST с использованием набора реагентов «Novex® ECL» (Invitrogen, США) и системы для хемилюминесцентной детекции Amersham™ Imager 600 (GE HealthCare, Великобритания).

Таблица 4. Первичные антитела, использованные для Вестерн-блот анализа.

Название	Организм	Источник	Разведение
Anti-β-tubulin (Bx69)	мышь	Предоставлены Н. Saumweber *	1:1000
Anti-Lamin Dm0	мышь	Hybridoma Bank (кат. № ADL67.10)	1:6000
Anti-Non3 (M4)	мышь	ЛКД ИМКБ СО РАН	1:5000

* Humboldt-Universität zu Berlin, Берлин, Германия.

2.2.3. Методы работы с клеточными культурами

2.2.3.1. Культивирование клеточных линий *S2 D. melanogaster*

Клеточная линия, используемая при колцевидной обработке (см. п. 2.2.3.4.), культивировалась при 25°C в среде Shields and Sang M3 (Sigma-Aldrich, США), содержащей 20% эмбриональной бычьей сыворотки (fetal bovine serum; FBS) (Gibco, Life Technologies, США), инактивированной тепловой обработкой (65°C, 1 час). Клеточная линия, используемая при холодной обработке (см. п. 2.2.3.4.), культивировалась при 25°C в среде Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% FBS (Gibco, Life Technologies, США), инактивированной тепловой обработкой (65°C, 1 час). Трансгенные линии клеток (см. п. 2.2.3.3.) культивировались при 25°C в среде Shields and Sang M3 (Sigma-Aldrich, США), содержащей 5% FBS (Gibco, Life Technologies, США), инактивированной тепловой обработкой (65°C, 1 час).

2.2.3.2. РНК-интерференция

Суспензию клеток S2 дрософилы дикого типа в концентрации $0,9-1 \times 10^6$ клеток/мл центрифугировали ($1 \times 10^3 g$, $22^\circ C$, 5 мин), осадок ресуспендировали в 10 мл соответствующей среды для культивирования, не содержащей сыворотки. Подготовленную суспензию клеток вносили в 6-луночный планшет (TPP, Швейцария) из расчета 1 мл на лунку и добавляли к ней дцРНК в количестве, необходимом для снижения количества транскриптов конкретного гена (Таблица 5). После инкубации в течение 1 часа при $25^\circ C$ доводили объем в каждой лунке до 3 мл средой для культивирования, содержащей FBS (Gibco, Life Technologies, США). Выбор среды для культивирования и процентного содержания сыворотки описан в п. 2.2.2.1. При необходимости, процедуру повторной интерференции проводили через несколько дней (Таблица 5). С контрольными образцами проводили те же манипуляции, не добавляя дцРНК. Условия проведения РНК-и были подобраны экспериментально (см. п. 3.2.1.).

Таблица 5. Условия проведения РНК-интерференции для каждого исследуемого гена.

Ген	Однократная доза дцРНК, мкг	Количество доз	Длительность, дни
<i>mast</i>	70	1	5
<i>mars</i>	80	1	4 или 5
<i>Non3</i>	25*	3	8 (3+2+3)
<i>Eb1</i>	60	1	5
<i>mei-38</i>	60	2	5 (3+2)

* Очищенная дцРНК.

2.2.3.3. Индукция экспрессии трансгенов в культивируемых клетках S2 *D. melanogaster*

Перед проведением экспериментов в трансгенных линиях клеток S2 дрософилы экспрессия генов целевых белков индуцировалась раствором сульфата меди (II) ($CuSO_4$) (Sigma-Aldrich, США). Условия проведения индукции (Таблица 6) были подобраны экспериментально (см. п. 3.2.2.).

Также в работе была использована трансгенная линия клеток S2+tubulin-GFP, любезно предоставленная профессором Маурицио Гатти (университет La Sapienza, Рим, Италия), для работы с которой не требуется проведение процедуры индукции.

Таблица 6. Условия индукции транскрипции генов целевых белков в трансгенных линиях клеток S2 дрозофилы.

Название клеточной линии	Концентрация индуктора, мМ	Время индукции, часы
S2 ~ pPB-pBac-MtnA[C273G]-mCherry-AlphaTub84B-pCoBlast-MtnA-Mast-eGFP	200	16
S2 ~ pPB-MtnA[C273G]-mCherry-AlphaTub84B-pCoBlast-MtnA-Eb1-eGFP	250	24
S2 ~ pPB-pBac-MtnA[C273G]-mCherry-AlphaTub84B-pCoBlast-MtnA-Mei-38A-eGFP	100	16
S2 ~ pPB-pBac-MtnA[C273G]-mCherry-AlphaTub84B-pCoBlast-MtnA-Mars-eGFP	200	22
S2 ~ pPB-MtnA[C273G]-mScarlet-AlphaTub84B-pCoBlast-MtnA-Non3-eGFP	100	22,5

2.2.3.4. Деполимеризация микротрубочек колцемидом либо холодом

При колцемидной обработке клеточную суспензию центрифугировали (1×10^3 g, 22°C, 5 мин), осадок ресуспендировали в среде для культивирования Shields and Sang M3 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 20% FBS (либо 5% FBS в случае трансгенных линий), содержащей 4 мкг/мл митостатика колцемидом (Calbiochem, Merck Millipore, Германия). Конечный объем используемой клеточной суспензии и среды с добавлением колцемидом зависел от количества временных точек; на один образец конечный объем – 2 мл. Далее клетки инкубировали в течение 3 часов при 25°C в инкубаторе для культивирования в чашке Петри (TPP, Швейцария). Концентрация колцемидом и время индукции были подобраны экспериментально (см. п. 3.1.1.).

В случае экспериментов по холодной обработке клеточную суспензию собирали в пробирки типа Falcon (объемом 15 мл) (Eppendorf, Германия) (для каждой временной точки отдельная пробирка), центрифугировали (1×10^3 g, 22°C, 5 мин). После чего отбирали среду, промывали клетки в 2 мл буфера $1 \times$ PBS (Sigma-Aldrich, США) и центрифугировали (1×10^3 g, 22°C, 5 мин). Затем убирали почти весь

буфер 1× PBS (оставляя ~100–150 мкл), аккуратно ресуспендировали осадок. Далее в случае холодной обработки при 0°C пробирки, в которых проводилась процедура центрифугирования и отмывки, помещались в емкость со льдом, которая затем все 3 часа инкубирования находилась в холодильнике при 4°C (время инкубации было подобрано экспериментально, см. п. 3.1.2.). В случае обработки более низкими температурами (-1°C либо -2°C) пробирки с суспензией клеток после центрифугирования и отмывки помещались на 3 часа в спиртовую баню с охлаждением, находящуюся в помещении с температурой +16-18°C. Спиртовую баню предварительно охлаждали до требуемой температуры; во время инкубации клеток постоянно осуществлялся мониторинг температуры.

2.2.3.5. Приготовление цитологических препаратов

2.2.3.5.1. Приготовление цитологических препаратов после колцемидной обработки

После инкубации клеток с колцемидом для приготовления образцов нулевой точки отбирали часть клеточной суспензии (2 мл/образец) без отмывки клеток от колцемидов в пробирки типа Falcon (объемом 15 мл) (Eppendorf, Германия) и центрифугировали (1×10^3 g, 22°C, 5 мин). Затем, перед фиксацией (описание ниже), осадок клеток промывали от возможных остатков колцемидов в 2 мл буфера 1× PBS (Sigma-Aldrich, США) и центрифугировали (1×10^3 g, 22°C, 5 мин).

Оставшуюся суспензию клеток промывали средой Shields and Sang M3 (Sigma-Aldrich, США), содержащей 20% FBS (либо 5% FBS в случае трансгенных линий) (объем среды равен ранее добавленному объему смеси «среда + колцемид» без вычитания объема, отобранного для нулевой точки), центрифугировали (1×10^3 g, 22°C, 5 мин) и удаляли среду. Данный шаг повторяли еще два раза, после чего к клеткам добавляли свежую аликвоту среды Shields and Sang M3 (Sigma-Aldrich, США), содержащей 20% FBS (либо 5% FBS в случае трансгенных линий). Конечный объем добавляемой к клеткам среды рассчитывался исходя из количества временных точек, на каждую из которых добавляли по 2 мл среды. Далее для удобства сбора и фиксации отдельных временных точек (20, 30, 45 и 75 мин после последней отмывки

клеток от колцемида; время было подобрано экспериментально, см. п. 3.1.1.) суспензия клеток разделялась по отдельным чашкам Петри диаметром 3 см (TPP, Швейцария) в объеме 2 мл/образец. По истечении времени после последней отмывки образцы клеток собирали в пробирки типа Falcon (объемом 15 мл) (Eppendorf, Германия) и центрифугировали (1×10^3 g, 22°C, 5 мин).

Для дальнейшего микроскопического анализа клетки фиксировали 7 мин 3,7% формальдегидом (Sigma-Aldrich, США) (разведен в буфере $1 \times$ PBS (Sigma-Aldrich, США)) в количестве 2 мл на образец. После фиксации образцов клеточную суспензию центрифугировали (1×10^3 g, 22°C, 5 мин), затем максимально убрали весь раствор фиксатора. Отмывка клеток после фиксации в буфере $1 \times$ PBS и дальнейшее осаждение осуществлялось путем центрифугирования (1×10^3 g, 22°C, 5 мин). После осадку клеток добавлялось небольшое количество буфера $1 \times$ PBS (~300–500 мкл, в зависимости от исходной концентрации клеток), полученную суспензию использовали для создания монослоя клеток на предметном стекле с помощью центрифуги Cytospin™ 4 Cytocentrifuge (ThermoScientific, США) (900 g, 22°C, 4 мин).

Готовые препараты замораживали в жидком азоте для фиксации клеток на предметном стекле, после чего промывали буфером $1 \times$ PBS 10 мин, пермеабелизовали в буфере PBST 30 мин, затем 30 мин блокировали неспецифическое связывание антител 3% BSA (bovine serum albumin; белок плазмы крови крупного рогатого скота) (разведен в буфере $1 \times$ PBS). Для разведения первичных (Таблица 7) и вторичных (Таблица 8) антител от стоковой концентрации до рабочей использовалась смесь 1:1 PBST и 3% BSA. Итоговый объем готовой смеси антител зависел от количества препаратов: первичные антитела – 15 мкл/препарат, вторичные антитела – 14 мкл/препарат. После нанесения антител препараты накрывали пленкой Парафилм М (Vemis, США) (размером около 20×20 мм) и помещали во влажную камеру во избежание высыхания смеси антител. Инкубацию препаратов с первичными антителами (Таблица 7) проводили в течение ночи при 4°C.

Таблица 7. Первичные антитела, использованные при иммуноокрашивании клеток S2 дрозофилы.

Название антител	Организм	Источник	Разведение
Anti- α -tubulin	Мышь	Sigma (кат. № T6199)	1:500
Anti-DSpd2	Кролик	Предоставлены М. Gatti *	1:4000
Anti-eGFP	Курица	Invitrogen (кат. № PA1-9533)	1:100–1:200

* Университет La Sapienza, Рим, Италия.

После инкубации препаратов с первичными антителами проводилась их отмывка (10 мин в буфере 1×PBS; 2 раза по 10 мин в буфере PBST; 5 мин в буфере 1×PBS) и последующая инкубация с соответствующими вторичными антителами (Таблица 8). После нанесения вторичных антител препараты накрывали пленкой Парафилм М (Bemis, США) (размером около 20×20 мм) и убирали во влажную камеру, закрытую от воздействия света, на 1 час при комнатной температуре.

Таблица 8. Вторичные антитела, конъюгированные с флуорофорами, использованные для детекции первичных антител.

Флуорофор	Тип антител	Сигнал флуорофора	Источник	Разведение
FITC	Антитела козы против мыши	Зеленый	Sigma, (кат. № F8264)	1:40
Alexa Fluor 568	Антитела козы против кролика	Красный	Invitrogen, (кат. № A11036)	1:300
Alexa Fluor 488	Антитела козы против курицы	Зеленый	Invitrogen, (кат. № A11039)	1:300

Затем проводилась отмывка препаратов (10 мин в буфере 1×PBS; 2 раза по 10 мин в буфере PBST; 5 мин в буфере 1×PBS). Готовые препараты высушивали при комнатной температуре в течение 1 часа и заключали в среду Vectashield, содержащую 1,5 мкг/мл DAPI (Vector laboratories, США) в количестве 13 мкл/препарат. Дальнейший анализ осуществлялся с использованием оборудования, описанного в п. 2.2.4.

2.2.3.5.2. Приготовление цитологических препаратов после холодной обработки

После 3 часов инкубации на льду клетки помещались на короткое время (на 30, 45, 60 и 180 сек) на 22°C в водяную баню, которая использовалась для удобства контроля постоянства температуры (температура и время были подобраны экспериментально, см. п. 3.1.2.). По истечении времени образцы без вынимания из водяной бани немедленно фиксировали 7 мин 3,7% формальдегидом (Sigma-Aldrich, США) (разведен в буфере 1×PBS (Sigma-Aldrich, США)) в количестве 2 мл на образец. Образцы нулевой точки фиксировали, не вынимая из льда, 2 мл/образец 3,7% формальдегида (Sigma-Aldrich, США) (разведен в буфере 1×PBS (Sigma-Aldrich, США)) 7 мин. Последующие после фиксации процедуры выполнялись по протоколу, описанному выше (см. п. 2.2.3.5.1.).

2.2.4. Микроскопия

2.2.4.1. Флуоресцентная микроскопия

Образцы клеток после фиксации и непрямого иммуноокрашивания (см. п. 2.2.3.5.) анализировали на микроскопе ZeissAxioImager.M2, используя объектив EC Plan-Neofluar 100×/1.30 Oil M27WD = 0,20 мм (CarlZeiss, Германия). Для съемки использовалась камера 506 mono (D) HighPerformance (CarlZeiss, Германия). Полученные изображения редактировались с помощью программы Adobe Photoshop CS3 Extended.

2.2.4.2. Конфокальная микроскопия

При исследовании прижизненной локализации белков суспензию клеток трансгенной линии S2 дрозофилы (Таблица 6) в концентрации $\sim 1 \times 10^6$ клеток/мл в объеме 500 мкл переносили на покровные стекла, обработанные 0,25 мг/мл конконавалина А (Sigma-Aldrich, США), установленные на дно камеры «Attofluor cell chamber» (Invitrogen, США), совместимой с конфокальным микроскопом. При

необходимости производилась прижизненная детекция хромосом ДНК-специфическим красителем Hoechst 33342 (конечная концентрация 20 мкг/мл; Invitrogen, кат. № H3570).

Эксперименты осуществлялись с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss, Германия) с объективом Plan-Apochromat oil 63× 1.4 NA (Carl Zeiss, Германия) на базе ЦКП ИМКБ СО РАН.

2.2.5. Измерения количественных параметров клеток на основе их микрофотографий

2.2.5.1. Измерение размера полюсных микротрубочек после холодной обработки

Размер полюсных МТ (также называемых астральными МТ или астрами) в контрольных и РНК-и клетках после холодной обработки (через 30 сек после возвращения на 22°C) измеряли с помощью программного обеспечения ZEN 2012 (Carl Zeiss, Германия), используя инструмент «Draw Circle» и функцию измерения площади. Для измерения использовались только клетки, подходящие по следующим параметрам: не полиплоидные; находящиеся на стадии прометафазы или метафазы; биполярные; centrosомы примерно одинакового размера, расположены не на одном полюсе ВД. Полученные значения для РНК-и клеток были нормализованы относительно медианного значения соответствующего контроля. После этого нормализованные данные использовали для построения графика с помощью программы BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>). Статистическую обработку данных осуществляли по описанному в п. 2.2.6. протоколу.

2.2.5.2. Измерение длины веретена деления

Длину ВД контрольных клеток и клеток после процедуры РНК-и исследуемых генов измеряли с помощью программного обеспечения ZEN 2012 (Carl Zeiss, Германия) с использованием инструмента «Spline curve» и функции измерения. При

измерении длины ВД использовалось кратчайшее расстояние между полюсами ВД. Для измерения использовались промета- и метафазные клетки, не полиплоидные, биполярные. Полученные данные использовали для построения графика с помощью программы **BoxPlotR** (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>). Статистическую обработку данных осуществляли по описанному в п. 2.2.6. протоколу.

2.2.5.3. Измерение интенсивности флуоресценции тубулина

Интенсивность флуоресценции повторно растущих пучков МТ от хромосом и/или кинетохоров после колцемидной обработки измеряли в программе **ImageJ** (Schneider et al., 2012) с помощью инструмента «Freehand selection tool» и функции «Measure». Для измерения использовались промета- и метафазные контрольные и РНК-и клетки через 30 мин после отмывки от колцемида. Для каждой клетки измерялась интенсивность флуоресценции всех связанных с хромосомами и/или кинетохорами пучков повторно растущих МТ, считалось среднее значение по нескольким измерениям в одной клетке, после чего вычиталась фоновая интенсивность флуоресценции. Полученные значения для РНК-и клеток были нормализованы относительно медианного значения соответствующего контроля. После этого нормализованные данные использовали для построения графика с помощью программы **BoxPlotR** (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>). Статистическую обработку данных осуществляли как описано в п. 2.2.6.

2.2.6. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку проводили с помощью программной среды **R** (<http://www.r-project.org/>). Достоверность различий оценивали при помощи критерия χ^2 (сравнение процентного соотношения) и двупарного *U*-критерия Манна - Уитни (оценка различий числовых значений). При построении доверительных интервалов на графиках рассчитывали 95% перцентиль по медиане. Различия являлись статистически достоверными при $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) и $p < 0,001$ (***)

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для понимания механизмов, лежащих в основе кинетохор-зависимого формирования МТ, используется подход, основанный на изучении повторного роста МТ (ПРМТ) от хромосом и/или кинетохоров после деполимеризации МТ колцемидной либо холодной обработкой. Считается, что такой ПРМТ имитирует формирование кинетохорных пучков МТ в клетках, которые не подвергались воздействию холода или колцемидной обработке (Vucciarelli et al., 2009). Метод деполимеризации ВД был применен по причине того, что в клетках рост МТ от центросом и кинетохоров происходит почти одновременно и очень быстро, и соответственно практически невозможно исследовать формирование МТ только от хромосом и/или кинетохоров.

Анализ ПРМТ проводился на клетках, находящихся на стадиях промета- и метафазы, поскольку кинетохоры в клетках на данных стадиях митоза обладают способностью управлять образованием к-волокон и, следовательно, сборкой ВД (Pavlova et al., 2016). Для визуализации хромосом использовался ДНК-специфический краситель DAPI, а для компонентов ВД – не прямое иммуноокрашивание антителами к центросомальному белку DSpd2 и компоненту микротрубочек белку α -тубулину.

3.1. Подбор условий проведения колцемидной или холодной обработки клеток *S2 D. melanogaster*

3.1.1. Повторный рост микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров после колцемидной обработки клеток *S2 D. melanogaster*

В первую очередь были проведены эксперименты по подбору условий деполимеризации МТ с помощью колцемидной обработки (сравнение различных концентраций колцемиды (3, 4 либо 5 мкг/мл) и времени обработки клеток (2, 3 либо 4 часа)). Двух часов обработки оказалось недостаточно для полной деполимеризации МТ колцемидом, а при сравнении результатов обработок клеток на протяжении 3 и 4 часов не было обнаружено разницы. В результате подбора

концентрации колцемида было показано, что через 3 часа обработки клеток колцемидом с концентрацией 3, 4 либо 5 мкг/мл доля клеток с деполимеризацией МТ составила 80%, 95% и 96%, соответственно. Поэтому в дальнейшей работе клетки S2 дрозофилы обрабатывали колцемидом с конечной концентрацией 4 мкг/мл на протяжении 3 часов.

Вдобавок был проанализирован ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров на различных временных точках после отмывки клеток от колцемида (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 и 75 мин). Точка 0 мин использовалась для оценки эффективности деполимеризации МТ колцемидом. При подсчете доли клеток с ПРМТ на временных точках 5 и 10 мин было обнаружено, что ПРМТ происходит в менее чем в 1,5% и 3% клеток, соответственно; для точек 15 и 20 мин, а также 45 и 60 мин не было показано существенной разницы между друг другом. Поэтому точки 5, 10, 15 и 60 мин в дальнейших экспериментах не использовались.

В нулевой момент времени ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров отсутствует, тубулин равномерно распределен в цитоплазме (Рисунок 8 Б, 0 мин). Через 20–30 мин после удаления колцемида в контрольных клетках возобновление роста МТ происходит только на хромосомах и/или кинетохорах (в 28,3% клеток через 20 мин и в 77% клеток через 30 мин), при этом ПРМТ вокруг центросом отсутствует (Рисунок 8 Б). Через 45 мин после удаления колцемида в клетках наблюдаются инициированные кинетохорами пучки МТ (в 95,3% случаев), которые еще через 30 мин (точка «75 мин») сближаются на полюсах ВД, давая начало двухполюсным ВД (72% клеток) (Рисунок 8 Б), в остальных клетках (28%) – сформирован как минимум один полюс ВД, второй начинает формироваться (Рисунок 8 Б).

Примечательно, что почти не наблюдалось явного возобновления формирования МТ от центросом (только в 5% клеток); в большинстве клеток были обнаружены ВД с полюсными МТ, не связанными с одной или с обеими центросомами (Рисунок 8 Б). Таким образом, было установлено что колцемидная обработка нарушает способность клеток формировать МТ от центросом, но не от кинетохоров. Полученные данные хорошо согласуются с исследованиями ПРМТ на клетках млекопитающих (Tulu et al., 2006; Torosantucci et al., 2008).

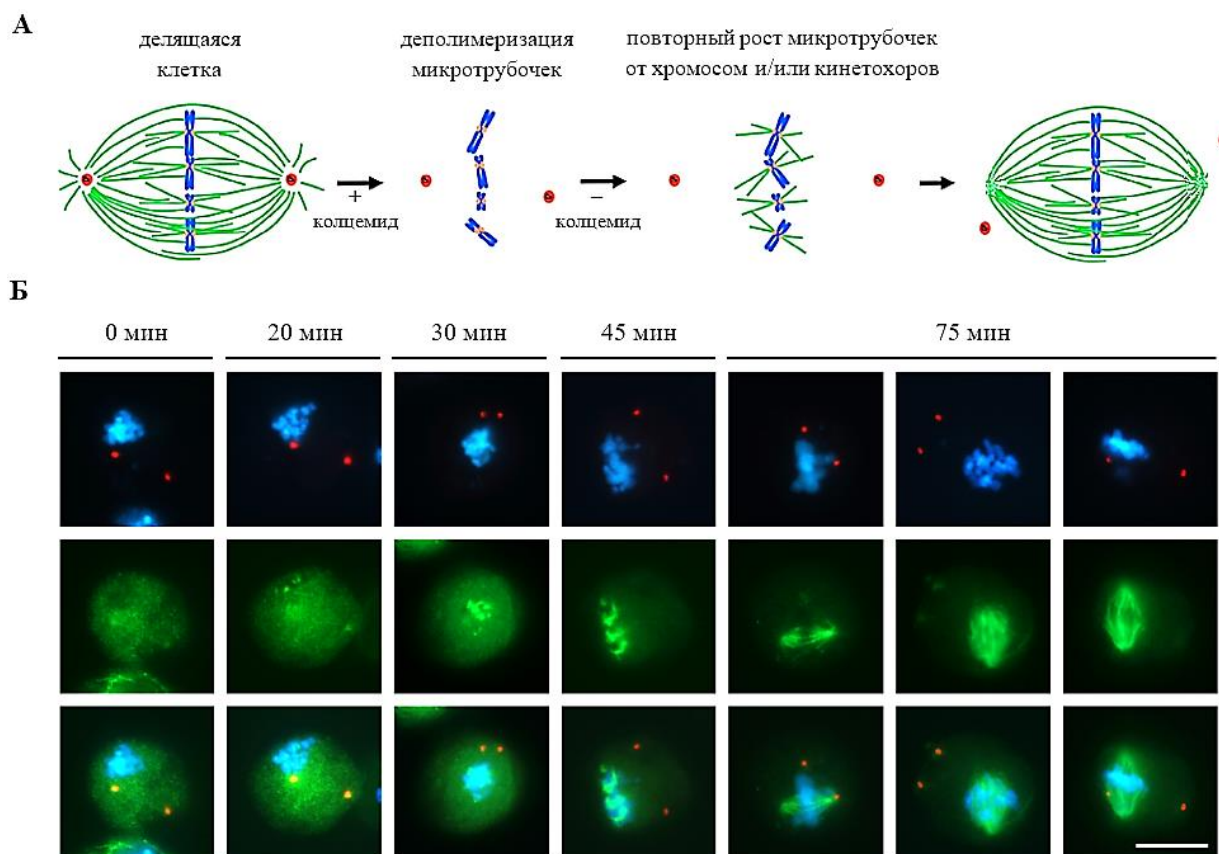


Рисунок 8. Повторный рост митотических микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров в контрольных клетках S2 дрозофилы после обработки колцемидом. **А.** Схема повторного роста микротрубочек после деполимеризации тубулина из (Gallaud et al., 2014; с модификациями). Зеленый цвет – микротрубочки, красный – centrosомы, синий – хромосомы. **Б.** Иммуноокрашенные клетки, зафиксированные через 0, 20, 30, 45 и 75 мин после отмытки клеток от колцемидом. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosом DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), а также ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

3.1.2. Повторный рост микротрубочек после холодной обработки клеток S2 *D. melanogaster*

Метод холодной обработки для изучения ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров использовался для подтверждения результатов, полученных после колцемидной обработки клеток S2 дрозофилы, поскольку холодная обработка исключает воздействие каких-либо веществ на клетку. Таким образом, можно ожидать, что полученные результаты в большей степени отображают картину, происходящую в клетке, с которой не совершалось каких-либо манипуляций.

Перед началом исследования ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров с помощью холодной обработки были подобраны условия проведения эксперимента. Так, было

показано, что необходимое время инкубации клеток на низкой температуре составляет 3 часа. При более коротких инкубациях доля клеток с полной деполимеризацией МТ составляет около 50–60%. Исследование промета- и метафазных клеток через 30 сек после возвращения на 22°C (описание подбора температуры обработки клеток и последующих временных точек их анализа см. ниже) показало, что характер ПРМТ зависит от температуры деполимеризации (0, -1 или -2°C) (Рисунок 9).

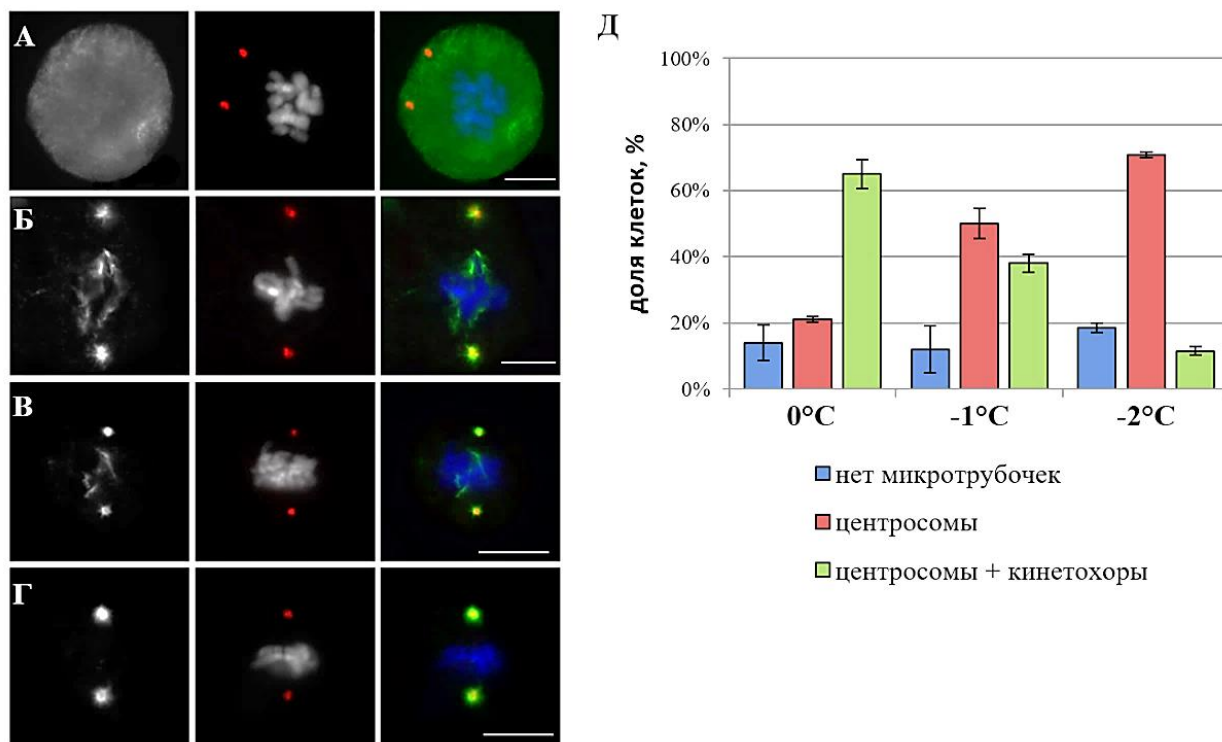


Рисунок 9. Повторный рост микротрубочек после холодной обработки клеток S2 дрозофилы. **А.** Клетка с деполимеризованными микротрубочками (временная точка 0 сек). **Б-Г.** Повторный рост микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров и центросом после обработки клеток холодом (временная точка 30 сек после возвращения клеток на 22°C): **Б.** при температуре 0°C; **В.** при температуре -1°C; **Г.** при температуре -2°C. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок центросом DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (серый/зеленый цвет), а также ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (серый/синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Масштаб – 10 мкм. **Д.** Доля клеток с повторным ростом микротрубочек через 30 сек после возвращения на 22°C от центросом («центросомы») либо как от центросом, так и от хромосом и/или кинетохоров («центросомы + кинетохоры»), а также доля клеток с отсутствием повторного роста микротрубочек («нет микротрубочек»). Указаны 95% доверительные интервалы для медиан.

Доля клеток с полностью деполимеризованными МТ (Рисунок 9 А) при использовании температур 0, -1 или -2°C составила 90%, 93% и 95% соответственно. Большинство клеток (65%), инкубированных при 0°C, демонстрировали как

зарождающиеся на хромосомах и/или кинетохорах пучки МТ, так и короткие, инициированные на центросомах полюсные МТ (21% случаев) (Рисунок 9 Б, Д). Использование температуры -1°C для деполимеризации МТ приводит к увеличению доли клеток с ПРМТ только от центросом (50% случаев) (Рисунок 9 В, Д). Однако в случае понижения температуры деполимеризации до -2°C наблюдается сильное изменение характера ПРМТ – 70% клеток демонстрировали инициирование ПРМТ только от центросом (Рисунок 9 Г, Д). Таким образом, температура 0°C является самой удачной для экспериментов по изучению ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров, так как доля клеток с ПРМТ от центросом значительно ниже, чем при использовании температуры -1°C или -2°C .

При подборе временных точек было установлено, что ПРМТ после холодной обработки происходит намного быстрее, чем после колцевидной. По этой причине были использованы временные точки 20, 30, 40, 60 и 180 сек после возвращения клеток на 22°C . Точка 0 сек использовалась для оценки эффективности деполимеризации МТ холодом. Температура 22°C была подобрана экспериментально. Было показано, что использование стандартной температуры культивирования клеток S2 дрозофилы (25°C) приводит к более быстрому ПРМТ.

В нулевой момент времени наблюдается практически полная деполимеризация МТ, белок тубулин равномерно распределяется в цитоплазме (Рисунок 9 А, 10 Б, 0 сек). Через 20–30 сек после возвращения клеток на 22°C наблюдается ПРМТ в виде коротких пучков, растущих от хромосом и/или кинетохоров, рост МТ от центросом отсутствует либо пучки МТ очень короткие, выглядят как отдельные точки и/или короткие пучки МТ (Рисунок 10 Б). Через 40 сек после возвращения клеток на 22°C ПРМТ наблюдается уже и от центросом. После 1–3 мин уже сложно определить, откуда берет начало тот или иной пучок МТ (Рисунок 10 Б). Через 3–5 мин инкубации клеток на 22°C ВД полностью восстанавливается.

По причине того, что на временной точке 20 сек количество клеток, демонстрирующих ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров очень небольшое (около 20%), а через 40 сек повторно растущие от центросом МТ становятся слишком большими и очень часто перекрывают таковые от хромосом и/или кинетохоров, то в дальнейшем для изучения процесса ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров, использовалась временная точка 30 сек.

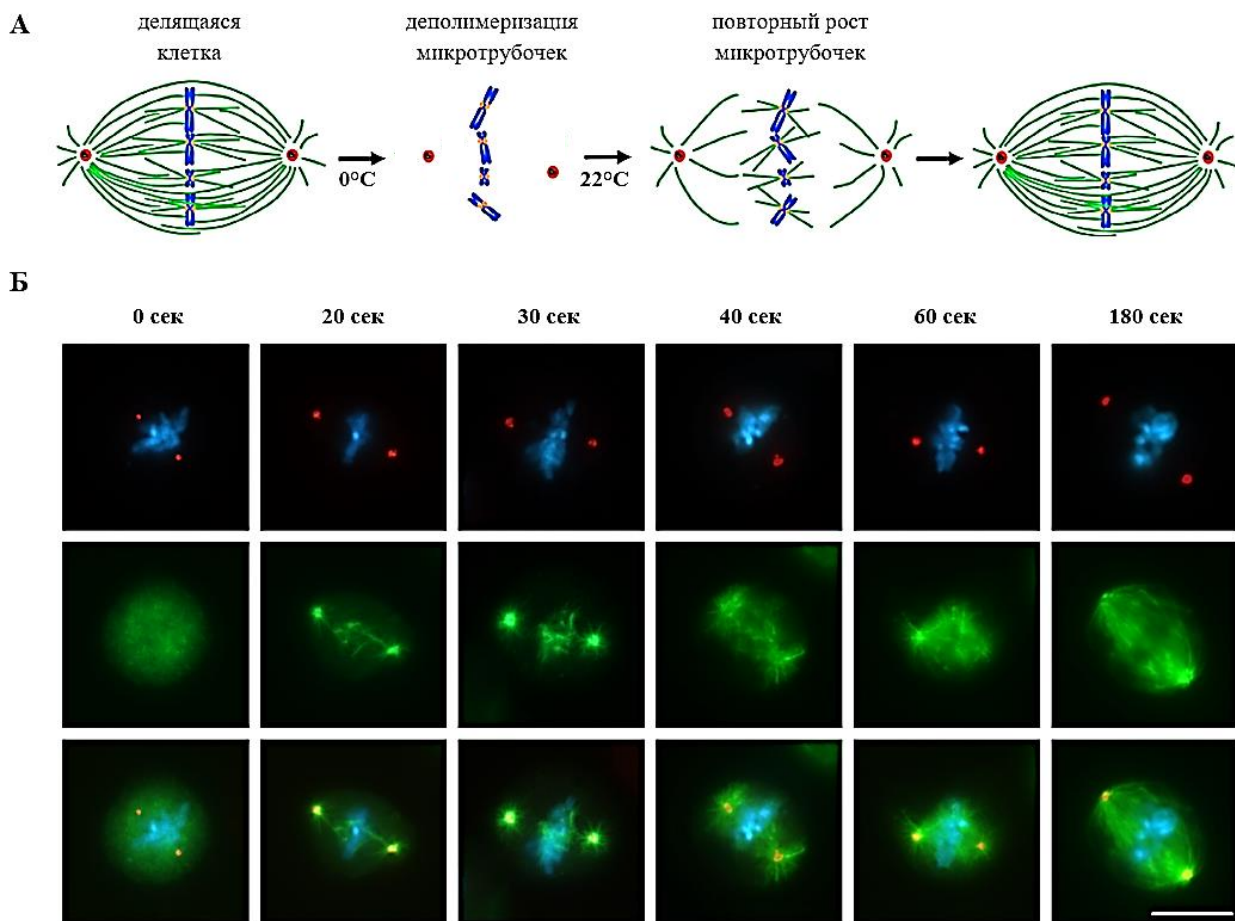


Рисунок 10. Повторный рост микротрубочек в клетках S2 дрозофилы после холодной обработки (0°C). **А.** Схема повторного роста микротрубочек после деполимеризации тубулина (Gallaud et al., 2014; с модификациями). Зеленый цвет – микротрубочки, красный – centrosомы, синий – хромосомы. **Б.** Иммуноокрашенные клетки, зафиксированные через 0, 20, 30, 40, 60 и 180 сек после возвращения клеток на 22°C. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosом DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), а также ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

3.2. Исследование роли белков *Eb1*, *Mars*, *Non3*, *Mei-38* и *Mast* в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек веретена деления в культуре клеток S2 *D. melanogaster*

3.2.1. РНК-интерференция генов, кодирующих исследуемые белки, в клетках S2 *D. melanogaster*

Перед изучением роли исследуемых белков в кинетохор-зависимом формировании МТ ВД была отработана процедура снижения уровня транскриптов генов *Eb1*, *mars*, *Non3*,

mei-38 и *mast* с помощью метода РНК-и по описанной выше методике на клеточной культуре S2 дрозифилы (см. п. 2.2.3.2.). Для этого сначала для каждого исследуемого гена были экспериментально определены оптимальные параметры процедуры (концентрация и количество доз дцРНК, продолжительность проведения РНК-и), позволяющие максимально снизить количество транскриптов исследуемых генов при сохранении жизнеспособности клеток и их способности к делению (Таблица 5).

3.2.1.1. Оценка эффективности процедуры РНК-интерференции

Эффективность процедуры РНК-и проверяли при помощи обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 11) с использованием специфических праймеров (Таблица 2). В качестве контроля использовались клетки S2 дрозифилы, которые не подвергались обработке дцРНК.

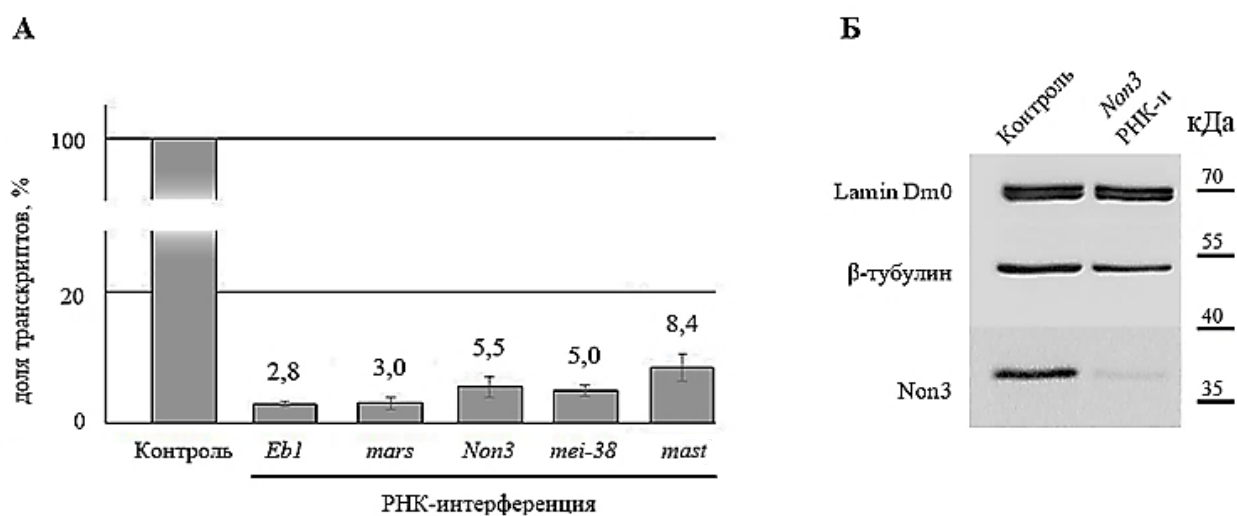


Рисунок 11. Оценка эффективности процедуры РНК-интерференции. **А.** Относительная доля мРНК генов *Ebf1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* либо *mast* в контрольных клетках и клетках после процедуры РНК-интерференции, оцененная с использованием обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в реальном времени. В качестве контроля использованы клетки S2 дрозифилы, которые не подвергались обработке дцРНК. Указаны 95% доверительные интервалы для медиан. **Б.** Вестерн-блот анализ экстрактов клеток S2 дрозифилы после разделения белков в 10% полиакриламидном геле, показывающий снижение уровня белка Non3 после РНК-интерференции. В качестве контроля использованы клетки S2 дрозифилы, которые не подвергались обработке дцРНК. Белки Lamina Dm0 и β-тубулин были использованы в качестве контроля загрузки.

В результате было показано, что после РНК-и количество транскриптов исследуемых генов существенно снизилось по сравнению с контрольными клетками: до 2,8% при РНК-и гена *Eb1*, до 3% при РНК-и гена *mars*, до 5,5% при РНК-и гена *Non3*, до 5% при РНК-и гена *mei-38*, до 8,4% при РНК-и гена *mast* (Рисунок 11 А). В случае РНК-и гена *Non3* также была выполнена оценка снижения количества белка посредством полуколичественного Вестерн-блот анализа с помощью специфических антител к белку Non3 (Таблица 4), полученных сотрудниками ЛКД ИМКБ СО РАН. Было показано, что в результате РНК-и гена *Non3* произошло существенное снижение (на более чем 90%) количества белка Non3 по сравнению с контрольными клетками (Рисунок 11 Б).

3.2.1.2. Митотические фенотипы, наблюдаемые после РНК-интерференции генов, кодирующих исследуемые белки, в клетках S2 *D. melanogaster*

При отработке процедуры РНК-и гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках S2 дрозофилы были проанализированы митотические фенотипы, возникающие в этих клетках. Сравнение полученных фенотипов с ранее описанными в литературе позволило удостовериться в эффективности снижения количества исследуемых белков при помощи РНК-и. Определение стадий митоза в контрольных клетках и клетках после РНК-и проводилось согласно ранее описанным характеристикам (Strunov et al., 2016). Для каждого из исследуемых генов было посчитано распределение клеток по стадиям митоза как минимум в двух биологических повторах (минимум 100 клеток/эксперимент), итоговое количество проанализированных клеток указано в Таблице 9.

Для каждой из РНК-и исследуемых генов было отмечено наличие каких-либо нарушений протекания митоза: фрагментация центросом, изменение размера ВД, задержка клеток на стадии промета- и метафазы, увеличение доли монополярных клеток, клеток с отстающими хромосомами и псевдо-ана-телофаз (ПАТ) (Таблица 9). ПАТ –аномальная митотическая клетка, для которой характерно наличие удлиненного ВД, свойственного стадиям анафазы и телофазы, однако хромосомы (ДНК) при этом визуализируются либо как на стадии прометафазы, либо отмечается нарушение в расхождении сестринских хроматид к полюсам ВД (Рисунок 12–16 Д).

Таблица 9. Распределение клеток по стадиям митоза после РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках S2 дрозофилы.

РНК-интерференция	Количество клеток	Распределение клеток по стадиям митоза, %				
		Промета	Мета	Ана	Тело	ПАТ
Контроль	584	37,0 (± 1,9)	20,9 (± 2,1)	12,2 (± 1,7)	23,6 (± 2,4)	6,3 (± 1,2)
<i>Eb1</i>	213	39,4 (± 5,8)	24,9 (± 3,2)	7,5 (± 1,0)	16,4 * (± 3,2)	11,7 * (± 0,4)
<i>mars</i>	200	38,5 (± 6,8)	21,5 (± 2,4)	8,5 (± 1,0)	23,5 (± 3,9)	8,0 (± 1,5)
<i>Non3</i>	470	31,1 * (± 2,4)	28,5 ** (± 1,7)	8,5 * (± 1,8)	21,5 (± 0,4)	10,4 * (± 1,3)
<i>mei-38</i>	213	46,0 * (± 4,2)	17,8 (± 1,9)	5,2 ** (± 2,1)	22,1 (± 4,4)	8,9 (± 0,0)
<i>mast</i>	325	69,2 *** (± 3,2)	16,3 (± 0,5)	0,6 *** (± 0,4)	9,2 *** (± 2,9)	4,6 (± 1,1)

В качестве контроля использованы клетки S2 дрозофилы, не подвергавшиеся обработке дцРНК. Промета – прометафаза; Мета – метафаза; Ана – анафаза; Тело – телофаза; ПАТ – псевдо-ана-телофаза (описание ниже в тексте). Представлены средние значения как минимум двух биологических повторов (минимум 100 клеток/эксперимент) с указанием в скобках стандартной ошибки среднего (standard error of the mean; SEM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (χ^2 тест).

Одновременно с анализом распределения клеток по стадиям митоза был выполнен подсчет количества и частоты возникновения фрагментации centrosом после РНК-и для оценки участия белков *Eb1*, *Mars*, *Non3*, *Mei-38* и *Mast* в процессе расхождения дочерних centrosом во время митоза, а также подсчитано количество клеток с отстающими хромосомами (Таблица 10). Данный анализ проводился на тех же клетках, которые использовались для подсчетов в Таблице 9.

Таблица 10. Подсчет количества и фрагментации центросом и доли клеток с отстающими хромосомами после РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках S2 дрозофилы.

РНК-интерференция	Количество клеток	Количество центросом, %			Фрагментация центросом, %	Отстающие хромосомы, %
		1	2	> 2		
Контроль	584	3,4 (± 1,6)	87,0 (± 3,4)	7,2 (± 2,4)	1,2 (± 0,9)	1,2 (± 0,7)
<i>Eb1</i>	213	2,8 (± 1,0)	79,3 ** (± 2,7)	13,1 ** (± 3,7)	1,9 (± 0,9)	2,8 (± 0,9)
<i>mars</i>	200	5,0 (± 0,1)	80,0 ** (± 2,5)	9,0 (± 1,4)	2,0 (± 0,4)	4,0 * (± 1,3)
<i>Non3</i>	470	4,7 (± 1,7)	82,8 (± 3,7)	5,3 (± 1,0)	0,0 (± 0,0)	7,2 *** (± 2,4)
<i>mei-38</i>	213	10,8 *** (± 2,7)	70,4 *** (± 4,6)	14,1 ** (± 2,1)	3,3 * (± 0,3)	1,4 (± 0,5)
<i>mast</i>	325	34,5 *** (± 8,4)	52,9 *** (± 6,8)	10,5 (± 1,2)	1,5 (± 0,4)	0,6 (± 0,4)

В качестве контроля использованы клетки S2 дрозофилы, не подвергавшиеся обработке дцРНК. Представлены средние значения как минимум двух биологических повторов (минимум 100 клеток/эксперимент) с указанием в скобках стандартной ошибки среднего (standard error of the mean; SEM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (χ^2 тест).

После РНК-и гена *Eb1* было отмечено снижение количества клеток, находящихся на стадии телофазы (16,4% против 23,6% в контрольных клетках) (Таблица 9), а также было обнаружено повышение доли клеток с увеличением количества центросом (13,1% против 7,2% в контрольных клетках) (Таблица 10). Помимо этого, было показано, что РНК-и гена *Eb1* приводит к отсутствию полюсных и межполюсных МТ (Рисунок 12 Б.2, Б.3; стрелки). Обнаружено повышение количества клеток с фенотипом ПАТ (с 6,3% в контрольных клетках до 11,7% в РНК-и клетках) (Таблица 9).

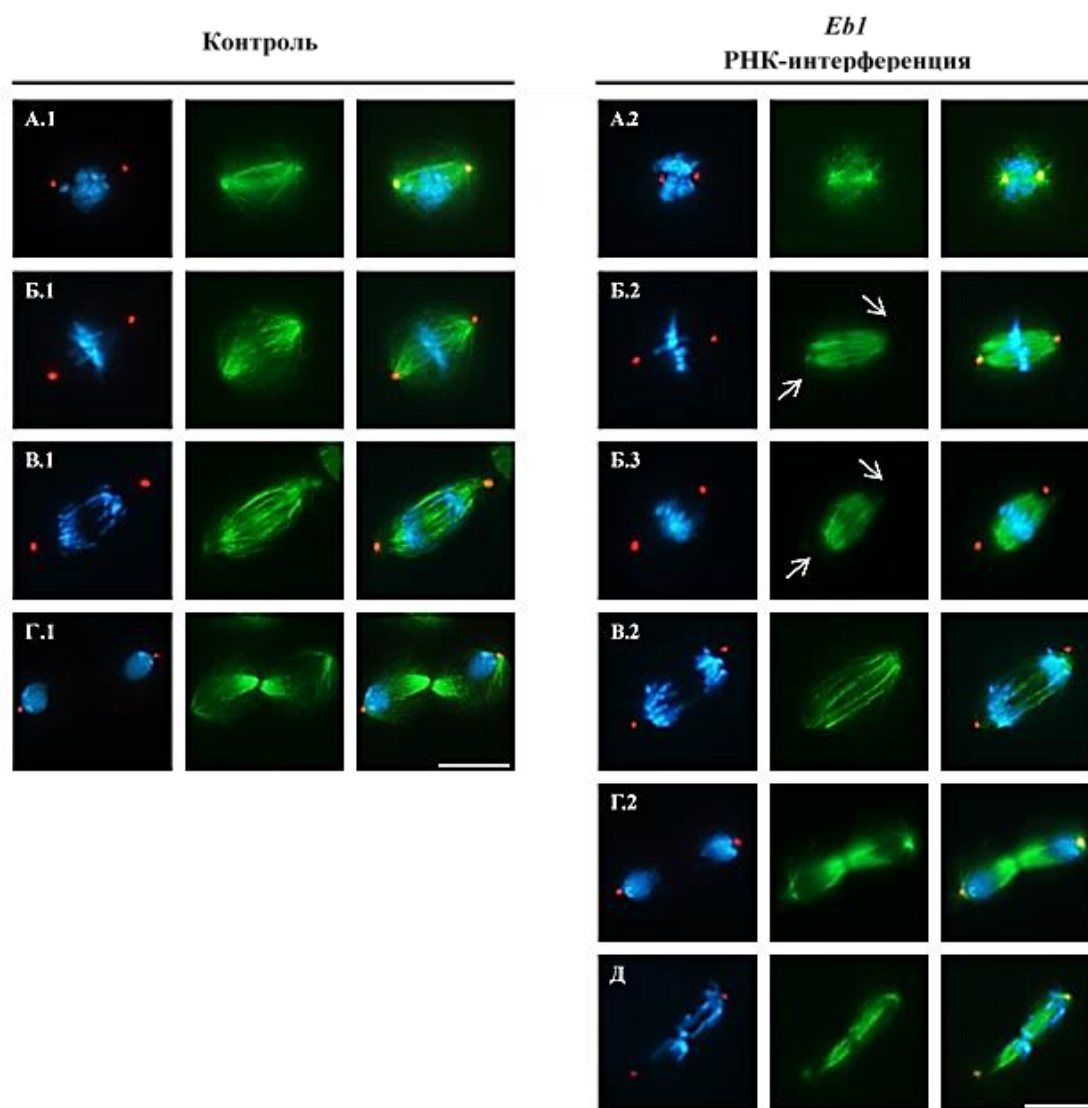


Рисунок 12. Митотический фенотип после процедуры РНК-интерференции гена *Eb1* в клетках S2 дрозофилы. **А.** Прометафаза. **Б.** Метафаза. **В.** Анафаза. **Г.** Телофаза. **Д.** Псевдоана-телофаза. **1** – контрольные клетки; **2, 3** – клетки после процедуры РНК-интерференции. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок центросом DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), а также ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Стрелки – отсутствие полюсных (астральных) микротрубочек. Масштаб – 10 мкм.

При РНК-и гена *mars* не было отмечено разницы в распределении клеток по стадиям митоза по сравнению с контрольными клетками (Таблица 9). Однако было обнаружено небольшое повышение доли клеток на стадии анафазы и телофазы с отстающими хромосомами (4% против 1,2% в контрольных клетках) (Таблица 10, Рисунок 13 В.2, Г.2; стрелки).

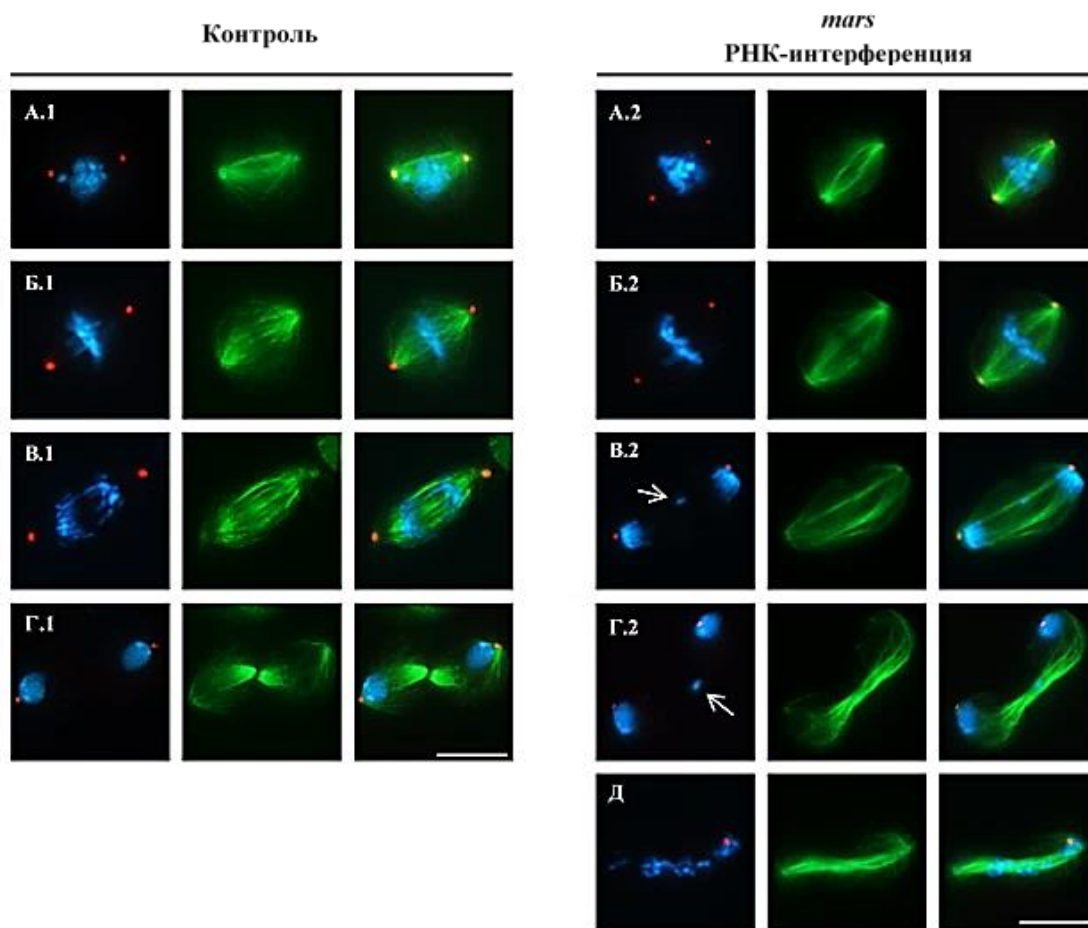


Рисунок 13. Митотический фенотип после процедуры РНК-интерференции гена *mars* в клетках S2 дрозофилы. А. Прометафаза. Б. Метафаза. В. Анафаза. Г. Телофаза. Д. Псевдоана-телофаза. 1 – контрольные клетки; 2 – клетки после процедуры РНК-интерференции. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosom DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), а также ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Стрелками – отстающие хромосомы. Масштаб – 10 мкм.

РНК-и гена *mei-38* приводит к повышению доли клеток, находящихся на стадии прометафазы (46% против 37% в контроле) (Таблица 9), клеток с одной centrosomой (10,8% против 3,4% в контроле) (Рисунок 14 А.3), клеток с множеством centrosom (14,1% против 7,2% в контроле), клеток с фрагментацией centrosom (3,3% по сравнению с 1,2% в контроле) (Таблица 10). Выявлены клетки с нарушением расхождения centrosom (Рисунок 14 Г.2).

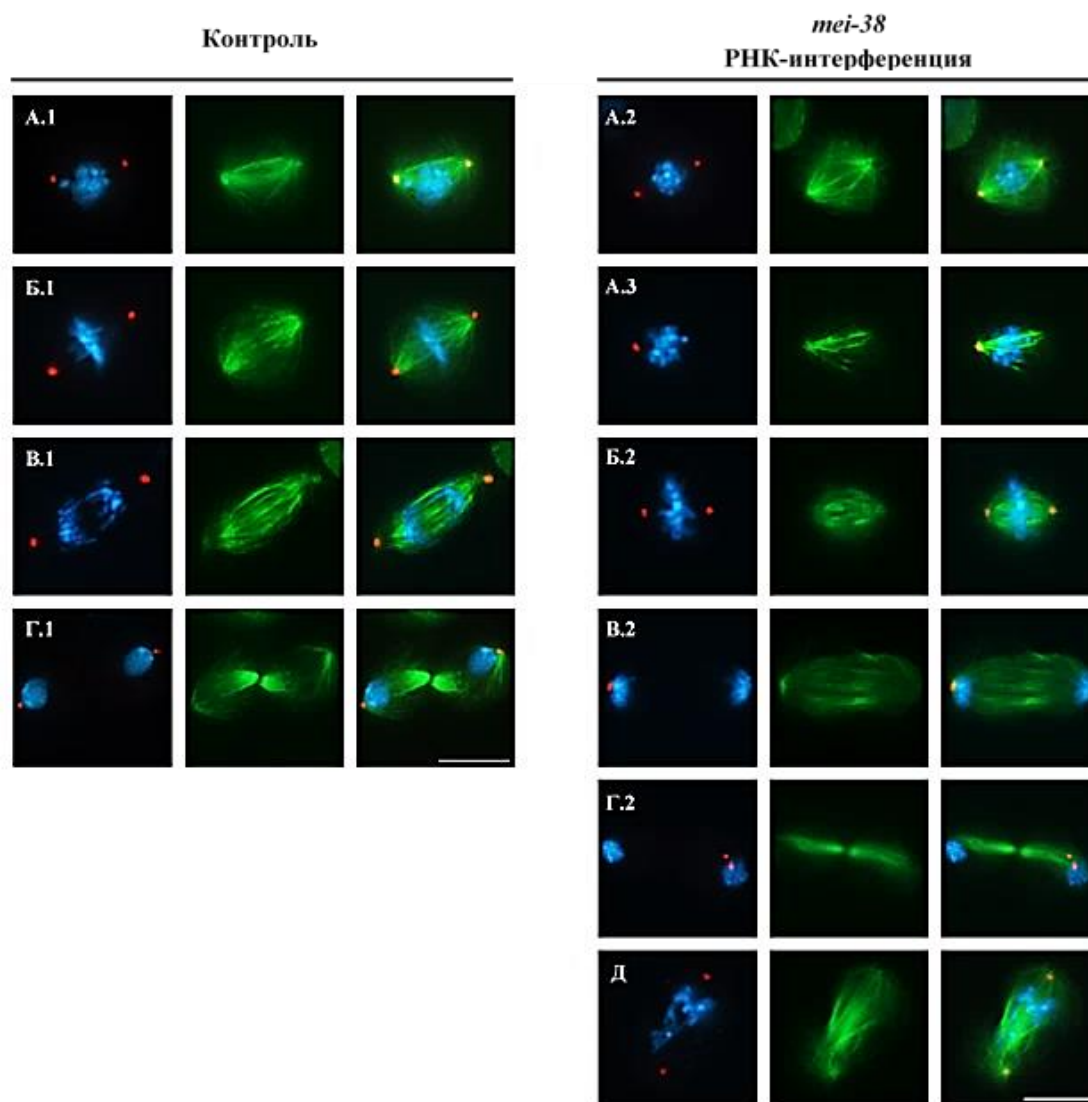


Рисунок 14. Митотический фенотип после процедуры РНК-интерференции гена *mei-38* в клетках S2 дрозофилы. А. Прометафаза. Б. Метафаза. В. Анафаза. Г. Телофаза. Д. Псевдоана-телофаза. 1 – контрольные клетки; 2, 3 – клетки после процедуры РНК-интерференции. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosом DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), а также ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

РНК-и гена *mast* вызывает частое (34,5% против 3,4% в контроле) образование монополярного ВД (Рисунок 15 А.3, Таблица 10). Помимо этого, происходит остановка деления клеток на стадии промета- и метафазы (69,2% по сравнению с 37% в контроле), из-за чего существенно снижается количество анафаз (0,6%) и телофаз (9,2%) по сравнению с контрольными клетками (12,2% и 23,6%, соответственно) (Таблица 9).

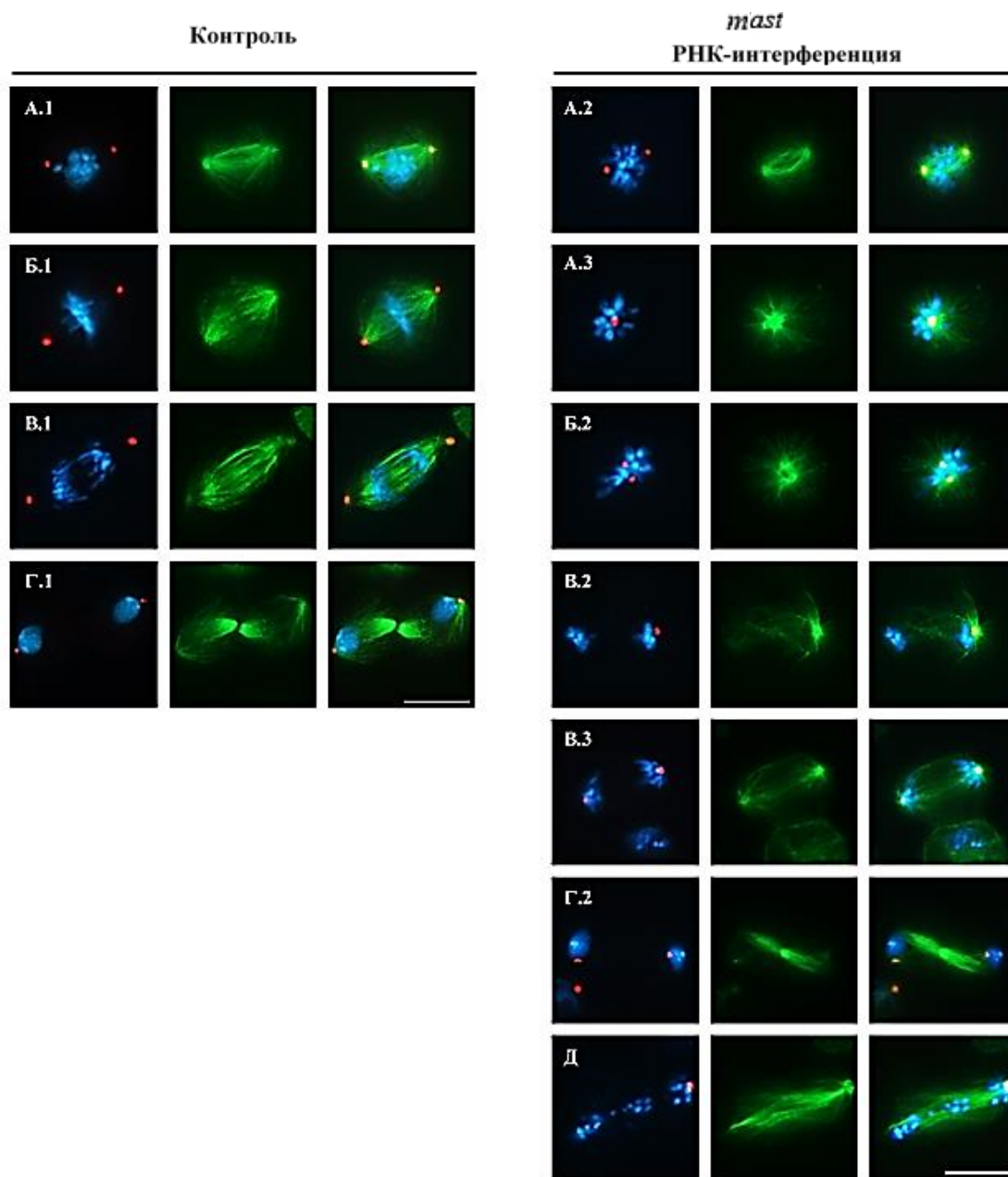


Рисунок 15. Митотический фенотип после процедуры РНК-интерференции гена *mast* в клетках S2 дрозофилы. А. Прометафаза. Б. Метафаза. В. Анафаза. Г. Телофаза. Д. Псевдоана-телофаза. 1 – контрольные клетки; 2, 3 – клетки после процедуры РНК-интерференции. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosом DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), а также ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Снижение количества белка Non3 вызывает повышение доли клеток, находящихся на стадии метафазы (28,5% против 20,9% в контрольных клетках), клеток с отстающими хромосомами (7,2% против 1,2% в контроле) (Рисунок 16 Б.4; стрелкой) и клеток с фенотипом ПАТ (10,4% по сравнению с 6,3% в контроле) (Таблица 9). Еще одной характерной особенностью являются визуально бóльшие по размеру полюсные

МТ на всех стадиях митоза в сравнении с контролем, вне зависимости от количества centrosom (Рисунок 16 Б.3).

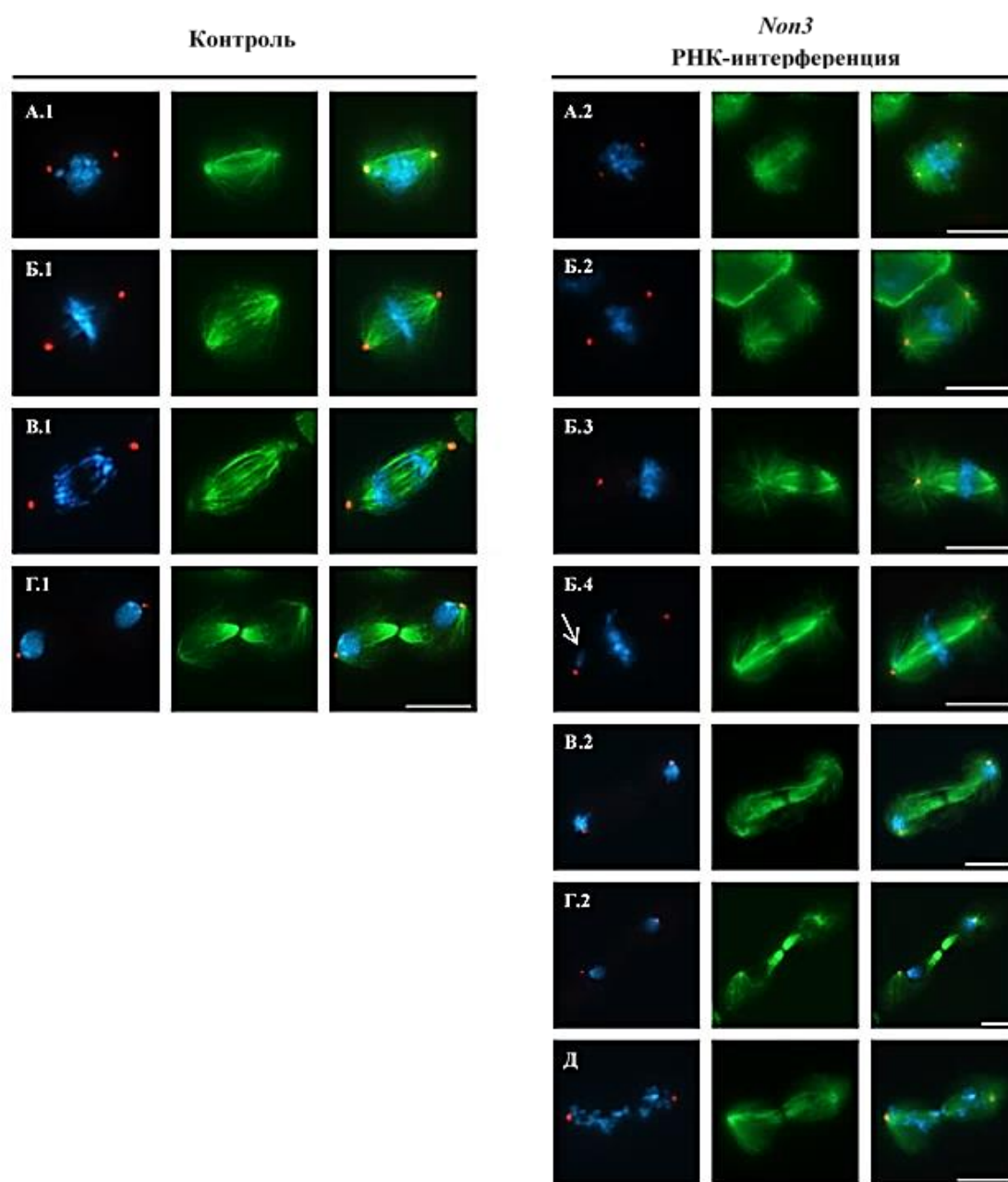


Рисунок 16. Митотический фенотип после процедуры РНК-интерференции гена *Non3* в клетках S2 дрозофилы. **А.** Прометафаза. **Б.** Метафаза. **В.** Анафаза. **Г.** Телофаза. **Д.** Псевдоана-телофаза. **1** – контрольные клетки; **2, 3, 4** – клетки после процедуры РНК-интерференции. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosom DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), а также ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Стрелка – отстающая хромосома. Масштаб – 10 мкм.

Вдобавок к подсчету распределения клеток по стадиям митоза, была измерена длина ВД клеток S2 дрозофилы в контроле и после РНК-и исследуемых генов.

Измерения производились в промета- и метафазных клетках с биполярными ВД. Для контрольных клеток медианная длина ВД составила 14,05 мкм. При подавлении экспрессии гена *mars* или *Non3* происходит незначительное изменения длины ВД (12,71 мкм и 13,71 мкм, соответственно). РНК-и гена *mei-38* или *Eb1* приводит к небольшому уменьшению длины ВД по сравнению с контролем (11,92 мкм и 10,84 мкм, соответственно). РНК-и гена *mast* приводит к формированию короткого ВД (4,27 мкм) (Рисунок 17).

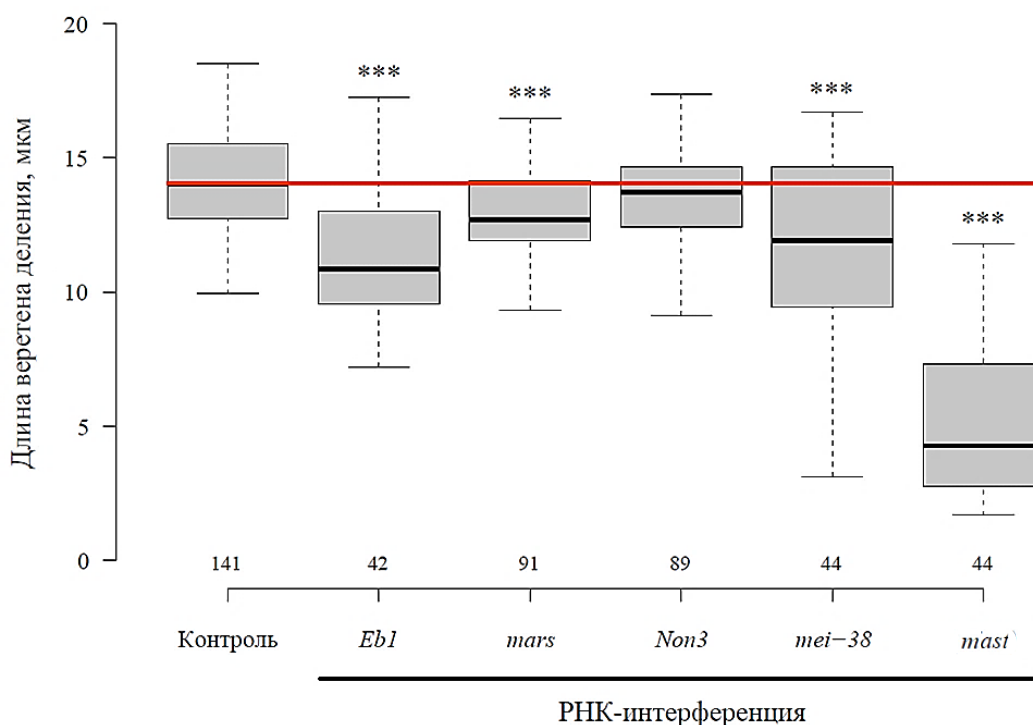


Рисунок 17. Длина веретена деления после процедуры РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках S2 дрозофилы. Под графиком указано количество клеток, использованных для измерения длины веретена деления. Красная линия – медиана контрольных клеток. *** $p < 0,001$ (*U*-критерия Манна - Уитни).

3.2.2. Локализация eGFP-меченых белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в культуре клеток S2 *D. melanogaster*

Для более полного изучения роли белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании МТ ВД в клетках S2 дрозофилы Яринич Л.А. (сотрудник ЛКД ИМКБ СО РАН) были получены трансгенные линии клеток S2 дрозофилы, экспрессирующие исследуемые белки в виде гибридов с флуоресцентным белком eGFP, а также гибридный белок mCherry- α -тубулин либо

mScarlet- α -тубулин (Таблица 6, см. п. 2.6.3.3.) (далее в тексте будет использоваться сокращенный вариант написания названия линий «белок-eGFP»).

Экспрессия трансгенов проводилась под контролем индуцируемого ионами меди промотора MtnA. Для каждой из трансгенных линий был выполнен тщательный подбор условий индукции для наработки гибридных флуоресцентных белков. Для этого подбиралась такая концентрация CuSO_4 и время индукции, которые позволяли прижизненно визуализировать сшитый с eGFP исследуемый белок, при этом должны были отсутствовать нарушения в формировании функционального ВД и в последующем делении трансгенных клеток из-за сверхэкспрессии гибридных белков. Подобранные условия описаны в Таблице 6.

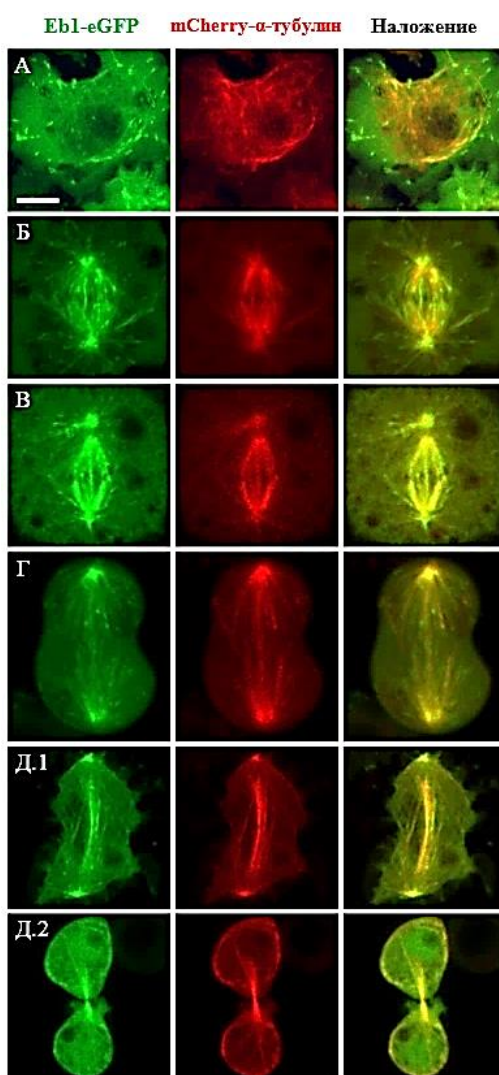


Рисунок 18. Прижизненная локализация белка Eb1-eGFP в трансгенной линии клеток S2 дрозофилы. **А.** Интерфаза. **Б.** Прометафаза. **В.** Метафаза. **Г.** Анафаза. **Д (1, 2).** Телофаза. Зеленый цвет – белок Eb1-eGFP, красный – белок mCherry- α -тубулин (конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Используя прижизненную конфокальную микроскопию трансгенных клеток S2 дрозофилы, несущих конструкции Eb1-eGFP, Mars-eGFP, Non3-eGFP, Mei-38-eGFP и Mast-eGFP, была исследована локализация гибридных eGFP-белков. Было отмечено, что локализация данных гибридных белков совпадает с локализацией эндогенных белков, описанной ранее в литературе. Для белка Eb1-eGFP показано, что он связан со всеми МТ ВД на всех стадиях клеточного деления и обогащен на растущих плюс-концах МТ (Рисунок 18). Ранее Mimori-Kiyosue с коллегами (Mimori-Kiyosue et al., 2000) показали, что в культивируемых клетках S2 дрозофилы, обработанных конканавалином А, локализация белка Eb1 полностью совпадает с МТ с обогащением сигнала на плюс-концах МТ на всех стадиях митоза.

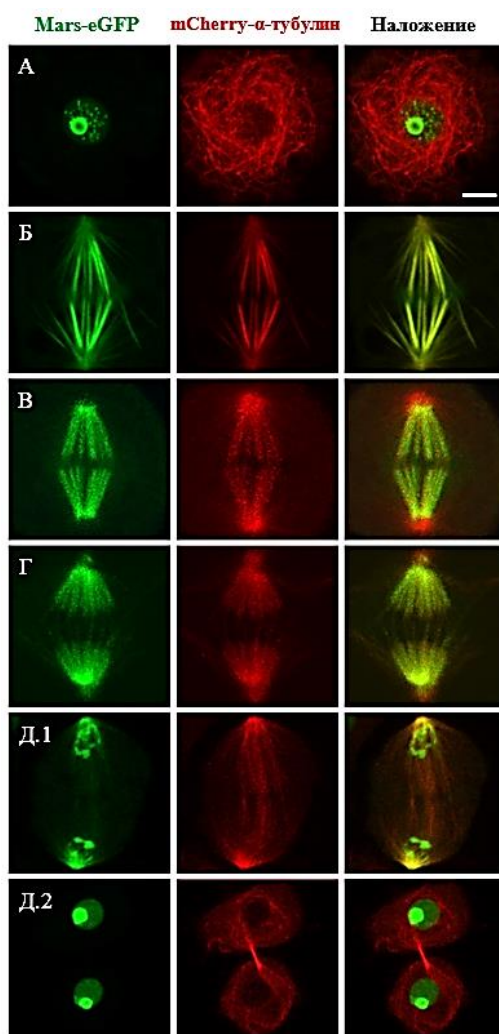


Рисунок 19. Прижизненная локализация белка Mars-eGFP в трансгенной линии клеток S2 дрозофилы. **А.** Интерфаза. **Б.** Прометафаза. **В.** Метафаза. **Г.** Анафаза. **Д (1, 2).** Телофаза. Зеленый цвет – белок Mars-eGFP, красный – белок mCherry- α -тубулин (конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Белок Mars-eGFP во время интерфазы локализуется в ядрышке, после чего, начиная со стадии прометафазы и заканчивая стадией анафазы, ко-локализуется с МТ ВД, в основном с кинетохорными (Рисунок 19 А-Г). Начиная со стадии телофазы, белок Mars-eGFP локализуется сначала на хромосомах (ранняя телофаза; Рисунок 19 Д.1), а затем в ядрышке (поздняя телофаза; Рисунок 19 Д.2). Прежде в исследованиях с использованием трансгенных мух либо клеток S2 дрозофилы было показано, что белок Mars в интерфазных клетках локализуется в ядре (Zhang et al., 2009), с наступлением прометафазы и на последующих стадиях митоза начинает локализоваться на ВД и в области centrosом при этом отсутствует на полюсных МТ (Yang et al., 2008; Zhang et al., 2009), с наступлением анафазы белок Mars визуализируется только на минус-концах межполюсных МТ, после чего, начиная со стадии телофазы, происходит перемещение белка Mars в ядра дочерних клеток (Zhang et al., 2009).

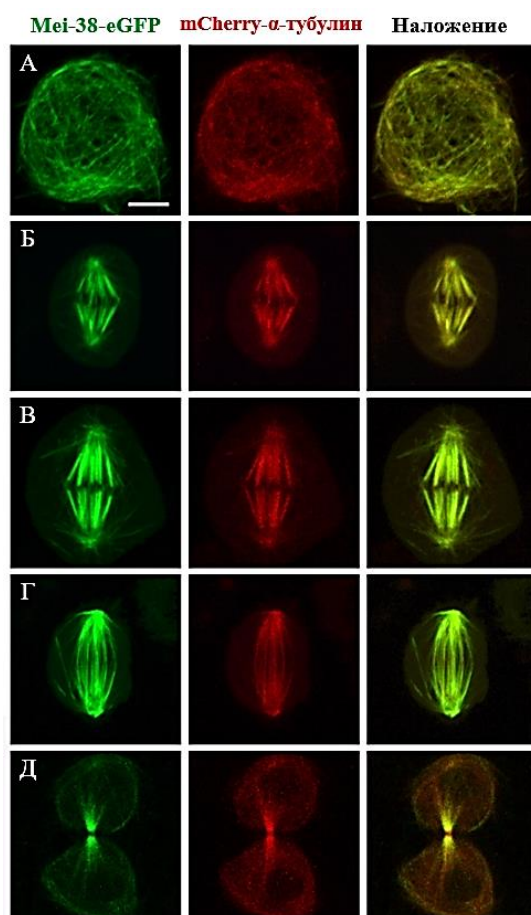


Рисунок 20. Прижизненная локализация белка MeI-38-eGFP в трансгенной линии клеток S2 дрозофилы. А. Интерфаза. Б. Прометафаза. В. Метафаза. Г. Анафаза. Д. Телофаза. Зеленый цвет – белок MeI-38-eGFP, красный – белок mCherry- α -тубулин (конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Исследование прижизненной локализации белка Meі-38-eGFP показало, что данный белок ко-локализуется с МТ ВД (в большей степени с кинетохорными МТ) на стадиях промета-, мета- и анафазы (Рисунок 20). Начиная со стадии телофазы белок Meі-38-eGFP локализуется в области поперечной перетяжки (midbody) (Рисунок 20 Д). Ранее прижизненная съемка гибридного флуоресцентного белка D-TPX2-GFP в клетках S2 дрозофилы показала, что белок Meі-38 ко-локализуется с МТ ВД начиная со стадии прометафазы, при этом предпочтительнее связываясь с кинетохорными, а не с полюсными МТ (Goshima, 2011).

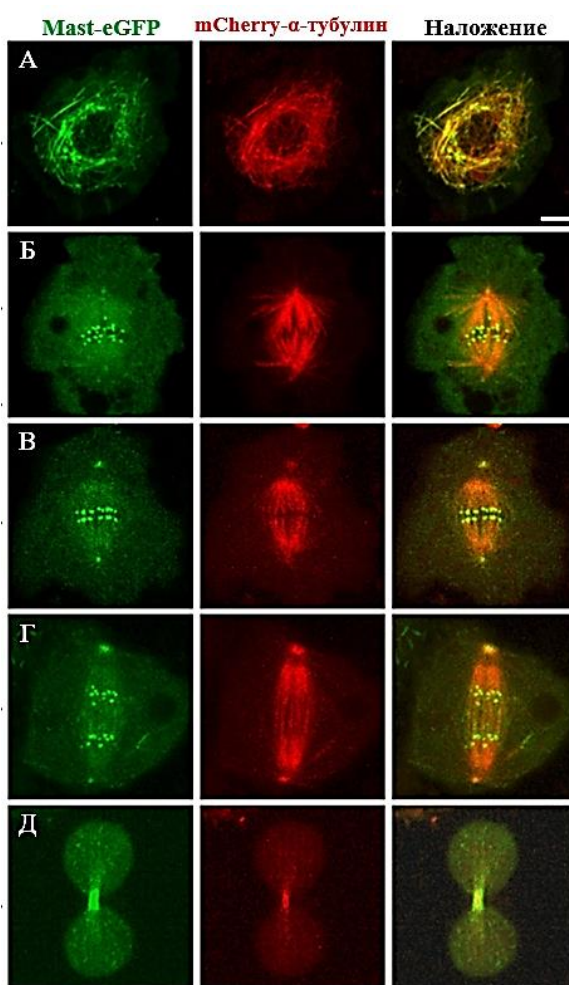


Рисунок 21. Прижизненная локализация белка Mast-eGFP в трансгенной линии клеток S2 дрозофилы. **А.** Интерфаза. **Б.** Прометафаза. **В.** Метафаза. **Г.** Анафаза. **Д.** Телофаза. Зеленый цвет – белок Mast-eGFP, красный – белок mCherry- α -тубулин (конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Было показано, что на стадии интерфазы белок Mast-eGFP ко-локализуется с МТ. На стадиях промета-, мета- и анафазы данный белок специфически обогащен на

хромосомах в области кинетохоров (Рисунок 21), а также на полюсах ВД на стадии мета- и анафазы (Рисунок 21 В, Г). Далее, на стадии телофазы, белок Mast-eGFP, подобно белку Mei-38-eGFP, локализуется в области поперечной перетяжки (midbody) (Рисунок 21 Д). Исследования внутриклеточной локализации белка Mast как в клетках дрозофилы, так и в клетках млекопитающих показали, что, начиная со стадии прометафазы, белок Mast локализуется на centrosомах, ВД, центромерах, сохраняя такую локализацию до стадии анафазы Б, после чего концентрируется в центральной зоне ВД, ассоциированной с межполюсными МТ. Локализация на centrosомах остается слабой вплоть до наступления телофазы, во время которой белок Mast локализуется по обе стороны от поперечной перетяжки, локализация на centrosомах становится едва заметной (Inoue et al., 2000; Lemos et al., 2000; Maiato et al., 2003; D'Avino et al., 2005).

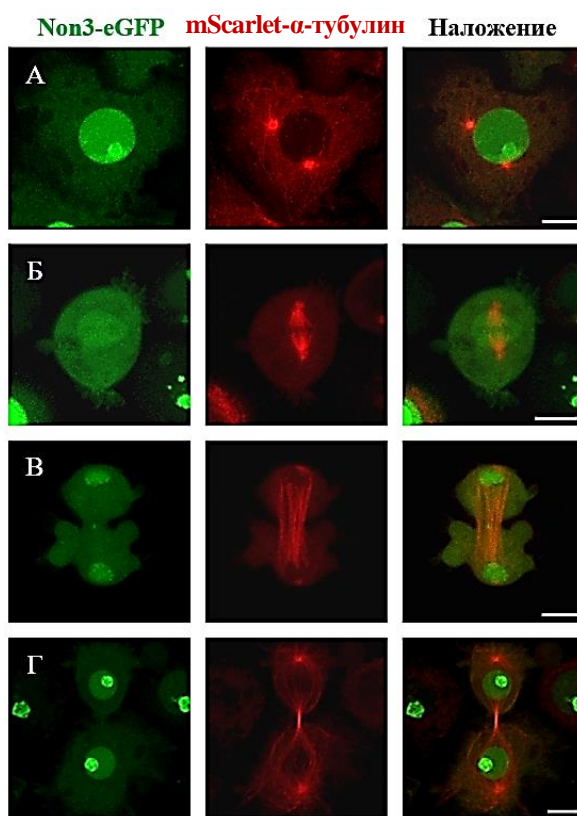


Рисунок 22. Прижизненная локализация белка Non3-eGFP в трансгенной линии клеток S2 дрозофилы. **А.** Профаза. **Б.** Метафаза. **В.** Анафаза. **Г.** Телофаза. Зеленый цвет – белок Non3-eGFP, красный – белок mScarlet- α -тубулин (конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

На момент настоящего исследования данные о локализации белка Non3 во время митоза отсутствовали; было лишь известно, что белок гибридный флуоресцентный белок Non3-eGFP выявляется в ядрышке в интерфазе (Moutinho-

Pereira et al., 2013). Нами впервые показано, что белок Non3-eGFP в профазе выявляется в основном в ядрышке (Рисунок 22 А). Во время метафазы белок Non3-eGFP не ко-локализуется с МТ ВД, однако присутствует небольшое обогащение eGFP сигнала вокруг хромосом (Рисунок 22 Б). Начиная со стадии анафазы белок Non3-eGFP ко-локализуется сначала на хромосомах, а затем начиная со стадии телофазы – в ядрышке (Рисунок 22 В, Г).

3.2.3. Роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек после колцевидной обработки клеток S2 *D. melanogaster*

Изучение роли белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в процессе ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров в клетках S2 дрозофилы после колцевидной обработки показало, что снижение количества только некоторых из них влияет на данный процесс (Таблица 11). Для каждого из исследуемых генов (и соответствующего контроля) была посчитана частота ПРМТ после колцевидной обработки как минимум в трех биологических повторах (минимум 200 клеток/эксперимент), итоговое количество проанализированных клеток указано в Таблице 11.

При РНК-и гена *Eb1* динамика ПРМТ в клетках снижается примерно вдвое по сравнению с контролем на временных точках 20, 30 и 45 мин. При РНК-и гена *mars* или *mei-38* происходит снижение доли клеток с ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров лишь на начальных стадиях восстановления МТ ВД (точки 20 и 30 мин), при этом на поздних временных точках (45 и 75 мин) разница между РНК-и и контрольными клетками отсутствует. Самое сильное влияние на динамику ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров было отмечено при РНК-и гена *mast*, где доля клеток, демонстрирующих ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров, в 5,5 раз меньше, чем в контрольных клетках. Разница в динамике ПРМТ в точках 20 и 30 мин для РНК-и гена *mast* объясняется тем, что в каждой отдельной временной точке производилась индивидуальная нормировка значения, полученного в РНК-и исследуемого гена, на соответствующий этой временной точке контроль (принятый за 1) (Таблица 11).

Таблица 11. Частота повторного роста микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров после РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках S2 дрозофилы после колцевидной обработки.

РНК-интерференция	Время после отмывки клеток от колцемида							
	20 мин		30 мин		45 мин		75 мин	
	Σ	ПРМТ, о.е.	Σ	ПРМТ, о.е.	Σ	ПРМТ, о.е.	Σ	ПРМТ, о.е.
Контроль	3004	1,00	2539	1,00	2007	1,00	1487	1,00
<i>Eb1</i>	866	0,43 *	617	0,57 *	413	0,66 *	412	0,97
<i>mars</i>	1045	0,21 *	973	0,34 *	842	0,90 *	613	0,99
<i>Non3</i>	1046	0,81 *	713	0,94	614	0,96	424	0,98 *
<i>mei-38</i>	707	0,19 *	714	0,28 *	510	0,93 *	400	0,96
<i>mast</i>	713	0,37 *	725	0,18 *	512	0,74 *	404	1,00

В качестве контроля использованы клетки S2 дрозофилы, не подвергавшиеся обработке дцРНК. Представлены средние значения как минимум трех биологических повторов после нормирования на соответствующий контроль, принятый за 1. Σ – суммарное количество подсчитанных клеток (включает в себя клетки без повторного роста микротрубочек). ПРМТ – доля клеток с повторным ростом микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров. о.е. – относительные единицы. * $p < 0,05$ (χ^2 тест).

Снижение количества белка Non3 статистически значимо влияет на процесс кинетохор-зависимого формирования МТ только во временной точке 20 мин, в которой отмечено небольшое уменьшение доли клеток с ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров по сравнению с контролем. По сравнению с результатами динамики ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров после РНК-и других изученных в настоящей работе генов, можно считать вклад белка Non3 в процесс восстановления ВД очень слабым.

Наряду с изучением динамики ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров был исследован характер ПРМТ после колцевидной обработки, для чего была введена следующая классификация: а) очень короткие пучки МТ, связанные с кинетохорами («одиночные точечные» и «двойные точечные» пучки) (Рисунок 23 А); б) относительно длинные пучки МТ (Рисунок 23 Б); в) кластеры МТ (Рисунок 23 В). Подсчет характера ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров выполнялся на клетках на стадии промета- и метафазы, зафиксированных через 30 мин после отмывки клеток от колцемида.

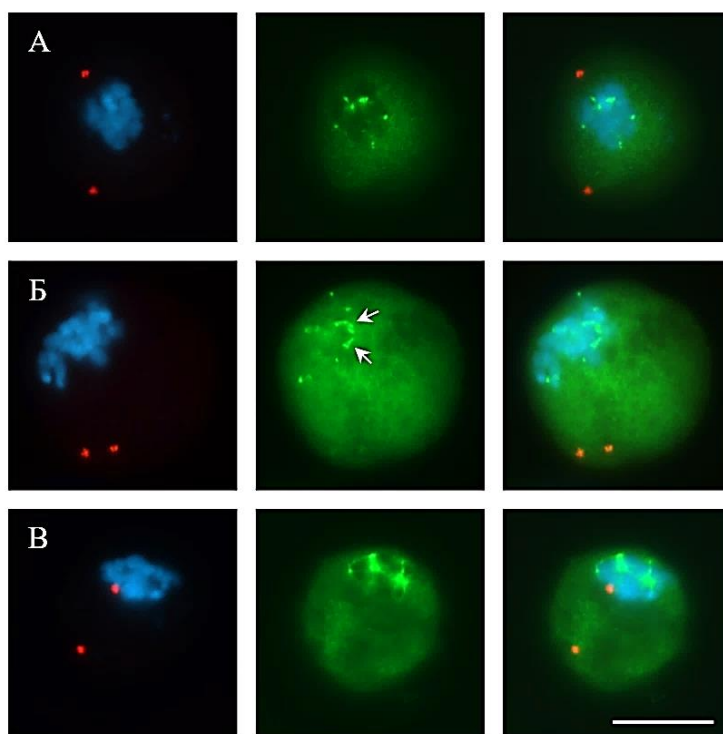


Рисунок 23. Различный характер повторного роста микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров после колцевидной обработки контрольных клеток S2 дрозофилы, временная точка 30 мин. **А.** Короткие (одинарные или двойные) пучки микротрубочек. **Б.** Удлиненные пучки микротрубочек (стрелки). **В.** Кластеры микротрубочек. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosом DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Обнаружено, что контрольные и РНК-и клетки демонстрируют схожий характер ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров после колцевидной обработки, но доля клеток с тем или иным типом повторно сформированных МТ варьируется по частоте в зависимости от РНК-и конкретного гена (Таблица 12). Так, было показано, что в клетках S2 дрозофилы после РНК-и гена *mast*, *mars*, *mei-38* либо *Eb1* частота удлиненных пучков МТ и кластеров МТ (характеризуют поздние стадии кинетохор-зависимого ПРМТ) значительно снижена по сравнению с контролем (Таблица 12). При снижении количества белка Non3 не было отмечено влияния на характер ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров, так как полученные значения достоверно не отличаются от таковых в контрольных клетках (Таблица 12). Данный анализ проводился на тех же клетках, которые использовались для подсчетов в Таблице 11.

Таблица 12. Характер повторного роста и интенсивность флуоресценции повторно растущих от хромосом и/или кинетохоров микротрубочек после РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках S2 дрозофилы после колцемидной обработки (30 мин после отмывки клеток от колцемиды).

РНК-интерференция	Характер повторного роста микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров, о.е.			Интенсивность флуоресценции, о.е.
	короткие пучки МТ	длинные пучки МТ	кластеры МТ	
<i>Eb1</i>	1,14	0,53 ***	0,51 **	0,71 ***
<i>mars</i>	1,11	0,57 ***	0,35 ***	0,42 ***
<i>Non3</i>	1,16	0,99	1,05	0,61
<i>mei-38</i>	1,22 **	0,33 ***	0,31 ***	0,30 ***
<i>mast</i>	0,93	0,25 ***	0,08 ***	0,31 ***

В качестве контроля использованы клетки S2 дрозофилы, не подвергавшиеся обработке дцРНК. Представлены средние значения как минимум трех биологических повторов после нормирования на соответствующий контроль, значение которого было принято равным 1. Данные по интенсивности флуоресценции получены с использованием программы ImageJ. МТ – микротрубочки; о.е. – относительные единицы. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (χ^2 тест).

Снижение доли клеток с «длинными пучками МТ» и «кластерами МТ» (Таблица 12) на поздних стадиях сборки ВД при РНК-и исследуемых генов может быть объяснено участием кодируемых этими генами белков в процессе присоединения субъединиц тубулина на плюс-концы растущих от хромосом и/или кинетохоров МТ. И чем больше вклад конкретного белка в данный процесс, тем сильнее будет снижена способность клеток при РНК-и гена, кодирующего этот белок, на формирование «длинных пучков МТ» и «кластеров МТ» при ПРМТ. Для проверки этой гипотезы по изменению интенсивности флуоресценции пучков ПРМТ было оценено, какое количество тубулина (а, следовательно, и МТ) содержится в кинетохорных пучках МТ в клетках при РНК-и исследуемых генов в сочетании с колцемидной обработкой клеток S2 дрозофилы (Таблица 12). Измерения интенсивности флуоресценции производились на тех же клетках, которые были использованы при подсчете характера ПРМТ Таблице 12.

В результате было показано, что в клетках S2 дрозофилы при РНК-и гена *mast* или *mei-38* интенсивность флуоресценции тубулина снижается в три раза, а при РНК-и гена *mars* – в 2,5 раза по сравнению с контролем. РНК-и гена *Eb1* либо *Non3* приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции кинетохор-зависимых ПРМТ после колцемидной обработки примерно в 1,5 раза по сравнению с

контрольными клетками (Таблица 12). Полученные данные хорошо согласуются с результатами анализа динамики и характера ПРМТ при РНК-и гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* после колцемидной обработки (Таблица 11, 12).

3.2.4. Локализация белков Eb1-eGFP, Mars-eGFP, Mei-38-eGFP и Mast-eGFP при повторном росте микротрубочек после колцемидной обработки трансгенных линий клеток S2 *D. melanogaster*

Для более полного изучения роли белков, регулирующих процесс кинетохор-зависимого ПРМТ, была проанализирована их локализация до начала и в процессе восстановления ВД после обработки клеток колцемидом. Была изучена локализация белков Eb1-eGFP, Mars-eGFP, Mei-38-eGFP и Mast-eGFP. Для белка Non3-eGFP данный эксперимент не был выполнен, поскольку по результатам анализа локализации данного гибридного белка в необработанных клетках было показано, что на всех стадиях митоза белок Non3-eGFP не ко-локализуется с МТ и не обнаруживается в области кинетохоров (Рисунок 22), а также по данным колцемидной (Таблица 11, 12) и холодной (Рисунок 26, Таблица 13, см. п. 3.2.5.) обработок клеток S2 дрозофилы дикого типа снижение количества белка Non3 практически или совсем не влияет на ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров.

При исследовании процесса ПРМТ в линиях клеток S2 дрозофилы, экспрессирующих eGFP-меченые белки, было отмечено, что ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров начинается позже, чем в клетках S2 дрозофилы дикого типа. Показано, что в трансгенных линиях клеток S2 дрозофилы ВД полностью формируется через 120–160 мин после их отмывки от колцемиды, а в клетках S2 дрозофилы дикого типа – примерно через 75 мин. Гипотеза о возможном влиянии использованного индуктора (CuSO_4) на динамику ПРМТ не подтвердилась. Так, при изучении динамики ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров в трансгенной линии S2+tubulin-GFP (см. п. 2.2.3.3.), для которой не требуется добавление индуктора, также была показана временная задержка в формировании ВД по сравнению с клетками S2 дрозофилы дикого типа. Наиболее вероятно, это связано с разницей в процентном содержании сыворотки в средах, использованных для культивирования данных клеток (см. п. 2.2.3.1.).

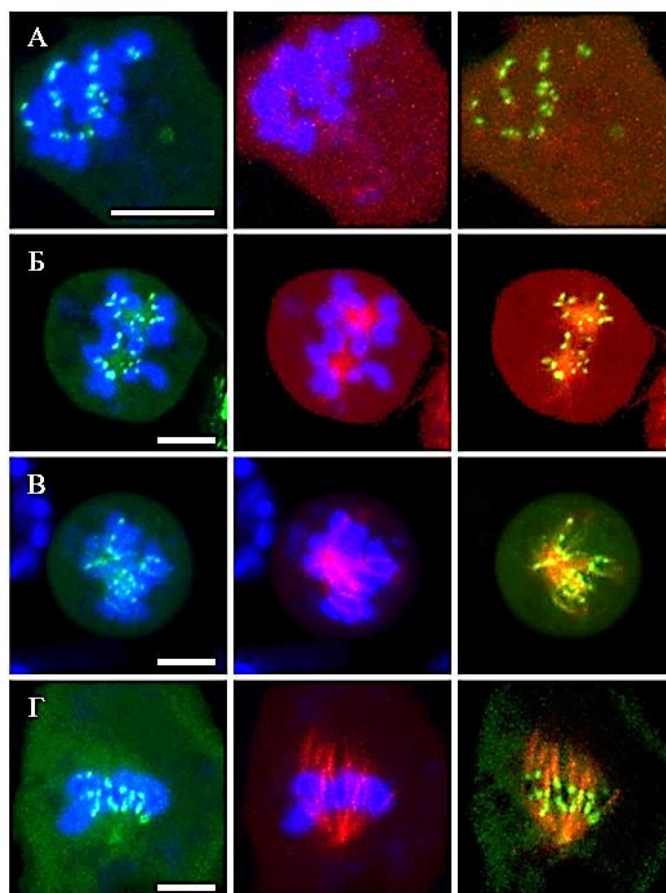


Рисунок 24. Локализация белка Mast-eGFP во время повторного роста микротрубочек после колцемидной обработки. **А.** Локализация белка Mast-eGFP до отмывки клеток от колцемиды. **Б-Г.** Локализация белка Mast-eGFP во время восстановления веретена деления. Синий цвет – ДНК-специфический краситель Hoechst (33342), красный – белок mCherry- α -тубулин, зеленый – белок Mast-eGFP (прижизненная конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Показано, что белок Mast-eGFP локализуется на хромосомах в области кинетохоров в нулевой момент времени (до отмывки клеток от колцемиды) (Рисунок 24 А), когда ПРМТ отсутствует. Это значит, что белок Mast-eGFP остается связанным с кинетохорами на протяжении всего процесса деполимеризации МТ. Накопление белка Mast-eGFP в области кинетохоров сохранялось на протяжении всего процесса сборки ВД, и сигналы белка Mast-eGFP окружали кластеры/астры МТ (Рисунок 24 Б, В). Данный белок также ко-локализуется с отрастающими пучками МТ, однако на данных МТ интенсивность флуоресценции eGFP была значительно ниже, чем в области кинетохоров (Рисунок 24 Г).

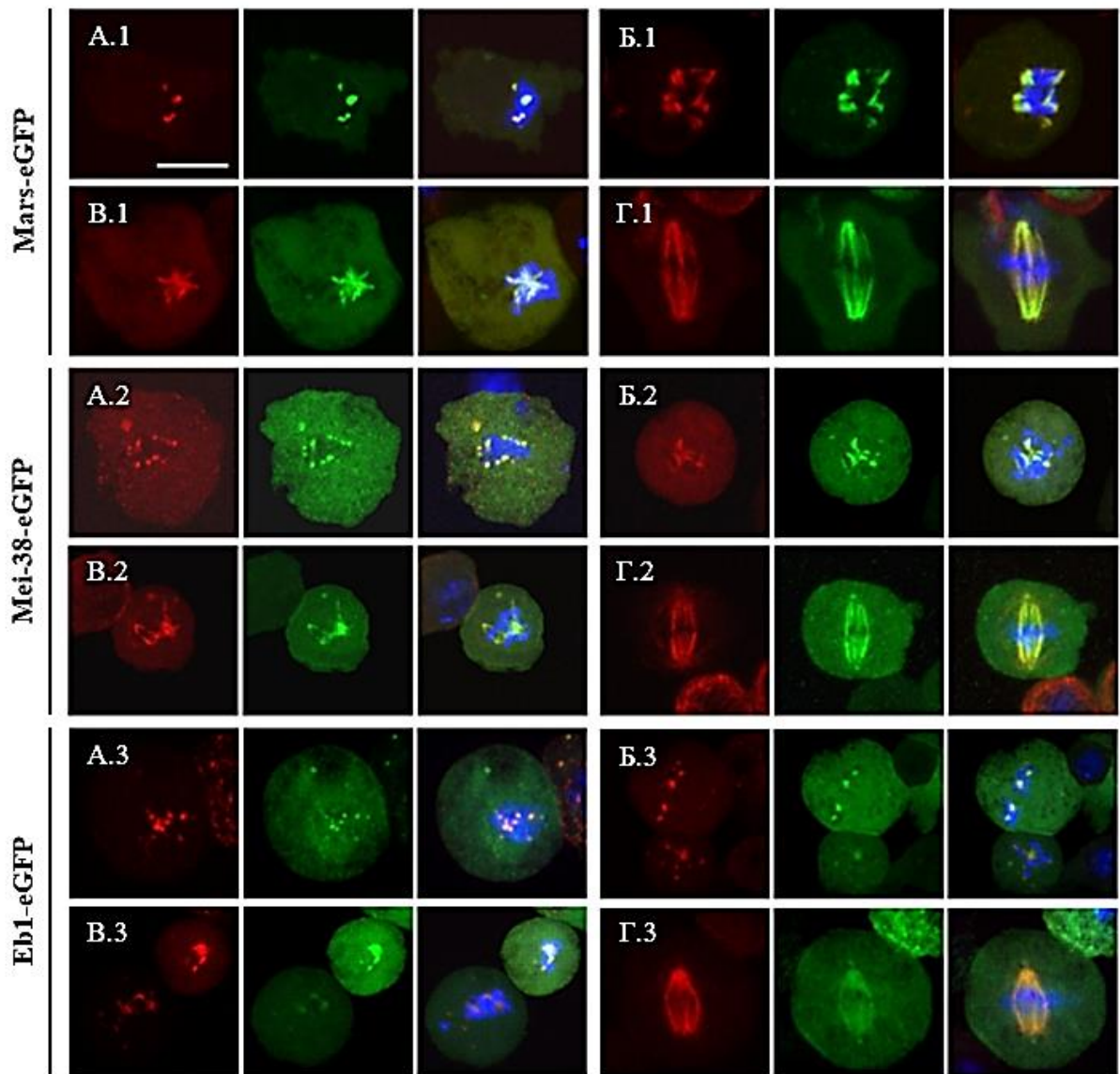


Рисунок 25. Локализация белков Mars-eGFP, Mei-38-eGFP, Eb1-eGFP в трансгенных линиях клеток S2 дрозофилы во время повторного роста микротрубочек после колцевидной обработки. **А.** Начальные фазы повторного роста микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров с небольшими сигналами тубулина, которые ко-локализуются с eGFP-мечеными белками. **Б, В.** Более поздние фазы повторного роста микротрубочек, характеризующиеся наличием кластеров/астр микротрубочек. **Г.** Полностью сформированное веретено деления после колцевидной обработки клеток. **1.** Локализация белка Mars-eGFP. **2.** Локализация белка Mei-38-eGFP. **3.** Локализация белка Eb1-eGFP. Синий цвет – ДНК-специфический краситель DAPI, красный – белок α -тубулин (компонент микротрубочек), зеленый – «белок-eGFP» (GFP) (конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Однако, в отличие от белка Mast-eGFP, при полной деполимеризации МТ ВД (нулевой момент времени) белки Mars-eGFP, Mei-38-eGFP и Eb1-eGFP не были выявлены на кинетохомах. Установлено, что белки Mars-eGFP и Mei-38-eGFP начинают ко-локализоваться с короткими кинетохорными пучками от начала ПРМТ (соответственно Рисунок 25 А.1 и А.2) и сохраняют свою локализацию в течение

всего процесса восстановления ВД (соответственно Рисунок 25 Б.1–Г.1 и Б.2–Г.2). Для белка Eb1-eGFP показано, что он ко-локализуется с вновь растущими МТ на протяжении всего процесса ПРМТ (Рисунок 25 А.3–Г.3).

3.2.5. Роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек после холодной обработки клеток *S2 D. melanogaster*

Исследование ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров после РНК-и гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* методом холодной обработки (0°C) проводилось для подтверждения результатов, полученных после коллемеидной обработки клеток *S2* дрозофилы, так как холодная обработка исключает воздействие каких-либо веществ на клетку. Анализ ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров выполнялся на временной точке 30 сек (см. п. 3.1.2.). Для каждого из исследуемых генов (и соответствующего контроля) была посчитана частота ПРМТ после холодной обработки в двух биологических повторах (минимум 100 клеток/эксперимент), итоговое количество проанализированных клеток указано в подписи к Рисунку 26.

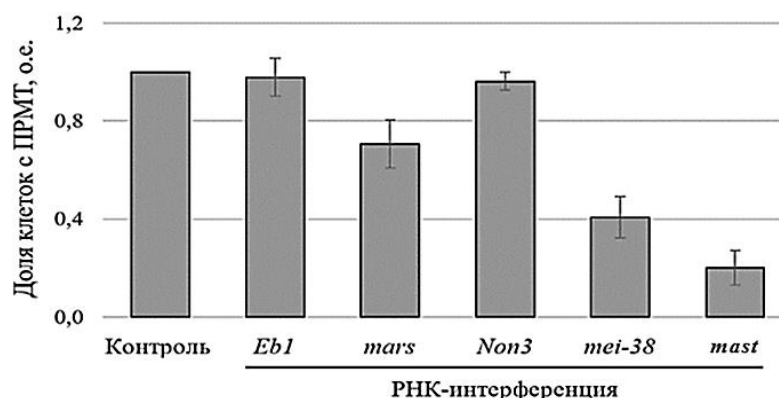


Рисунок 26. Повторный рост микротрубочек (ПРМТ) от хромосом и/или кинетохоров после РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках *S2* дрозофилы после холодной обработки (0°C) (временная точка 30 сек после возвращения клеток на 22°C). В качестве контроля использованы клетки *S2* дрозофилы, не обработанные дцРНК, но прошедшие процедуру обработки холодом. Для каждого исследуемого гена была произведена нормировка полученных значений на соответствующий контроль, значение которого было принято равным 1. Все представленные подсчеты сделаны в двух биологических повторах (приведены средние значения). Указаны 95% доверительные интервалы для медиан. Общее количество проанализированных клеток (в том числе без повторного роста микротрубочек) в контроле – 664, в клетках после РНК-интерференции гена *Eb1* – 211, гена *mars* – 200, гена *Non3* – 212, гена *mei-38* – 245 и гена *mast* – 225. о.е. – относительные единицы.

Показано, что РНК-и гена *Eb1* или *Non3* практически не влияет на ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров после холодной обработки. При РНК-и гена *mars* происходит небольшое снижение доли клеток, демонстрирующих ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров, по сравнению с контролем. Самый сильный эффект на динамику ПРМТ был обнаружен при снижении уровня экспрессии гена *mei-38* либо *mast* (Рисунок 26). Отличия в результатах, полученных с помощью коллемеидной и холодной обработок (особенно для РНК-и гена *Eb1*) могут быть вызваны тем, что при коллемеидной обработке блокируется ПРМТ от centrosom, который также вносит существенный вклад в формирование ВД.

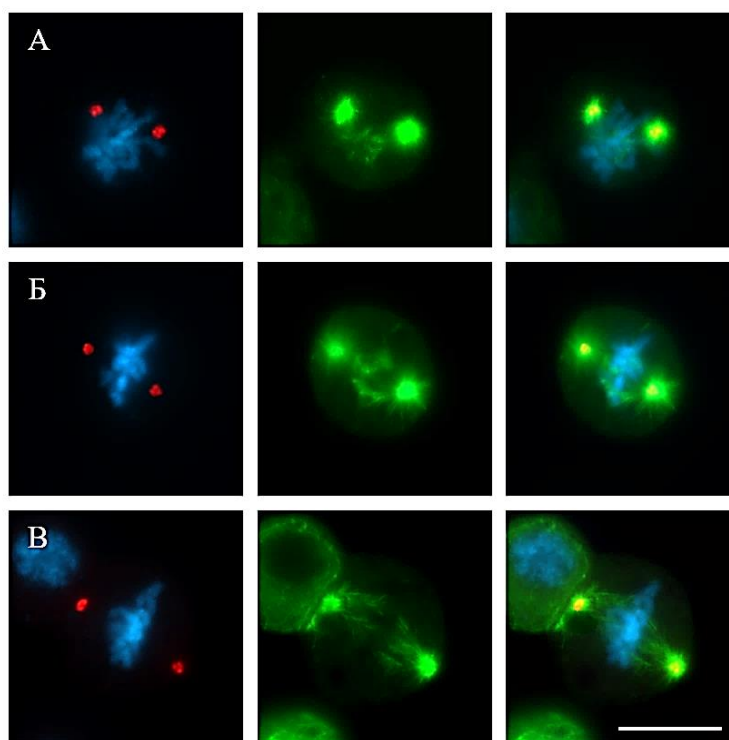


Рисунок 27. Различный характер повторного роста микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров после холодной обработки (0°C) контрольных клеток S2 дрозофилы, временная точка 30 сек после возвращения клеток на 22°C (флуоресцентная микроскопия). **А.** Один или несколько коротких пучков микротрубочек. **Б.** Длинные случайно ориентированные пучки микротрубочек. **В.** Пучки микротрубочек, ориентированные в веретено-подобную форму. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosom DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), а также ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет). Масштаб – 10 мкм.

Для изучения характера ПРМТ после обработки клеток низкой температурой (0°C) (Таблица 3) была введена следующая классификация: а) один или несколько коротких пучков МТ (Рисунок 27 А); б) длинные случайно ориентированные пучки

МТ (Рисунок 27 Б); в) пучки МТ, ориентированные так же, как в ВД (Рисунок 27 В). Подсчет характера ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров выполнялся на клетках на стадии промета- и метафазы, зафиксированных через 30 сек после их возвращения на 22°C. Обнаружено, что контрольные и РНК-и клетки демонстрируют схожий характер ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров после холодной обработки, но его типы варьируются по частоте в зависимости от РНК-и конкретного гена (Таблица 13).

Показано, что в клетках после РНК-и гена *mast*, *mars* или *mei-38* почти в 4 раза увеличена доля клеток с короткими пучками ПРМТ по сравнению с контролем (Таблица 13). При этом формирование более длинных пучков МТ при РНК-и указанных генов значительно снижено, что свидетельствует о том, что клеткам требуется больше времени для формирования функционального ВД либо же оно в части клеток не может быть сформировано вовсе.

Таблица 13. Характер повторного роста микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров после РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках S2 дрозофилы после холодной обработки (0°C) (временная точка 30 сек после возвращения клеток на 22°C).

РНК-интерференция	Характер повторного роста микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров, о.е.		
	короткие пучки МТ	длинные случайно ориентированные пучки МТ	пучки МТ, ориентированные как в веретене деления
<i>Eb1</i>	1,09 ***	1,33 **	0,52 **
<i>mars</i>	3,66 **	1,22	0,20 ***
<i>Non3</i>	1,10	0,98	0,83
<i>mei-38</i>	3,78 ***	0,85	0,19 ***
<i>mast</i>	3,57 ***	0,81	0,23 ***

В качестве контроля использованы клетки S2 дрозофилы, не подвергавшиеся обработке дцРНК. Представлены средние значения как минимум двух биологических повторов после нормирования на соответствующий контроль, значение которого было принято равным 1. МТ – микротрубочки, о.е. – относительные единицы. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (χ^2 тест).

При РНК-и гена *Eb1* примерно на треть увеличивается количество клеток с длинными, случайным образом ориентированными повторно растущими МТ от хромосом и/или кинетохоров, при этом доля клеток с повторно растущими кинетохорными пучками, ориентированных как в ВД, снижена вдвое. РНК-и гена *Non3* статистически значимо не влияет на характер ПРМТ от хромосом и/или

кинетохоров (Таблица 13). Измерения интенсивности флуоресценции тубулина в экспериментах по холодной обработке клеток S2 дрозофилы не выполнялись по причине того, что в большинстве клеток ПРМТ от centrosом накладывались на ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров. Это не затрудняло подсчет характера и динамики ПРМТ, однако вносило большую вероятность ошибки при анализе интенсивности флуоресценции тубулина.

Отмечена вариативность характера кинетохор-зависимого ПРМТ в зависимости от РНК и генов, кодирующих исследуемые белки – в клетках формируются либо преимущественно короткие повторно растущие пучки МТ от хромосом и/или кинетохоров, либо же появляется больше клеток с длинными кинетохорными пучками. Было выдвинуто предположение, что наблюдаемые изменения могут отражать либо только специфические дефекты формирования МТ от хромосом и/или кинетохоров, либо же быть следствием эффекта РНК-и исследуемых генов на восстановление всего ВД (в том числе и на centrosом-зависимое повторное формирование МТ). Как результат, снижение эффективности кинетохор-зависимого ПРМТ в клетке может приводить к увеличению доступных димеров тубулина, которые могут пассивно включаться в полюсные МТ (астры), что приведет к увеличению их размера. Однако следует учитывать, что размер повторно сформированных полюсных МТ может зависеть не только от доступности димеров тубулина, но и от участия конкретного белка в процессе centrosом-зависимого формирования МТ. Исходя из этих соображений, данные о размере полюсных МТ интерпретируются с осторожностью.

Влияние РНК-и исследуемых генов на размер полюсных МТ (астр) изучалось с использованием холодной обработки (0°C) для деполимеризации МТ, поскольку данный подход не влияет на процесс centrosом-зависимого ПРМТ (Рисунок 28). Измерения производились в промета- и метафазных клетках с биполярными ВД по описанному в п. 2.2.5.1. протоколу. Было показано, что РНК-и гена *Eb1* приводит к небольшому, однако статистически значимому уменьшению размера полюсных МТ. РНК-и гена *Non3* или *mast* приводит к увеличению размера полюсных МТ. Для РНК-и гена *Non3* увеличение размера астр соотносится с наблюдаемым фенотипом, при котором визуально наблюдалось увеличение размера полюсных МТ по сравнению с

контрольными клетками. РНК-и гена *mars* либо *mei-38* немного уменьшает размер полюсных МТ после холодной обработки (Рисунок 28).

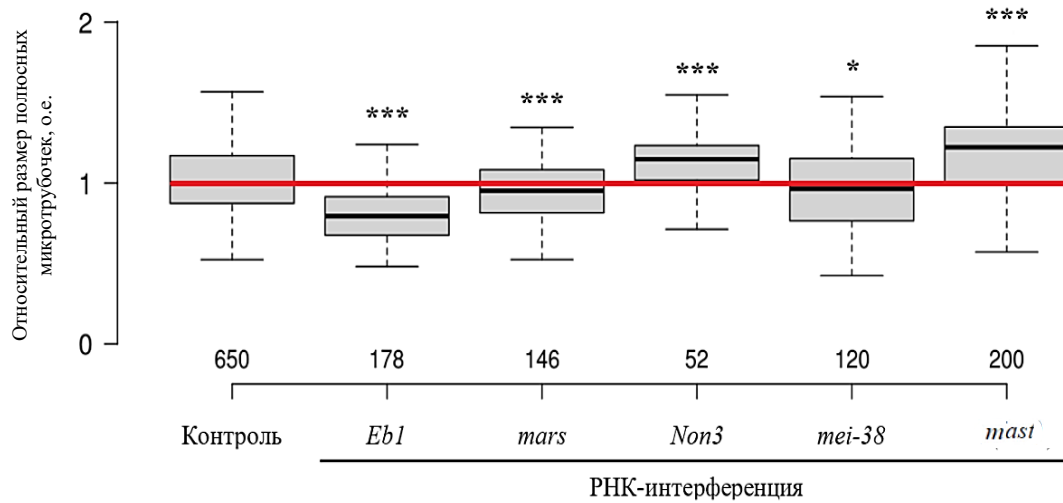


Рисунок 28. Относительный размер полюсных микротрубочек (астр) при РНК-интерференции генов *Ebl*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в сочетании с методом холодной обработки (0°C) в клетках S2 дрозофилы (временная точка 30 сек после возвращения клеток на 22°C). Представлены медианные значения как минимум двух биологических повторов после нормирования на соответствующий контроль, значение которого было принято равным 1. Под графиком указано количество измеренных астр. Красная линия – медианное значение для контрольных клеток. о.е. – относительные единицы. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (*U*-критерий Манна - Уитни).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Дедолимеризация микротрубочек веретена деления

Одним из способов изучения механизмов кинетохор-зависимого формирования МТ является анализ повторного роста МТ (ПРМТ) после дедолимеризации МТ антимиотическими препаратами либо воздействием низких температур. Настоящее исследование демонстрирует то, что метод дедолимеризации влияет на характер ПРМТ и процесс повторной сборки ВД в клетках S2 дрозофилы. Ранее в работах, проведенных на клетках млекопитающих, показано, что первые повторно растущие МТ после индуцированной нокодазолом дедолимеризации образуются около кинетохоров (Tulu et al., 2006; Torosantucci et al., 2008). При дедолимеризации МТ, вызванной воздействием холода, полюсные МТ, формирующиеся центросом-зависимым образом, образуются в первую очередь (Torosantucci et al., 2008) (Рисунок 26). При анализе характера ПРМТ после холодной обработки различными низкими температурами нами было отмечено увеличение длины полюсных МТ в клетках, инкубированных при -2°C , по сравнению с клетками, инкубированными при 0°C , что может отражать наличие повышенного пула неполимеризованного тубулина (Tulu et al., 2006; Vucchiarelli et al., 2009; Hayward et al., 2014). Вероятнее всего, это происходит из-за ингибирования кинетохор-зависимого ПРМТ, и по этой причине наблюдается его серьезное снижение. При этом инкубация клеток при -2°C не влияет на центросом-зависимое формирование МТ.

Иная ситуация обстоит с характером ПРМТ после колцевидной обработки клеток S2 дрозофилы. Нами было отмечено возобновление ПРМТ только от кинетохоров, при этом центросом-зависимый ПРМТ отсутствовал практически во всех клетках (Рисунок 23). Формирование анастрального биполярного ВД происходило исключительно за счет вновь сформированных кинетохорных волокон. Есть предположение, что в результате обработки колцевидом ингибируется центросом-зависимое формирование МТ из-за фрагментации перицентриолярного материала, как это наблюдается в клетках млекопитающих, обработанных низкими концентрациями колцевиды либо нокодазола (Sellitto, Kuriyama, 1988; Jordan et al., 1992). Однако, при анализе иммуноокрашенных клеток S2 дрозофилы антителами

против DSpd2 (маркера centrosом) и γ -тубулина (маркер комплекса γ -TuRC) после колцевидной обработки нами было показано, что перицентриолярный материал остается компактным, даже если centrosомы утратили способность к формированию МТ (Pavlova et al., 2016). Может ли в таком случае ПРМТ от centrosом ингибироваться каким-то другим образом? При исследовании ПРМТ после колцевидной обработки клеток S2 дрозофилы с РНК-и гена *Klp10A* нами было отмечено, что большая часть centrosом (55%) формировали пучки МТ (Porova et al., 2022). Ранее для белка Klp10A из семейства кинезинов-13 было показано, что он играет роль в деполимеризации МТ (Rogers et al., 2004; Goshima, Vale, 2005). Примечательно, что мы отметили, что centrosомы клеток с РНК-и гена *Klp10A* показали те же количества белка DSpd2, что и контрольные клетки (Porova et al., 2022). Это предполагает, что способность клеток с РНК-и гена *Klp10A* стимулировать ПРМТ после колцевидной обработки не зависит от изменения количества белков перицентриолярного материала, таких как белок DSpd2. На основе этих данных был сделан вывод, что centrosомы клеток, обработанных колцевидом, сохраняют некую способность к формированию МТ, но при этом повторно растущие МТ особенно чувствительны к деполимеразе Klp10A. Альтернативное предположение состоит в том, что centrosомы после обработки колцевидом утрачивают способность защищать минус-концы МТ от активности белка Klp10A. Так или иначе, данные гипотезы требуют дальнейшего детального исследования.

4.2. Роль белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в кинетохор-зависимом формировании микротрубочек веретена деления в культуре клеток S2 *D. melanogaster*

В рамках данной работы было показано, что механизмы, лежащие в основе кинетохор-зависимого формирования МТ после деполимеризации тубулина могут быть исследованы с помощью метода РНК-и в клетках S2 дрозофилы. Однако неожиданно обнаружено, что характер кинетохор-зависимого ПРМТ (Рисунок 23, 27) в контрольных клетках и клетках после РНК-и при деполимеризации МТ одинаков как при обработке колцевидом, так и при использовании низкой температуры (0°C), и, следовательно, не зависит от способа

деполимеризации МТ. Основное отличие между контрольными образцами и образцами после РНК-и заключается в доле клеток с тем или иным типом повторно сформированных МТ (Таблица 12, 13). Таким образом, можно сделать заключение, что РНК-и исследуемых генов влияет только на динамику полимеризации тубулина, но не на процесс кинетохор-зависимого ПРМТ в принципе. Это наблюдение может указывать на особую генетическую устойчивость процесса формирования МТ от хромосом и/или кинетохоров, поскольку этот процесс находится под контролем многих генов, которые, по крайней мере, частично функционально избыточны. Это неудивительно, учитывая тот факт, что эффективность и надежность процесса клеточного деления является ключевым фактором для развития и существования организмов, а кинетохор-зависимый способ формирования МТ не только необходим, но и достаточен для сборки ВД в большинстве эукариотических клеток.

Ранее было обнаружено, что длина ВД в клетках с РНК-и гена *Eb1*, *mars*, *mei-38* или *mast* значительно меньше чем в контрольных клетках S2 дрозофилы. Полученные нами результаты показывают, что фенотип «короткое ВД» после РНК-и исследуемых генов в клетках S2 дрозофилы обусловлен нарушением динамики и характера кинетохор-зависимого формирования МТ в промета- и метафазных клетках после холодной или колцемидной обработки. Для дрозофилы также известны другие белки, влияющие на кинетохор-зависимый ПРМТ, и снижение количества которых приводит к укорочению ВД. Это такие белки, как белок Misato (Mst) и взаимодействующие с ним белки комплексов TSP-1 и Prefoldin (Mottier-Pavie et al., 2011; Palumbo et al., 2015), белок Ensconsin, имеющий гомологию к белку MAP7 человека (Gallaud et al., 2014), и МТ-полимераза Msps (ТОGp у человека) (Bucciarelli et al., 2009; Goshima et al., 2005). По данным скринингов на основе РНК-и метода в клетках S2 дрозофилы идентифицировано множество других генов, связанных с фенотипом короткого ВД (Somma et al., 2008; Goshima et al., 2007), но приводит ли снижение количества белков, кодируемых этими генами, к нарушению кинетохор-зависимого ПРМТ на момент выполнения данного исследования, не известно. Таким образом, высока вероятность выявления при дальнейших исследованиях других белков, также играющих роль в кинетохор-зависимом формировании МТ ВД.

Данная работа дает представление о генетическом/молекулярном контроле процесса кинетохор-зависимого ПРМТ. Ранее на клетках S2 дрозофилы было показано, что белок Mast обеспечивает включение субъединиц тубулина в плюс-концы зрелых пучков МТ, соединенных с кинетохорами (Maiato et al., 2005). Было высказано предположение, что белок CLASP1 человека выполняет схожую функцию (Maiato et al., 2003). Однако, опубликованные доказательства того, что белки семейства CLASP контролируют кинетохор-зависимое образование МТ в клетках млекопитающих, отсутствуют. У *Xenopus* ген *Xorbit*, ортолог гена *mast* дрозофилы, необходим для индуцированного хроматином формирования МТ (Hannak et al., 2006). В настоящем исследовании показано, что РНК-и гена *mast* приводит к сильному снижению динамики ПРМТ от кинетохоров, а также что белок Mast-eGFP локализуется в области кинетохоров на всех этапах ПРМТ. Это может свидетельствовать о том, что белок Mast является ключевым регулятором удлинения плюс-концов МТ при кинетохор-зависимом ПРМТ.

В ходе данного исследования нами обнаружено, что для кинетохор-зависимого процесса ПРМТ необходимы белки Mars (гомолог белка HURP человека) и Mei-38 (гомолог белка TPX2 человека). Ранее исследования на клетках млекопитающих показали, что белок TPX2 взаимодействует со множеством митотических белков, включая белок Aurora A (AURKA) и белковый комплекс augmin, способствуя зарождению и связыванию МТ. Также показано, что белок TPX2 необходим как для образования k-волокон, так и для кинетохор-зависимого роста МТ (Petry, 2016; Tulu et al., 2016; Liu et al., 2021). Белок HURP обладает МТ-связывающей активностью и необходим для стабильности кинетохорных волокон и кинетохор-зависимого формирования МТ (Torosantucci et al., 2008; Sillje et al., 2006). Предыдущие работы показали, что в клетках S2 дрозофилы, лишенных функциональных центросом, кинетохор-зависимое образование МТ не контролируется путем RCC1-RanGTP (Moutinho-Pereira et al., 2013). Тем не менее, в данном исследовании показано, что гомологи белков TPX2 (Mei-38) и HURP (Mars) у дрозофилы необходимы для кинетохор-зависимого ПРМТ, так же, как и их аналоги у позвоночных, которые регулируются ГТФазой Ran (Tulu et al., 2006; Casanova et al., 2008). В настоящей работе показано, что белки Mars-eGFP и Mei-38-eGFP ко-локализуются с кинетохорными МТ с самых ранних стадий ПРМТ до полной

сборки ВД. Это говорит о том, что оба этих белка выполняют функции, необходимые для правильной сборки и стабильности к-волокон после деполимеризации МТ ВД.

В данном исследовании показано, что белок Eb1-eGFP ко-локализуется с повторно-формирующимися МТ от хромосом и/или кинетохоров с самых ранних стадий ПРМТ до полной сборки ВД, а также что РНК-и гена *Eb1* подавляет процесс кинетохор-зависимого ПРМТ. У позвоночных информация о роли ортолога белка Eb1 в процессе кинетохор-зависимого ПРМТ отсутствуют на момент выполнения данного исследования. Белок EB1 был обнаружен в каждом организме и почти в каждом исследованном типе клеток, включая нейрональные, лимфоцитарные и эпителиальные клетки (Tirnauer et al., 2000). Для *S. cerevisiae* был выявлен единственный белок, названный BIM1 (binding to microtubules 1), гомологичный последовательности белка EB1 млекопитающих, и показано, что он взаимодействует с α -тубулином в дрожжевом двугибридном скрининге (Schwartz et al., 1997), что схоже с белком Eb1 дрозофилы. У человека описаны две группы белков-ортологов белку Eb1 дрозофилы на момент выполнения данного исследования, а именно сообщалось о белках EB1, EB2, EB3 и EBF3, а также о высокородственных белках RP1, RP2 и RP3 (Su et al., 1995; Renner et al., 1997; Juwana et al., 1999; Nakagawa et al., 2000). Учитывая, что белок Eb1, по-видимому, выполняет консервативные митотические функции у различных организмов, то мы можем предположить, что его ортологи у позвоночных также могут контролировать кинетохор-зависимое формирование МТ.

Что же касается белка Non3, то с ним немного иная ситуация. Показано, что белок Non3 является одним из белков, локализующихся в ядрышке дрозофилы (Andreyeva et al., 2019). Изменения в морфологии и функции ядрышка тесно связаны с ростом и пролиферацией клеток (Scherl et al., 2002; Tafforeau et al., 2013). Ранее в литературе было показано, что РНК-и гена *Non3* приводит к формированию короткого ВД в клетках S2 дрозофилы предположительно из-за нарушения общего уровня синтеза белка тубулина (Moutinho-Pereira et al., 2013), поскольку белок Non3 вероятно вовлечен в синтез рибосом (Morita et al., 2002; Zhang et al., 2007; Asano et al., 2015). В настоящем исследовании нами было отмечено, что при РНК-и гена *Non3* происходит статистически незначимое уменьшение длины ВД по сравнению с контролем, что не согласуется с ранее опубликованными данными (Moutinho-Pereira et al., 2013). Важно отметить, что нами не было обнаружено снижения общего количества тубулина

(основного составляющего белка МТ) при РНК-и гена *Non3* в клетках S2 дрозофилы (Andreyeva et al., 2019). Таким образом, ранее опубликованные в статье научной группы Moutinho-Pereira (Moutinho-Pereira et al., 2013) результаты о том, что РНК-и этого гена в клетках S2 дрозофилы приводит к формированию короткого ВД, а также предполагаемый механизм формирования короткого ВД вследствие нарушения общего уровня синтеза белка тубулина, нами не подтвердились.

В работе Андреевой Е.Н. и коллег показано, что в клетках вентрально-мозгового ганглия личинок дрозофилы третьего возраста белок *Non3* является компонентом ядрышка, и у мутантов по гену *Non3* происходят изменения в функционировании ядрышка, поскольку нарушается локализация белка Fibrillarin в плотном фибриллярном компоненте ядрышка (Andreeva et al., 2019), важного для пост-трансляционной модификации и процессинга рРНК (Henras et al., 2008; Trinkle-Mulcahy, 2018). Известно, что порядка 70% белков ядрышка задействованы в процессах, напрямую не имеющих отношения к биогенезу рибосом, и часть из них может быть задействованным в клеточном делении (Scherl et al., 2002; Tafforeau et al., 2013). К таким белкам относятся белки Modulo и CAL1, обеспечивающие функциональную связь между ядрышком и формированием центромер у дрозофилы (Chen et al., 2012; Perrin et al., 1998; Chen et al., 2014). Белок Modulo дрозофилы близок по своей структуре и функциям белку Nucleolin млекопитающих, выполняющему функцию регулятора структуры хроматина (Ginisty et al., 1999; Chen et al., 2012). У дрозофилы белок Modulo образует комплекс с шапероном CAL1 – показано, что данные белки физически взаимодействуют преимущественно внутри ядрышка, но не в центромере (Chen et al., 2012; Padeken and Heun, 2013; Chen et al., 2014). Шаперон CAL1 является лимитирующим фактором для загрузки в центромеры белка CID у дрозофилы (Erhardt et al., 2008) – одного из ключевых элементов в формировании кинетохора. Белки Modulo, CAL1 и CID являются взаимозависимыми, поскольку снижение уровня белка CID в клетках наблюдается при нокдауне гена, кодирующего белок Modulo либо CAL1 (Chen et al., 2012; Chen et al., 2014). Можно предположить, что РНК-и гена *Non3* приводит к нарушению функций ядрышка по депонированию белков Modulo и CAL1 в интерфазе, вследствие чего белки могут находиться в другом клеточном компартменте и/или снижаться их количество в клетке. По этой причине может быть нарушено формирование кинетохоров из-за невозможности загрузки

белка CID в центромеры. Таким образом, нарушение формирования центромер, и, следовательно, сборки белкового кинетохорного комплекса может являться одной из причин обнаруженного нами при холодной обработке (0°C) клеток с РНК-и гена *Non3* увеличения размера астральных МТ (которое также было отмечено при исследовании фенотипа клеток S2 дрозофилы после снижения количества белка *Non3*). Это может происходить из-за увеличения пула неполимеризованного тубулина вследствие ингибирования ПРМТ от кинетохор, что подтверждается снижением интенсивности флуоресценции пучков МТ, вновь формирующихся от кинетохоров после колцемидной обработки клеток S2 дрозофилы с РНК-и гена *Non3*.

Тот факт, что снижение количества белка *Non3* статистически значимо влияет на процесс кинетохор-зависимого ПРМТ после колцемидной обработки только на ранних стадиях повторного формирования МТ, может свидетельствовать о том, что белок *Non3* не является критически важным на всем протяжении процесса кинетохор-зависимого формирования МТ за счет компенсации его функций другими белками в клетке. Поскольку влияние РНК-и гена *Non3* на сборку ВД все же отмечено, то вопрос о роли данного белка в митозе клеток S2 дрозофилы остается открытым. В данном исследовании при изучении локализации белка *Non3-eGFP* во время митоза наблюдалось некоторое обогащение *eGFP* сигнала вокруг хромосом на стадии метафазы, при этом ко-локализации гибридного белка с МТ не выявлено. Обнаружено, что, начиная со стадии телофазы, белок *Non3-eGFP* локализуется в ядрышке, где предположительно необходим для биосинтеза рибосом (Morita et al., 2002; Zhang et al., 2007; Asano et al., 2015). Это обстоятельство наталкивает на мысль, что белок *Non3* может являться так называемым «moonlighting» белком. В 1999 г. Констанс Дж. Джеффри ввела термин «moonlighting proteins» для описания белков, которые при одной и той же аминокислотной последовательности способны выполнять одну или несколько дополнительных функций помимо своей первично описанной (Jeffery, 1999). Показано, что «moonlighting» белок может выполнять различные функции в разных клеточных компартментах и/или в сочетании с разными партнерами по связыванию (Somma et al., 2020). Митоз является идеальным процессом, благоприятствующим приобретению «moonlighting» функций, поскольку он сопровождается серьезной перестройкой клеточных структур, что позволяет многим белкам изменять локализацию в клетке. Например, во время конденсации

хромосом многие белки хроматина высвобождаются сначала в нуклеоплазму, затем при разрушении ядерной оболочки оказываются в цитоплазме и вновь связываются с хроматином только тогда, когда хромосомы деконденсируются во время телофазы. Вследствие этого, в митозе с компонентами ВД могут связываться белки, которые во время интерфазы выполняют внутриядерные функции (Somma et al., 2020). Показано, что факторы ремоделирования хроматина ISWI и CHD4 связываются с МТ как в клетках S2 дрозофилы, так и в клетках *Xenopus* и необходимы для сборки и функционирования ВД (Yokoama et al., 2009; Yokoama et al., 2013).

Во время митоза некоторые клеточные процессы, такие как транскрипция и сплайсинг, сильно редуцированы (Gottesfeld, 1997; Hofmann et al., 2010; Palozola et al., 2017), поэтому белки, участвующие в этих процессах, находятся в очень благоприятной ситуации для приобретения дополнительных функций в митозе. АТФаза INO80 человека, участвующая как в репликации ДНК, так и в ремоделировании хроматина, связывается с митотическим ВД и необходима для сегрегации хромосом (Hur et al., 2010; Park et al., 2011). Для млекопитающих было показано, что во время открытого митоза, когда ядрышко разбирается, многие ядрышковые белки и РНК вокруг хромосом образуют перихромосомный компартмент (также называемый «периферия хромосом», «митотический хромосомный клей») (Booth et al., 2014). Периферия хромосом представляет собой сложную сеть белков и молекул РНК (преимущественно рибосомных РНК), функция которой остается загадочной. Удвоение и разделение генома на две дочерние клетки требует резкой реорганизации ядра с превращением хроматиновой сети в характерные конденсированные митотические хромосомы, сопровождающейся разборкой ядрышка. Ядрышковые белки Fibrillarin, Nucleolin, Nucleophosmin, Peripherin и Ki-67 известны у млекопитающих в качестве компонентов периферии хромосом (Yasuda, Maul, 1990; Hernandez-Verdun, Gautier, 1994; Van Hooser et al., 2005; Jansen et al., 1991; Tollervey, Kiss, 1997; Jiang et al., 2000). Белок Ki-67 является ключевым белком периферии хромосом у млекопитающих, и для него не показано наличие ортологов у дрозофилы. Отмечено, что белок Ki-67 во время интерфазы локализуется в фибриллярном компоненте ядрышка, а во время митоза происходит перераспределение данного белка с последующей его локализацией на периферии митотических хромосом, где он обеспечивает пространственное отделение хромосом

друг от друга в ходе митоза в клетках человека (Isola et al., 1990; Cuylen et al., 2016). РНК-и гена *MKI67*, кодирующего белок Ki-67 у человека, приводит к слипанию хромосом в единую неподвижную массу на стадии метафазы, из-за чего они не могут нормально разделяться в анафазе (Booth et al., 2016), а также приводит к тому, что другие периферийные белки хромосом теряют свою локализацию в митозе (Booth et al., 2014). Эти данные позволяют сделать предположение о возможном взаимодействии белков хромосомной периферии и структурных белков хромосом. Мы предполагаем, что во время митоза с белком Non3 происходит схожая ситуация, и, вероятно, он выполняет роль так называемого «митотического хромосомного клея». Так или иначе, участие белка Non3 во время митоза требует дальнейшего детального исследования.

4.3. Модель кинетохор-зависимого формирования микротрубочек веретена деления

Один из основных вопросов при изучении формирования МТ от кинетохоров заключается в том, насколько соответствует формирование МТ во время нормального клеточного деления тому, что происходит при ПРМТ после деполимеризации ВД. Maiato и коллеги (Maiato et al., 2004) сформировали модель кинетохор-зависимого формирования МТ. В ней говорится, что формирование к-волокон начинается с генерации коротких, беспорядочно ориентированных МТ вблизи кинетохор. Плюс-концы этих МТ затем захватываются кинетохорами и продолжают там полимеризоваться, что приводит к удлинению к-волокон. В результате минус-концы МТ будут отталкиваться от кинетохоров и накапливаться на концах отрастающих к-волокон (Maiato et al., 2004). При этом, механизм, лежащий в основе начального повторного роста МТ, является предметом активного исследования. Mishra и соавт. (Mishra et al., 2010) обнаружили, что белки Nup107-160 и γ -тубулин локализуются рядом с кинетохорами в клетках HeLa на ранних стадиях ПРМТ после индуцированной нокодазолом деполимеризации МТ. Они также показали, что кинетохор-зависимый ПРМТ снижается в отсутствие белков Nup107-160 или γ -тубулина. Они пришли к выводу, что, хотя эти результаты совместимы с моделью Maiato (Maiato et al., 2004), они также согласуются с

возможностью того, что МТ закрепляются на кинетохорах минус-концами и полимеризуются на дистальных плюс-концах на начальных стадиях повторного кинетохор-зависимого роста, образуя промежуточный продукт сборки, который исчезает по мере удлинения к-волокон (Mishra et al., 2010). Сходная временная инверсия полярности кинетохорных МТ была описана у *S. cerevisiae*, где кинетохоры, как полагают, формируют МТ с минус-концами, встроенными в кинетохоры, и плюс-концами, направленными наружу. Однако эти МТ не способствуют формированию метафазного веретена, так как они исчезают, когда плюс-концы МТ, исходящие из полюсов ВД, захватываются кинетохорами (Kitamura et al., 2010). Полученные в данном исследовании результаты подтверждают модель Maiato и соавт. (Maiato et al., 2004), поскольку по результатам исследования кинетохор-зависимого ПРМТ после колцевидной обработки было обнаружено, что первые короткие пучки МТ формируются в области хромосом, после чего происходит удлинение МТ с последующим восстановлением биполярного ВД, что повторяет процесс образования МТ, управляемого кинетохорами, в интактных клетках.

По результатам данного исследования мы предполагаем, что кинетохоры захватывают плюс-концы МТ, зародившихся поблизости от них, и что удлинение этих МТ первоначально происходит под действием белка Mast. Последующее формирование, удлинение и стабилизация отрастающих пучков к-волокон регулируется также при участии белков Mars, Mei-38 и Eb1.

ВЫВОДЫ

1. Холодовая деполимеризация микротрубочек при температуре 0°C позволяет изучить кинетохор-зависимое формирование веретена деления, в то время как деполимеризация микротрубочек при температуре -1°C и -2°C приводит к блокировке кинетохор-зависимого формирования микротрубочек в клетках S2 дрозофилы.
2. Деполимеризация микротрубочек веретена деления колцемидом позволяет изучать кинетохор-зависимый рост микротрубочек, поскольку колцемид препятствует центросом-зависимому повторному формированию микротрубочек веретена деления в клетках S2 дрозофилы.
3. Белки Mast, Mei-38, Mars и Eb1 необходимы для кинетохор-зависимого роста микротрубочек веретена деления в клетках S2 дрозофилы, поскольку при уменьшении количества транскриптов кодирующих их генов снижается динамика кинетохор-зависимой полимеризации тубулина, что приводит к формированию укороченного веретена деления.
4. Белок Non3 слабо влияет на повторный кинетохор-зависимый рост микротрубочек после колцемидной или холодной обработки клеток S2 дрозофилы.
5. Белок Mast – ключевой регулятор кинетохор-зависимого формирования микротрубочек, поскольку только белок Mast-eGFP ко-локализуется с хромосомами и/или кинетохорами до момента начала повторного роста микротрубочек после колцемидной обработки трансгенной линии клеток S2 дрозофилы.
6. Белки Eb1-eGFP, Mast-eGFP, Mars-eGFP, Mei-38-eGFP ко-локализуются с вновь растущими микротрубочками на протяжении всего процесса повторного формирования веретена деления после колцемидной обработки трансгенных линий клеток S2 дрозофилы.
7. Впервые показано, что белок Non3-eGFP во время митоза не ко-локализуется с микротрубочками веретена деления, однако присутствует небольшое обогащение сигнала белка Non3-eGFP вокруг хромосом на стадии метафазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Билич Г.Л., Крыжановский В.А. Биология. Полный курс: в 4 т. // Москва: Оникс. – 2009. – Т. 1. – с. 120–121.
2. Akhmanova A., Hoogenraad C.C., Drabek K., Stepanova T., Dortland B., Verkerk T., Vermeulen W., Burgering B.M., de Zeeuw C.I., Grosveld F., Galjart N. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts // *Cell*. – 2001. – V. 104. – P. 923–935.
3. Akhmanova A., Steinmetz M.O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – P. 309–322.
4. Alfaro-Aco R., Thawani A., Petry S. Structural analysis of the role of TPX2 in branching microtubule nucleation // *J. Cell Biol.* – 2017. – V. 216. – P. 983–997.
5. Andres A.J., Cherbas P. Tissue-specific ecdysone responses: Regulation of the *Drosophila* genes Eip28/29 and Eip40 during larval development // *Development*. – 1992. – V. 16. – № 4. – P. 865–876.
6. Andreyeva E.N., Ogienko A.A., Yushkova A.A., Popova J.V., Pavlova G.A., Kozhevnikova E.N., Ivankin A.V., Gatti M., Pindyurin A.V. Non3 is an essential *Drosophila* gene required for proper nucleolus assembly // *Vavilov J. of Genet. and Breeding*. – 2019. – V. 23. – № 2. – P. 190–198.
7. Asano N., Kato K., Nakamura A., Komoda K., Tanaka I., Yao M. Structural and functional analysis of the Rpf2-Rrs1 complex in ribosome biogenesis // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 9. – P. 4746–4757.
8. Ayaz P., Ye X., Huddleston P., Brautigam C.A., Rice L.M. A TOG: ab-tubulin complex structure reveals conformation-based mechanisms for a microtubule polymerase // *Science*. – 2012. – V. 337. – P. 857–860.
9. Baker B.S., Carpenter A.T. Genetic analysis of sex chromosomal meiotic mutants in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 1972. – V. 71. – P. 255–286.
10. Barbier P., Dorleans A., Dared F., Sanz L., Allegro D., Alfonso C., Knossos M., Peyrot V., Andreu J.M. Statman and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – № 41. – P. 31672–31681.

11. Basu J., Bousbaa H., Logarinho E., Li Z.X., Williams B.C., Lopes C., Sunkel C.E., Goldberg M.L. Mutations in the essential spindle checkpoint gene *bub1* cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in *Drosophila* // *J. Cell Biol.* – 1999. – 146. – № 1. – P. 13–28.
12. Baust J.M., Buehring G.C., Campbell L., Elmore E., Harbell J.W., Nims R.W., Price P., Reid Y.A., Simione F. Best practices in cell culture: an overview // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* – 2017. – V. 53. – № 8. – P. 669–672.
13. Bayliss R., Sardon T., Vernos I., Conti E. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle // *Mol. Cell.* – 2003. – V. 12. – P. 851–862.
14. Beinhauer J.D., Hagan I.M., Hegemann J.H., Fleig U. Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form // *J. Cell Biol.* – 1997. – V. 139. – P. 717–728.
15. Belyaeva E.S., Zhimulev I.F., Volkova E.I., Alekseyenko A.A., Moshkin Y.M., Koryakov D.E. Su(UR)ES: a gene suppressing DNA under replication in intercalary and pericentric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95. – P. 7532–7537.
16. Bennett D., Alphey L. Cloning and expression of mars, a novel member of the guanylate kinase associated protein family in *Drosophila* // *Gene Expr. Patterns.* – 2004. – V. 4. – P. 529–535.
17. Bergen L.G., Borisy G.G. Tubulin/colchicine complex inhibits microtubule elongation at both plus and minus ends // *J. Biol. Chem.* – 1983. – V. 258. – № 7. – P. 4190–4194.
18. Berrueta L., Tirnauer J.S., Schuyler S.C., Pellman D., Bierer B.E. The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain // *Curr. Biol.* – 1999. – V. 9. – P. 425–428.
19. Boisvert F.M., van Koningsbruggen S., Navascues J., Lamond A.I. The multifunctional nucleolus // *Nat. rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – V. 8. – P. 574–585.
20. Boleti H., Karsenti E., Vernos I. Xklp2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis // *Cell.* – 1996. – V. 84. – P. 49–59.
21. Booth D.G., Beckett A.J., Molina O., Samejima I, Masumoto H., Kouprina N., Larionov V., Prior I.A., Earnshaw W.C. 63D-CLEM Reveals that a Major Portion of Mitotic Chromosomes Is Not Chromatin // *Mol. Cell. Elsevier Inc.* – 2016. – V. 64. – № 4. – P. 790–802.

22. Booth D.G., Takagi M., Sanchez-Pulido L., Petfalski E., Vargiu G., Samejima K., Imamoto N., Ponting C.P., Tollervey D., Earnshaw W.C., Vagnarelli P. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery // *Elife*. – 2014. – V. 3. – P. 1–22.
23. Bratman S.V., Chang F. Stabilization of overlapping microtubules by fission yeast CLASP // *Dev. Cell*. – 2007. – V. 13. – P. 812–827.
24. Brittle A.L., Ohkura H. Mini spindles, the XMAP215 homologue, suppresses pausing of interphase microtubules in *Drosophila* // *EMBO J*. – 2005. – V. 24. – P. 1387–1396.
25. Brown J.B., Boley N., Eisman R., May G.E., Stoiber M.H., Duff M.O., Booth B.W., Wen J., Park S., Suzuki A.M., Wan K.H., Yu C., Zhang D., Carlson J.W., Cherbas L., Eads B.D., Miller D., Mockaitis K., Roberts J., Davis C.A., Frise E., Hammonds A.S., Olson S., Shenker S., Sturgill D., Samsonova A.A., Weiszmann R., Robinson G., Hernandez J., Andrews J., Bickel P.J., Carninci P., Cherbas P., Gingeras T.R., Hoskins R.A., Kaufman T.C., Lai E.C., Oliver B., Perrimon N., Graveley B.R., Celniker S.E. Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome // *Nature*. – 2014. – V. 512. – № 7515. – P. 393–399.
26. Brust-Mascher I., Sommi P., Cheerambathur D.K., Scholey J.M. Kinesin-5-dependent pole-ward flux and spindle length control in *Drosophila* embryo mitosis // *Mol. Biol. Cell*. – 2009. – V. 20. – P. 1749–1762.
27. Bucciarelli E., Pellacani C., Naim V., Palena A., Gatti M., Somma M.P. *Drosophila* Dgt6 Interacts with Ndc80, Msps/XMAP215, and γ -Tubulin to Promote Kinetochore-Driven MT Formation // *Curr. Biol*. – 2009. – V. 19. – № 21. – P. 1839–1845.
28. Buster D.W., Zhang D., Sharp D.J. Poleward tubulin flux in spindles: regulation and function in mitotic cells // *Mol. Biol. Cell*. – 2007. – V. 18. – P. 3094–3104.
29. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments // *Clinical Chemistry*. – 2009. – V. 55. – № 4. – P. 611–622.
30. Carazo-Salas R.E., Guarguaglini G., Gruss O.J., Segref A., Karsenti E., Mattaj I.W. Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation // *Nature*. – 1999. – V. 400. – P. 178–181.

31. Caruana G. Genetic studies define MAGUK proteins as regulators of epithelial cell polarity // *Int. J. Dev. Biol.* – 2002. – V. 46. – P. 511–518.
32. Casanova C.M., Rybina S., Yokoyama H., Karsenti E., Mattaj I.W. Hepatoma Up-Regulated protein is required for chromatin-induced microtubule assembly independently of TPX2 // *Mol Biol Cell.* – 2008. – V. 19. – № 11. – P. 4900–4908.
33. Cavazza T., Vernos I. The RanGTP Pathway: From Nucleo-Cytoplasmic Transport to Spindle Assembly and Beyond // *Front. In Cell and Dev. Biol.* – 2015. – V. 3. – P. 82.
34. Cesario J., McKim K. S. RanGTP is required for meiotic spindle organization and the initiation of embryonic development in *Drosophila* // *J. Cell Sc.* – 2011. – V. 124. – P. 3797–3810.
35. Chapman O.L., Smith H.G., King R.W. The Structure of β -Lumicolchicines // *J. Am. Chem. Soc.* – 1963. – V. 85. – № 6. – P. 803–806.
36. Cheeseman I.M., Chappie J.S., Wilson-Kubalek E.M., Desai A. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore // *Cell.* – 2006. – V. 127. – P. 983–997.
37. Cheeseman I.M., MacLeod I., Yates J.R. 3rd, Oegema K., Desai A. The CENP-F-like proteins HCP-1 and HCP-2 target CLASP to kinetochores to mediate chromosome segregation // *Curr. Biol.* – 2005. – V. 15. – P. 771–777.
38. Chen C.-C., Greene E., Bowers S.R., Mellone B.G. A Role for the CAL1-Partner Modulo in Centromere Integrity and Accurate Chromosome Segregation in *Drosophila* // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – № 9. – P. 450–494.
39. Chen R.H., Shevchenko A., Mann M., Murray A.W. Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to the kinetochore // *J. Cell Biol.* – 1998. – V. 143. – P. 283–295.
40. Chen R.H., Waters J.C., Salmon E.D., Murray A.W. Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores // *Science.* – 1996. – V. 274. – P. 242–246.
41. Chen Z.X., Sturgill D., Qu J., Jiang H., Park S., Boley N., Suzuki A.M., Fletcher A.R., Plachetzki D.C., FitzGerald P.C., Artieri C.G., Atallah J., Barmina O., Brown J.B., Blankenburg K.P., Clough E., Dasgupta A., Gubbala S., Han Y., Jayaseelan J.C., Kalra D., Kim Y.A., Kovar C.L., Lee S.L., Li M., Malley J.D., Malone J.H., Mathew T., Mattiuzzo N.R., Munidasa M., Muzny D.M., Onger F., Perales L., Przytycka T.M., Pu L.L., Robinson G., Thornton R.L.,

- Saada N., Scherer S.E., Smith H.E., Vinson C., Warner C.B., Worley K.C., Wu Y.Q., Zou X., Cherbas P., Kellis M., Eisen M.B., Piano F., Kionte K., Fitch D.H., Sternberg P.W., Cutter A.D., Duff M.O., Hoskins R.A., Graveley B.R., Gibbs R.A., Bickel P.J., Kopp A., Carninci P., Celniker S.E., Oliver B., Richards S. Comparative Validation of the *D. melanogaster* modENCODE Transcriptome Annotation // *Genome Res.* – 2014. – V. 24. – № 7. – P. 1209–1223.
42. Cherbas L., Cherbas P. "Parahomologous" gene targeting in *Drosophila* cells: an efficient, homology-dependent pathway of illegitimate recombination near a target site // *Genetics.* – 1997. – V. 145. – № 2. – P. 349–358.
43. Cherbas L., Gong L. Cell Lines // *Methods.* – 2014. – V. 68. – № 1. – P 74–81.
44. Cherbas L., Willingham A., Zhang D., Yang L., Zou Y., Eads B.D., Carlson J.W., Landolin J.M., Kapranov P., Dumais J., Samsonova A., Choi J.H., Roberts J., Davis C.A., Tang H., van Baren M.J., Ghosh S., Dobin A., Bell K., Lin W., Langton L., Duff M.O., Tenney A.E., Zaleski C., Brent M.R., Hoskins R.A., Kaufman T.C., Andrews J., Graveley B.R., Perrimon N., Celniker S.E., Gingeras T.R., Cherbas P. The Transcriptional Diversity of 25 *Drosophila melanogaster* cell lines // *Genome Res.* – 2011. – V. 21. – P. 301–314.
45. Clarke P.R., Zhang C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – P. 464–477.
46. Cole D.G., Saxton W.M., Sheehan K.B., Scholey J.M. A “slow” homotetrameric kinesin-related motor protein purified from *Drosophila* embryos // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – P. 22913–22916.
47. Conde C., Cáceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites // *Nat. Rev. Neuroscience.* – 2009. – V. 10. – P. 319–332.
48. Cooper G.M. *The cell: a molecular approach*, 2th edition // Washington, D.C. ASM Press. – 2000.
49. Crane R., Gadea B., Littlepage L., Wu H., Ruderman J.V. Aurora A, meiosis and mitosis // *Biol. Cell.* – 2004. – V. 96. – P. 215–229.
50. Currie D.A., Milner M.J., Evans C.W. The growth and differentiation *in vitro* of leg and wing imaginal disc cells from *Drosophila melanogaster* // *Development.* – 1988. – V. 102. – P. 805–814.

51. Cuylen S., Blaukopf C., Politi A.Z., Müller-Reichert T., Neumann B., Poser I., Ellenberg J., Hyman A.A., Gerlich D.W. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes // *Nature*. – 2016. – Vol. 535. – № 7611. – P. 308–312.
52. D'Avino P.P., Savoian M.S., Glover D.M. Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy // *J. Cell Sc.* – 2005. – V. 118. – P. 1549–1558.
53. De Brabander M.J., Van de Veire R.M., Aerts F.E., Borgers M., Janssen P.A. The effects of methyl (5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate, (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured *in vitro* // *Cancer Res.* – 1976. – V. 36. – № 3. – P. 905–916.
54. Desai A., Mitchison T.J. Microtubule polymerization dynamics // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1997. – V. 13. – P. 83–117.
55. Desai A., Verma S., Mitchison T.J., Walczak C.E. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes // *Cell*. – 1999. – V. 96. – P. 69–78.
56. Drabek K., van Ham M., Stepanova T., Draegestein K., van Horsen R., Sayas C.L., Akhmanova A., Ten Hagen T., Smits R., Fodde R., Grosveld F., Galjart N. Role of CLASP2 in microtubule stabilization and the regulation of persistent motility // *Curr. Biol.* – 2006. – V. 16. – P. 2259–2264.
57. Ducat D., Zheng Y. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation // *Exp. Cell Res.* – 2004. – V. 301. – P. 60–67.
58. Echalié G., Ohanessian A. Isolement, en cultures *in vitro*, de lignées cellulaires diploïdes de *Drosophila melanogaster* // *Cr. Hebd. Seanc. Acad. Sci.* – 1969. – V. 268. – P. 1771–1773.
59. Eckerdt F., Eyers P.A., Lewellyn A.L., Prigent C., Maller J.L. Spindle pole regulation by a discrete Eg5-interacting domain in TPX2 // *Curr. Biol.* – 2008. – V. 18. – P. 519–525.
60. Eisenhaber F., Wechselberger C., Kreil G. The Brix domain protein family – a key to the ribosomal biogenesis pathway? // *Trends Biochem. Sci.* – 2001. – V. 26 – № 6. – P. 345–347

61. Erhardt S., Mellone B.G., Betts C.M., Zhang W., Karpen G.H., Straight A.F. Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation // *J. Cell Biol.* – 2008. – V. 183. – № 5. – P. 805–818.
62. Eyers P.A., Erikson E., Chen L.G., Maller J.L. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A // *Curr. Biol.* – 2003. – V. 13. – P. 691–697.
63. Fang X., Zhang P. Aneuploidy and tumorigenesis // *Sem. in Cell Dev. Biol.* – 2011. – V. 22. – P. 595–601.
64. Fededa J.P., Gerlich D.W. Molecular control of animal cell cytokinesis // *Nat. Cell Biol.* – 2012. – V. 14. – P. 440–447.
65. Fedorova S.A., Chubykin V.L., Gusachenko A.M., Omelyanchuk L.V. Mutation chromosome bows (chbv40) associated with the abnormal chromosome spindle in *Drosophila melanogaster* // *Genetika.* – 1997. – V. 33. – P. 1502–1509.
66. Fernandez N., Chang Q., Buster D.W., Sharp D.J., Ma A. A model for the regulatory network controlling the dynamics of kinetochore microtubule plus-ends and poleward flux in metaphase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – V. 106. – P. 7846–7851.
67. Foley E.A., Kapoor T.M. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signaling at the kinetochore // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – V. 14. – P. 25–37.
68. Gadde S., Heald R. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle // *Curr. Biol.* – 2004. – V. 14R. – P. 797–805.
69. Gallaud E., Caous R., Pascal A., Bazile F., Gagné J-P., Huet S., Poirier G.G., Chrétien D., Richard-Parpaillon L., Gietl R. Ensconsin/Map7 promotes microtubule growth and centrosome separation in *Drosophila* neural stem cells // *J. Cell Biol.* – 2014. – V. 204. – № 7. – P. 1111–1121.
70. Gandhi R., Bonaccorsi S., Wentworth D., Doxsey S., Gatti M., Pereira A. The *Drosophila* kinesin-like protein KLP67A is essential for mitotic and male meiotic spindle assembly // *Mol. Biol. Cell.* – 2004. – V. 15. – P. 121–131.
71. Ganem N.J., Upton K., Compton D.A. Efficient mitosis in human cells lacking poleward microtubule flux // *Curr. Biol.* – 2005. – V. 15. – P. 1827–1832.
72. Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P. Structure and functions of nucleolin // *J. Cell Sci.* – 1999. – V. 112. – № 6. – P. 761–772.

73. Giubettini M., Asteriti I.A., Scrofani J., de Luca M., Lindon C., Lavia P., Guarguaglini G. Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2 // *J. Cell Sc.* – 2011. – V. 124. – P. 113–122.
74. Goshima G. Assessment of mitotic spindle phenotypes in *Drosophila* S2 cells // *Methods in cell biology*, Academic Press. – 2010. – V. 97. – P. 259–275.
75. Goshima G. Identification of a TPX2-Like Microtubule-Associated Protein in *Drosophila* // *PLoS ONE* – 2011. – V. 6. – № 11: e28120.
76. Goshima G., Nedelec F., Vale R.D. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins // *J. Cell Biol.* – 2005. – V. 171. – № 2. – P. 229–240.
77. Goshima G., Scholey J.M. Control of mitotic spindle length // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2010. – V. 26. – P. 21–57.
78. Goshima G., Vale R.D. Cell cycle-dependent dynamics and regulation of mitotic kinesins in *Drosophila* S2 cells // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – V. 16. – P. 3896–3907.
79. Goshima G., Wollman R., Goodwin N., Zhang J.M., Scholey J.M., Vale R.D., Stuurman N. Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells // *Science.* – 2007. – V. 316. – P. 417–421.
80. Goshima G., Wollman R., Stuurman N., Scholey J.M., Vale R.D. Length control of the metaphase spindle // *Curr Biol.* – 2005. – V. 15. – № 22. – P. 1979–1988.
81. Gottesfeld J.M. Mitotic repression of the transcriptional machinery // *Trends Biochem. Sci.* – 1997. – V. 22. – P. 197–202.
82. Gramates L.S., Marygold S.J., Santos G.D., Urbano J.M., Antonazzo G., Matthews B.B., Rey A.J., Tabone C.J., Crosby M.A., Emmert D.B., Falls K., Goodman J.L., Hu Y., Ponting L., Schroeder A.J., Strelets V.B., Thurmond J., Zhou P. The FlyBase Consortium. FlyBase at 25: looking to the future // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – № 1. – P. 663–671.
83. Hamaguchi M.S., Hiramoto Y. Analysis of the Role of Astral Rays in Pronuclear Migration in Sand Dollar Eggs by the Colcemid-UV Method // *Dev. Growth. Differ.* – 1986. – V. 28. – № 2. – P. 143.
84. Hannak E., Heald R. Xorbit/CLASP links dynamic microtubules to chromosomes in the *Xenopus* meiotic spindle // *J. Cell Biol.* – 2006. – V. 172. – P. 19–25.

85. Hayward D., Metz J., Pellacani C., Wakefield J.G. Synergy between multiple microtubule generating pathways confers robustness to centrosome-driven mitotic spindle formation // *Dev Cell.* – 2014. – V. 28. – № 1. – P. 81–93.
86. Helmke K.J., Heald R. TPX2 levels modulate meiotic spindle size and architecture in *Xenopus* egg extracts // *J. Cell Biol.* – 2014. – V. 206. – P. 385–393.
87. Henikoff S., Henikoff J.G., Sakai A., Loeb G.B., Ahmad K. Genome-wide profiling of salt fractions maps physical properties of chromatin // *Genome Res.* – 2009. – V. 19. – № 3. – P. 460–469.
88. Henras A K., Soudet J., Gerus M., Lebaron S., Caizergues-Ferrer M., Mouglin A., Henry Y. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – V. 65. – № 15. – P. 2334–2359.
89. Hernandez-Verdun D., Gautier, T. The chromosome periphery during mitosis // *Bioessays.* – 1994. – V. 16. – P. 179–185.
90. Hirano Y., Ishii K., Kumeta M., Furukawa K., Takeyasu K., Horigome T. Proteomic and targeted analytical identification of BXDC1 and EBNA1BP2 as dynamic scaffold proteins in the nucleolus // *Genes Cells.* – 2009. – V 14. – № 2. – P. 155–166.
91. Hofmann J.C., Husedzinovic A., Gruss O.J. The function of spliceosome components in open mitosis // *Nucleus.* – 2010. – V. 1. – P. 447–459.
92. Hur S.-K., Park E.-J., Han J.-E., Kim Y.-A., Kim J.-D., Kang D., Kwon J. Roles of human INO80 chromatin remodeling enzyme in DNA replication and chromosome segregation suppress genome instability // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2010. – V. 67. – P. 2283–2296.
93. Inoue S. Effect of temperature on the birefringence of the mitotic spindle // *Biol. Bull.* – 1952. – V. 103. – № 2. – P. 316–317.
94. Inoue S. Organization and function of the mitotic spindle // *Ann. NY. Acad. Sci.* – 1964. – V. 90. – P. 529.
95. Inoue Y.H., do Carmo Avides M., Shiraki M., Deak P., Yamaguchi M., Nishimoto Y., Matsukage A., Glover D.M. Orbit, a novel microtubule-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster* // *J. Cell Biol.* – 2000. – V. 149. – P. 153–166.
96. Isola J., Helin H., Kallionemi O.-P. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation-associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells // *Histochem. J.* – 1990. – V. 506. – P. 498–506.

97. Jansen R.P., Hurt E.C, Kern H., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M., Lapeyre B., Tollervey D. Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast // *J. Cell Biol.* – 1991. – V. 113. – P. 715–729.
98. Jeffery C.J. Moonlighting proteins // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – V. 24. – P. 8–11.
99. Jiang P.S., Chang J.H., Yung B.Y. Different kinases phosphorylate nucleophosmin/B23 at different sites during G(2) and M phases of the cell cycle // *Cancer Lett.* – 2000. – V. 153. – P. 151–160.
100. Jordan M.A., Thrower D., Wilson L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis // *J. Cell Sci.* – 1992. – V. 102. – P. 401–416.
101. Juwana J.P., Henderikx P., Mischo A., Wadle A., Fadle N., Gerlach K., Arends J.W., Hoogenboom H., Pfreundschuh M., Renner C. EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins // *Int. J. Cancer.* – 1999. – V. 81. – P. 275–284.
102. Kakpakov V.T., Gvozdev V.A., Polukarova L.G., Birstein V.J., Platova T.P. Culture of continuous lines of *Drosophila melanogaster* cells *in vitro*. Growth pattern, karyotype and function of a sex-linked gene. Structure and Genetical Functions of Biopolymers // II Conference Department Radiobiol. Kurchatov Institute of Atomic Energ. – 1969. – V. 1. – P. 61–76.
103. Kalab P., Heald R. The RanGTP gradient – a GPS for the mitotic spindle // *J. Cell Sci.* – 2008. – V. 121. – P. 1577–1586.
104. Kalab P., Pu R.T., Dasso M. The RAN GTPase regulates mitotic spindle assembly // *Curr. Biol.* – 1999. – V. 9. – P. 481–484.
105. Kallio M.J., Mc Cleland M.L., Stukenberg P.T., Gorbsky G.J. Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis // *Curr Biol.* – 2002. – V. 12. – № 11. – P. 900–905.
106. Kapoor T.M., Lampson M.A., Hergert P., Cameron L., Cimini D., Salmon E.D., McEwen B.F., Khodjakov A. Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation // *Science.* – 2006. – V. 311. – P. 388–391.
107. Kardon J.R., Vale R.D. Regulators of the cytoplasmic dynein motor // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – V. 10. – P. 854–865.
108. Karsenti E., Vernos I. The mitotic spindle: a self-made machine // *Science.* – 2001. – V. 294. – P. 543–547.

109. Kashina A.S., Scholey J.M., Leszyk J.D., Saxton W.M. An essential bipolar mitotic motor // *Nature*. – 1996. – V. 384. – P.225.
110. Kharchenko P.V., Alekseyenko A.A., Schwartz Y.B., Minoda A., Riddle N.C., Ernst J., Sabo P.J., Larschan E., Gorchakov A.A., Gu T., Linder-Basso D., Plachetka A., Shanower G., Tolstorukov M.Y., Luquette L.J., Xi R., Jung Y.L., Park R.W., Bishop E.P., Canfield T.K., Sandstrom R., Thurman R.E., MacAlpine D.M., Stamatoyannopoulos J.A., Kellis M., Elgin S.C., Kuroda M.I., Pirrotta V., Karpen G.H., Park P.J. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster* // *Nature*. – 2011. – V. 471. – № 7339. – P. 480–485.
111. Khodjakov A., Copenagle L., Gordon M.B., Compton D.A., Kapoor T.M. Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis // *J. Cell Biol.* – 2003. – V. 160. – P. 671–683.
112. Kim E., Naisbitt S., Hsueh Y.P., Rao A., Rothschild A., Craig A.M., Sheng M. GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules // *J. Cell Biol.* – 1997. – V. 136. – P. 669–678.
113. Kirschner M.W., Mitchison T. Microtubule dynamics // *Nature*. – 1986. – V. 324. – P. 621.
114. Kline-Smith S.L., Walczak C.E. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: re-focusing on microtubule dynamics // *Mol. Cell.* – 2004. – V. 15. – P. 317–327.
115. Koffa M.D., Casanova C.M., Santarella R., Kocher T., Wilm M., Mattaj I.W. HURP is part of a Ran-dependent complex involved in spindle formation // *Curr. Biol.* – 2006. – V. 16. – P. 743–754.
116. Kops G.J., Shah J.V. Connecting up and clearing out: how kinetochore attachment silences the spindle assembly checkpoint // *Chromosoma*. – 2012. – V. 121. – P. 509–525.
117. Korinek W.S., Copeland M.J., Chaudhuri A., Chant J. Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast // *Science*. – 2000. – V. 287. – P. 2257–2259.
118. Kressler D., Hurt E., Bassler J. Driving ribosome assembly // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2010. – V. 1803. – № 6. – P. 673–683.
119. Krüger L.K., Tran P.T. Spindle scaling mechanisms Essays // *Essays Biochem.* – 2020. – V. 64. – № 2. – P. 383–396.

120. Kufer T.A., Sillje H.H., Korner R., Gruss O.J., Meraldi P., Nigg E.A. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle // *J. Cell Biol.* – 2002. – V. 158. – P. 617–623.
121. Kwon M., Scholey J.M. Spindle mechanics and dynamics during mitosis in *Drosophila* // *Trends in cell biology.* – 2004. – V. 14. – № 4. – P. 194–205.
122. Lecland N., Debec A., Delmas A., Moutinho-Pereira S., Malmanche N., Bouissou A., Dupré C., Jourdan A., Raynaud-Messina B., Maiato H., Guichet A. Establishment and mitotic characterization of new *Drosophila* acentriolar cell lines from DSas-4 mutant // *Biol. Open.* – 2013. – V. 2. – № 3. – P. 314–323.
123. Lee H., McManus C.J., Cho D.Y., Eaton M., Renda F., Somma M.P., Cherbas L., May G., Powell S., Zhang D., Zhan L., Resch A., Andrews J., Celniker S.E., Cherbas P., Przytycka T.M., Gatti M., Oliver B., Graveley B., MacAlpine D. DNA copy number evolution in *Drosophila* cell lines // *Genome Biol.* – 2014. – V. 15. – № 8: R70. 10.1186/gb-2014-15-8-r70.
124. Lee L., Tirnauer J.S., Li J., Schuyler S.C., Liu J.Y., Pellman D. Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism // *Science.* – 2000. – V. 287. – P. 2260–2262.
125. Lemos C.L., Sampaio P., Maiato H., Costa M., Omelyanchuk L.V., Liberal V., Sunkel C.E. Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – № 14. – P. 3668–3682.
126. Lin C.M., Ho H.H., Pettit G.R., Hamel E. Antimitotic natural products combretastatin A-4 and combretastatin A-2: studies on the mechanism of their inhibition of the binding of colchicine to tubulin // *Biochemistry.* – 1989. – V. 28. – № 17. – P. 6984–6991.
127. Liu P., Würtz M., Zupa E., Pfeffer S., Schiebel E. Microtubule nucleation: The waltz between γ -tubulin ring complex and associated proteins // *Curr Opin Cell Biol.* – 2021. – V. 68. – P. 124–131.
128. Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. *Molecular Cell Biology*. 6th edition // New York City: W.H. Freeman and Company. – 2008.

129. Lunstrum G.P., Bächinger H.P., Fessler L.I., Duncan K.G., Nelson R.E., Fessler J.H. *Drosophila* basement membrane procollagen IV. I. Protein characterization and distribution // *J. Biol. Chem.* – 1988. – V. 263. – № 34. – P. 18318–18327.
130. Ma N., Tulu U.S., Ferenz N.P., Fagerstrom C., Wilde A., Wadsworth P. Poleward transport of TPX2 in the mammalian mitotic spindle requires dynein, Eg5, and microtubule flux // *Mol. Biol. Cell* – 2010. – V. 21. – P. 979–988.
131. Maiato H., Fairley E.A., Rieder C.L., Swedlow J.R., Sunkel C.E., Earnshaw W.C. Human CLASP1 is an outer kinetochore component that regulates spindle microtubule dynamics // *Cell.* – 2003. – V. 113. – P. 891–904.
132. Maiato H., Hergert P.J., Moutinho-Pereira S., Dong Y., Vandenbeldt K.J., Rieder C.L., McEwen B.F. The ultrastructure of the kinetochore and kinetochore fiber in *Drosophila* somatic cells // *Chromosoma.* – 2006. – V. 115. – P. 469–480.
133. Maiato H., Khodjakov A., Rieder C.L. *Drosophila* CLASP is required for the incorporation of microtubule subunits into fluxing kinetochore fibres // *Nat. Cell Biol.* – 2005. – V. 7. – P. 42–47.
134. Maiato H., Rieder C.L., Khodjakov A. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis // *J. Cell Biol.* – 2004. – V. 167. – P. 831–40.
135. Maiato H., Sampaio P., Lemos C.L., Findlay J., Carmena M., Earnshaw W.C., Sunkel C.E. MAST/Orbit has a role in microtubule-kinetochore attachment and is essential for chromosome alignment and maintenance of spindle bipolarity // *J. Cell Biol.* – 2002. – V. 157. – P. 749–760.
136. Meunier S., Shvedunova M., Van Nguyen N., Avila L., Vernos I., Akhtar A. An epigenetic regulator emerges as microtubule minus-end binding and stabilizing factor in mitosis // *Nat Commun.* – 2015. – V. 6. – P. 7889.
137. Meunier S., Vernos I. K-fiber minus ends are stabilized by a RanGTP-dependent mechanism essential for functional spindle assembly // *Nat Cell Biol.* – 2011. – V. 13. – № 12. – P. 1406–1414.
138. Miller R.K., Cheng S.C., Rose M.D. Bim1p/Yeb1p mediates the Kar9p-dependent cortical attachment of cytoplasmic microtubules // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – V. 11. – P. 2949–2959.

139. Milligan J.F., Groebe D.R., Witherell G.W., Uhlenbeck O.C. Oligo ribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates // *Nucleic. Acids. Res.* – 1987. – V. 15. – № 21. – P. 8783–8798.
140. Mimori-Kiyosue Y., Grigoriev I., Lansbergen G., Sasaki H., Matsui C., Severin F., Galjart N., Grosveld F., Vorobjev I., Tsukita S., Akhmanova A. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex // *J. Cell Biol.* – 2005. – V. 168. – P. 141–153.
141. Mimori-Kiyosue Y., Shiina N., Tsukita S. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules // *Curr. Biol.* – 2000b. – V. 10. – P. 865–868.
142. Mishra R.K., Chakraborty P., Arnaoutov A., Fontoura B.M., Dasso M. The Nup107-160 complex and gamma-TuRC regulate microtubule polymerization at kinetochores // *Nat Cell Biol.* – 2010. – V. 12. – № 2. – P. 164–169.
143. Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth // *Nature.* – 1984. – V. 312. – P. 237–242.
144. Mitchison T.J. Mechanism and function of poleward flux in *Xenopus* extract meiotic spindles // *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* – 2005. – V. 360. – P. 623–629.
145. Morgan D. The Cell Cycle: Principals of Control // *Yale J. Biol. Med.* – 2007. – V. 80. – № 3. – P. 142–143.
146. Morita D., Miyoshi K., Matsui Y., Toh-E A., Shinkawa H., Miyakawa T., Mizuta K.J. Rpf2p, an evolutionarily conserved protein, interacts with ribosomal protein L11 and is essential for the processing of 27 SB Pre-rRNA to 25 S rRNA and the 60S ribosomal subunit assembly in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 32. – P. 28780–28786.
147. Morrison E.E., Wardleworth B.N., Askham J.M., Markham A.F., Meredith D.M. EB1, a protein which interacts with the APC tumor suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle // *Oncogene.* – 1998. – V. 17. – P. 3471–3477.
148. Mosna G., Dolfini S. Morphological and chromosomal characterization of three new continuous cell lines of *Drosophila melanogaster* // *Chromosoma.* – 1972. – V. 38. – P. 1–9.

149. Mottier-Pavie V., Cenci G., Verni F., Gatti M., Bonaccorsi S. Phenotypic analysis of *misato* function reveals roles of noncentrosomal microtubules in *Drosophila* spindle formation // *J Cell Sci.* – 2011. – V. 124. – № 5. – P. 706–717.
150. Moutinho-Pereira S., Stuurman N., Afonso O., Hornsveld M., Aguiar P., Goshima G., Vale R.D., Maiato H. Genes involved in centrosome-independent mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. – P. 19808–19813.
151. Muhua L., Adames N.R., Murphy M.D., Shields C.R., Cooper J.A. A cytokinesis checkpoint requiring the yeast homologue of an APC- binding protein // *Nature.* – 1998. – V. 393. – P. 487–491.
152. Musacchio A. Spindle assembly checkpoint: the third decade // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2011. – V. 366. – P. 3595–3604.
153. Musacchio A., Salmon E.D. The spindle-assembly checkpoint in space and time // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – V. 8. – P. 379–393.
154. Nakagawa H., Koyama K., Murata Y., Morito M., Akiyama T., Nakamura Y. EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue // *Oncogene.* – 2000. – V. 19. – P. 210–216.
155. Nelson D.M., Ye X., Hall C., Santos H., Ma T., Kao G.D., Yen T.J., Harper J.W., Adams P.D. Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – V. 22. – № 21. – P. 7459–7472.
156. Neumayer G., Belzil C., Gruss O.J., Nguyen M.D. Tpx2: of spindle assembly, DNA damage response, and cancer // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – V. 71. – № 16. – P. 3027–3047.
157. Niki Y., Yamaguchi T., Mahowald A.P. Establishment of stable cell lines of *Drosophila* germ-line stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – V. 103. – P. 16525–16330.
158. O’Connell C.B., Khodjakov A., McEwen B.F. Kinetochore flexibility: creating a dynamic chromosome-spindle interface // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2012. – V. 24. – P. 40–47.
159. O’Connell C.B., Khodjakov A.L. Cooperative mechanisms of mitotic spindle formation // *J. Cell Sci.* – 2007. – V. 120. – P. 1717–1722.
160. Olmsted J.B., Borisy G.G. Characterization of microtubule assembly in porcine brain extracts by viscometry // *Biochemistry.* – 1973. – V. 12. – № 21. – P. 4282–4289.

161. Omelyanchuk L.V., Volkova E.I., Fedorova S.A. Characterization of insertion mutations leading to mitosis abnormalities in *Drosophila melanogaster* by means of the reporter gene-containing transposon // *Genetika*. – 1997. – V. 33. – P. 1494–1501.
162. Ozlu N., Srayko M., Kinoshita K., Habermann B., O'toole E.T., Müller-Reichert T., Schmalz N., Desai A., Hyman A.A. An essential function of the *C. elegans* ortholog of TPX2 is to localize activated aurora A kinase to mitotic spindles // *Dev. Cell*. – 2005. – V. 9. – P. 237–248.
163. Palozola K.C., Donahue G., Liu H., Grant G.R., Becker J.S., Coté A., Yu H., Raj A., Zaret K.S. Mitotic transcription and waves of gene reactivation during mitotic exit // *Science*. – 2017. – V. 358. – P. 119–122.
164. Palumbo V., Pellacani C., Heesom K.J., Rogala K.B., Deane C.M., Mottier-Pavie V., Gatti M., Bonaccorsi S., Wakefield J.G. Misato Controls Mitotic Microtubule Generation by Stabilizing the TCP-1 Tubulin Chaperone Complex [corrected] // *Curr Biol*. – 2015. – V. 25. – № 13. – P. 1777–1783.
165. Paredes S., Maggert K.A. Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – V. 106. – P. 17829–17834.
166. Park E.-J., Hur S.-K., Lee H.-S., Lee S.-A., Kwon J. The human Ino80 binds to microtubule via the E-hook of tubulin: Implications for the role in spindle assembly // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – V. 416. – P. 416–420.
167. Pasqualone D., Huffaker T.C. STU1, a suppressor of a beta-tubulin mutation, encodes a novel and essential component of the yeast mitotic spindle // *J. Cell Biol.* – 1994. – V. 127. – P. 1973–1984.
168. Pavlova G.A., Galimova J.A., Popova J.V., Munzarova A.F., Razuvaeva A.V., Alekseeva A.L., Berkaeva M.B., Pindyurin A.V., Somma M.P., Gatti M., Renda F. Factors governing the pattern of spindle microtubule regrowth after tubulin depolymerization // *Tsitologiya*. – 2016. – V. 58. – № 4. – P. 299–303.
169. Pederson T. The plurifunctional nucleolus // *Nucleic. Acids. Res.* – 1998. – V. 26. – P. 3871–3876.
170. Peng J.C., Karpen G.H. H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability // *Nat. Cell Biol.* – 2007. – V. 9. – P. 25–35.
171. Pereira A.L., Pereira A.J., Maia A.R., Drabek K., Sayas C.L., Hergert P.J., Lince-Faria M., Matos I., Duque C., Stepanova T., Rieder C.L., Earnshaw W.C.,

- Galjart N., Maiato H. Mammalian CLASP1 and CLASP2 cooperate to ensure mitotic fidelity by regulating spindle and kinetochore function // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – V. 17. – P. 4526–4542.
172. Perez de Castro I., Malumbres M. Mitotic stress and chromosomal instability in cancer: the case for *tpx2* // *Genes Cancer* – 2012. – V. 3. – № 11–12. – P. 721–730.
173. Pernice B. Sulla cariocinesi delle cellule epiteliali e dell'endotelio dei vasi della mucosa dello stomaco e dell'intestino, nello studio della gastroenterite sperimentale (nell'avvelenamento per colchico) // *Sicilia med.* – 1889. – V. 1. – P. 265–279.
174. Perrin L., Demakova O., Fanti L., Kallenbach S., Saingery S., Mal'ceva N.I., Pimpinelli S., Zhimulev I., Pradel J. Dynamics of the sub-nuclear distribution of Modulo and the regulation of position-effect variegation by nucleolus in *Drosophila* // *J. Cell Sci.* – 1998. – V. 111. – № 18. – P. 2753–2761.
175. Petry S. Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly // *Annu Rev Biochem.* – 2016. – V. 85. – P. 659–683.
176. Pettit G.R., Singh S.B., Boyd M.R., Hamel E., Pettit R.K., Schmidt J.M., Hogan F. Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5, and A-6(1a) // *J. Med. Chem.* – 1995. – V. 38. – № 10. – P. 1666–1672.
177. Pinyol R., Scrofani J., Vernos I. The role of NEDD1 phosphorylation by Aurora A in chromosomal microtubule nucleation and spindle function // *Curr. Biol.* – 2013. – V. 23. – P. 143–149.
178. Popova J.V., Pavlova G.A., Razuvaeva A.V., Yarinich L.A., Andreyeva E.N., Anders A.F., Galimova Y.A., Renda F., Somma M.P., Pindyurin A.V., Gatti M. Genetic control of kinetochore-driven microtubule growth in *Drosophila* mitosis // *Cells.* – 2022. – V. 11. – № 14. – P. 2127.
179. Prosser S.L., Pelletier L. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2017. V. 18. – № 3. – P. 187–201.
180. Ravelli R.B., Gigant B., Curmi P.A., Jourdain I., Lachkar S., Sobel A., Knossow M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain // *Nature.* – 2004. – V. 428. – № 6979. – P. 198–202.
181. Ray K., Bhattacharyya B., Biswas B.B. Anion-induced increases in the affinity of colcemid binding to tubulin // *Eur. J. Biochem.* – 1984. – V. 142. – № 3. – P. 577–581.

182. Renner C., Pfitzenmeier J.P., Gerlach K., Held G., Ohnesorge S., Sahin U., Bauer S., Pfreundschuh M. RP1, a new member of the adenomatous polyposis coli-binding EB1-like gene family, is differentially expressed in activated T cells // *J. Immunol.* – 1997. – V. 159. – P. 1276–1283.
183. Riddle N.C., Jung Y.L., Gu T., Alekseyenko A.A., Asker D., Gui H., Kharchenko P.V., Minoda A., Plachetka A., Schwartz Y.B., Tolstorukov M.Y., Kuroda M.I., Pirrotta V., Karpen G.H., Park P.J., Elgin S.C.R. Enrichment of HP1a on *Drosophila* chromosome 4 genes creates an alternate chromatin structure critical for regulation in this heterochromatic domain // *PLoS Genet.* – 2012. – V. 8: e1002954. 10.1371/journal.pgen.1002954.
184. Riddle N.C., Minoda A., Kharchenko P.V., Alekseyenko A.A., Schwartz Y.B., Tolstorukov M.Y., Gorchakov A.A., Jaffe J.D., Kennedy C., Linder-Basso D., Peach S.E., Shanower G., Zheng H., Kuroda M.I., Pirrotta V., Park P.J., Elgin S.C., Karpen G.H. Plasticity in patterns of histone modifications and chromosomal proteins in *Drosophila* heterochromatin // *Genome Research.* – 2011. – V. 21. – № 1. – P. 147–163.
185. Rogers G.C., Rogers S.L., Schwimmer T.A., Ems-McClung S.C., Walczak C.E., Vale R.D., Scholey J.M., Sharp D.J. Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase // *Nature.* – 2004. – V. 427. – P. 364–370.
186. Rogers S.L., Rogers G.C., Sharp D.J., Vale R.D. *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle // *J. Cell Biol.* – 2002. – V. 158. – P. 873–884.
187. Rosby R., Cui Z., Rogers E., de Livron M.A., Robinson V.L., DiMario P.J. Knockdown of the *Drosophila* GTPase nucleostemin 1 impairs large ribosomal subunit biogenesis, cell growth, and midgut precursor cell maintenance // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – V. 20. – № 20. – P. 4424–4434.
188. Saito K., Inagaki S., Mituyama T., Kawamura Y., Ono Y., Sakota E., Kotani H., Asai K., Siomi H., Siomi M.C. A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila* // *Nature.* – 2009. – V. 461. – № 7268. – P. 1296–1299.
189. Sanchez-Pulido L., Perez L., Kuhn S., Vernos I., Andrade-Navarro M.A. The C-terminal domain of TPX2 is made of alpha-helical tandem repeats // *BMC Str. Biol.* – 2016. – V. 16. – P. 17.

190. Santavy F., Reichstein T. Isolierung neuer Stoffe aus den Samen der Herbstzeitlose *Colchicum autumnale* L. Substanzen der Herbstzeitlose und ihre Derivate // *Helvetica Chimica Acta*. – 1950. – V. 33. – № 6. – P. 1606–1627.
191. Sazer S., Lynch M., Needleman D. Deciphering the evolutionary history of open and closed mitosis // *Current Biology*. – 2014. – V. 24. – № 22. – P. R1099–R1103.
192. Scherl A., Couté Y., Déon C., Callé A., Kindbeiter K., Sanchez J.C., Greco A., Hochstrasser D., Diaz J.J. Functional proteomic analysis of human nucleolus // *Mol. Biol. Cell*. – 2002. – V. 13. – № 11. – P. 4100–4109.
193. Schiebel E. Gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2000. – V. 12. – P. 113–118.
194. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nature Methods*. – 2012. – V. 9. – № 7. – P. 671–675.
195. Schneider I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster* // *J Embryol. Exp. Morphol.* – 1972. – V. 27. – P. 353–365.
196. Schroer T.A. Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2001. – V. 13. – P. 92–96.
197. Schuyler S., Pellman D. Microtubule “plus-end-tracking proteins”: the end is just the beginning // *Cell*. – 2001a. – V. 105. – P. 421–424.
198. Schwartz K., Richards K., Botstein D. *Bim1* encodes a microtubule-binding protein in yeast // *Mol. Biol. Cell*. – 1997. – V. 8. – P. 2677–2691.
199. Schwartz Y.B., Linder-Basso D., Kharchenko P.V., Tolstorukov M.Y., Kim M., Li H.B., Gorchakov A.A., Minoda A., Shanower G., Alekseyenko A.A., Riddle N.C., Jung Y.L., Gu T., Plachetka A., Elgin S.C., Kuroda M.I., Park P.J., Savitsky M., Karpen G.H., Pirrotta V. Nature and function of insulator protein binding sites in the *Drosophila* genome // *Genome Res*. – 2012. – V. 22. – № 11. – P. 2188–2198.
200. Scrofani J., Sardon T., Meunier S., Vernos I. Microtubule nucleation in mitosis by a RanGTP-dependent protein complex // *Curr. Biol.* – 2015. – V. 25. – P. 131–140.
201. Sellitto C., Kuriyama R. Distribution of pericentriolar material in multipolar spindles induced by colcemid treatment in Chinese hamster ovary cells // *J. Cell Sci.* – 1988. – V. 89. – P. 57–65.

202. Sharp D.J., Brown H.M., Kwon M., Rogers G.C., Holland G., Scholey J.M. Functional coordination of three mitotic motors in *Drosophila* embryos // Mol. Biol. Cell – 2000. – V. 11. – P. 241–253.
203. Shaw P., Brown J. Nucleoli: composition, function, and dynamics // Plant Physiol. – 2012. – V. 158. – P. 44–51.
204. Sheng M., Kim E. The Shank family of scaffold proteins // J. Cell Sci. – 2000. – V. 113. – P. 1851–1856.
205. Sillje H.H., Nagel S., Korner R., Nigg E.A. HURP is a Ran-importin beta-regulated protein that stabilizes kinetochore microtubules in the vicinity of chromosomes // Curr. Biol. – 2006. – V. 16. – P. 731–742.
206. Simcox A., Mitra S., Truesdell S., Paul L., Chen T., Butchar J.P., Justiniano S. Efficient genetic method for establishing *Drosophila* cell lines unlocks the potential to create lines of specific genotypes // PLoS Genetics. – 2008. – V. 4 – № 8: e1000142. 10.1371/journal.pgen.1000142.
207. Somma M.P., Andreyeva E.N., Pavlova G.A., Pellacani C., Bucciarelli E., Popova J.V., Bonaccorsi S., Pindyurin A.V., Gatti M. Moonlighting in mitosis: analysis of the mitotic functions of transcription and splicing factors // Cells. – 2020. – V. 9. – № 6. – P. 1554–1581.
208. Somma M.P., Ceprani F., Bucciarelli E., Naim V., de Arcangelis V., Piergentili R., Palena A., Ciapponi L., Giansanti M. G., Pellacani C., Petrucci R., Cenci G., Verni F., Fasulo B., Goldberg M.L., di Cunto F., Gatti M. Identification of *Drosophila* mitotic genes by combining co-expression analysis and RNA interference // PLoS Genetics. – 2008. – V. 4. – № 7: e1000126. 10.1371/journal.pgen.1000126.
209. Sousa A., Reis R., Sampaio P., Sunkel C.E. The *Drosophila* CLASP homologue, Mast/Orbit regulates the dynamic behavior of interphase microtubules by promoting the pause state // Cell Motil. Cytoskeleton. – 2007. – V. 64. – P. 605–620.
210. Strunov A., Boldyreva L.V., Pavlova G.A., Pindyurin A.V., Gatti M., Kiseleva E. A simple and effective method for ultrastructural analysis of mitosis in *Drosophila* S2 cells // MethodsX. – 2016. – V. 3. – P. 551–559.
211. Su L.K., Burrell M., Hill D.E., Gyuris J., Brent R., Wiltshire R., Trent J., Vogelstein B., Kinzler K.W. APC binds to the novel protein EB1 // Cancer Res. – 1995. – V. 55. – P. 2972–2977.

212. Su L.K., Qi Y. Characterization of human MAPRE genes and their proteins // Genomics. – 2001. – V. 71. – P. 142–149.
213. Tafforeau L., Zorbas C., Langhendries J-L., Mullineux S-M., Stamatopoulou V., Mullier R., Wacheul L., Lafontaine D.L.J. The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors // Mol. Cell – 2013. – V. 51. – № 4. – P. 539–551.
214. Takeuchi K., Fukagawa T. Molecular architecture of vertebrate kinetochores // Exp. Cell Res. – 2012. – V. 318. – P. 1367–1374.
215. Tanenbaum M.E., Macurek L., Janssen A., Geers E.F., Alvarez-Fernandez M., Medema R.H. Kif15 cooperates with eg5 to promote bipolar spindle assembly // Curr. Biol. – 2009. – V. 19. – P. 1703–1711.
216. Taylor E.W. The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and the binding of H3-colchicine // J. Cell Biol. – 1965. – V. 25. – P. 145–160.
217. Tepass U., Tanentzapf G., Ward R., Fehon R. Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila* // Annu. Rev. Genet. – 2001. – V. 35. – P. 747–784.
218. Tirnauer J.S., Bierer B.E. EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability // J. Cell Biol. – 2000. – V. 149. – P. 761–766.
219. Tirnauer J.S., Grego S., Salmon E.D., Mitchison T.J. EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules // Mol. Biol. Cell. – 2002a. – V. 13. – P. 3614–3626.
220. Tirnauer J.S., O'Toole E., Berrueta L., Bierer B.E., Pellman D. Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules // J. Cell Biol. – 1999. – V. 145. – P. 993–1007.
221. Tollervey D., Kiss T. Function and synthesis of small nucleolar RNAs // Curr. Opin. Cell Biol. – 1997. – V. 9. – P. 337–342.
222. Torosantucci L., De Luca M., Guarguaglini G., Lavia P., Degraffi F. Localized RanGTP accumulation promotes microtubule nucleation at kinetochores in somatic mammalian cells // Mol. Biol. Cell. – 2008. – V. 19. – P. 1873–1882.
223. Trinkle-Mulcahy L. Nucleolus // Nuclear Architecture and Dynamics. – 2018. – P. 257–282.

224. Tsai M.Y., Wiese C., Cao K., Martin O., Donovan P., Ruderman J., Prigent C., Zheng Y. A Ran signaling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly // *Nat. Cell Biol.* – 2003. – V. 5. – P. 242–248.
225. Tsai M.Y., Zheng Y. Aurora A kinase-coated beads function as microtubule-organizing centers and enhance RanGTP-induced spindle assembly // *Curr. Biol.* – 2005. – V. 15. – P. 2156–2163.
226. Tsou A.P., Yang C.W., Huang C.Y., Yu R.C., Lee Y.C., Chang C.W., Chen B.R., Chung Y.F., Fann M.J., Chi C.W., Chiu J.H., Chou C.K. Identification of a novel cell cycle regulated gene, HURP, overexpressed in human hepatocellular carcinoma // *Oncogene.* – 2003. – V. 22. – P. 298–307.
227. Tulu U.S., Fagerstrom C., Ferenz N.P., Wadsworth P. Molecular requirements for kinetochore-associated microtubule formation in mammalian cells // *Curr. Biol.* – 2006. – V. 16. – P. 536–541.
228. Ui K., Nishihara S., Sakuma M., Togashi S., Ueda R., Miyata Y., Miyake T. Newly established cell lines from *Drosophila* larval CNS express neural specific characteristics // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 1994. – V. 30A. – № 4. – P. 209–216.
229. Ui K., Ueda R., Miyake T. Cell lines from imaginal discs of *Drosophila melanogaster* // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 1987. – V. 23. – P. 707–711.
230. Van Hooser A.A., Yuh P., Heald R. The perichromosomal layer // *Chromosoma.* – 2005. – V. 114. – № 6. – P. 377–388.
231. Verdaasdonk J.S., Bloom K. Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – V. 12. – P. 320–332.
232. Wadsworth P, Khodjakov A. E pluribus unum: towards a universal mechanism for spindle assembly // *Trends Cell Biol.* – 2004. – V. 14, – P. 413–419.
233. Walczak C.E., Cai S., Khodjakov A. Mechanisms of chromosome behavior during mitosis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2010. – V. 11. – P. 91–102.
234. Wang Y., DiMario P. Loss of *Drosophila* nucleostemin 2 (NS2) blocks nucleolar release of the 60S subunit leading to ribosome stress // *Chromosome.* – 2017. – V. 126. – № 3. – P. 375–388.
235. Welburn J.P., Grishchuk E.L., Backer C.B., Wilson-Kubalek E.M., Yates J.R. 3rd, Cheeseman I.M. The human kinetochore Ska1 complex facilitates microtubule depolymerization-coupled motility // *Dev. Cell.* – 2009. – V. 16. – P. 374–385.

236. Wen J., Mohammed J., Bortolamiol-Becet D., Tsai H., Robine N., Westholm J.O., Ladewig E., Dai Q., Okamura K., Flynt A.S., Zhang D., Andrews J., Cherbas L., Kaufman T.C., Cherbas P., Siepel A., Lai E.C. Diversity of miRNAs, siRNAs and piRNAs across 25 *Drosophila* cell lines // *Genome Research*. – 2014. – V. 24. – № 7. – P. 1236–1250.
237. Widlund P.O., Stear J.H., Pozniakovsky A., Zanic M., Reber S., Brouhard G.J., Hyman A.A., Howard J. XMAP215 polymerase activity is built by combining multiple tubulin-binding TOG domains and a basic lattice-binding region // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – V. 108. – P. 2741–2746.
238. Wilde A., Zheng Y. Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran // *Science*. – 1999. – V. 284. – P. 1359–1362.
239. Wittmann T., Boleti H., Antony C., Karsenti E., Vernos I. Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein // *J. Cell Biol.* – 1998. – V. 143. – P. 673–685
240. Wittmann T., Wilm M., Karsenti E., Vernos I. TPX2, A novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization // *J. Cell Biol.* – 2000. – V. 149. – P. 1405–1418.
241. Wong J., Fang G. HURP controls spindle dynamics to promote proper interkinetochore tension and efficient kinetochore capture // *J. Cell Biol.* – 2006. – V. 173. – P. 879–891.
242. Wood K.W., Sakowicz R., Goldstein L.S., Cleveland D.W. CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment // *Cell*. – 1997. – V. 91. – P. 357–366.
243. Wu C., Singaram V., McKim K.S. *mei-38* is required for chromosome segregation during meiosis in *Drosophila* females. // *Genetics*. – 2008. – V. 180. – P. 61–72.
244. Wuhr M., Tan E.S., Parker S.K., Detrich H.W. 3rd, Mitchison T.J. A model for cleavage plane determination in early amphibian and fish embryos // *Curr. Biol.* – 2010. – V. 20. – № 22. – P. 2040–2045.
245. Yang C.P., Fan S.S. *Drosophila mars* is required for organizing kinetochore microtubules during mitosis // *Exp. Cell Res.* – 2008. – V. 314. – № 17. – P. 3209–3220.
246. Yasuda Y., Maul G.G. A nucleolar auto-antigen is part of a major chromosomal surface component // *Chromosoma*. – 1990. – V. 99. – P.152–160.

247. Yin H., Pruyne D., Huffaker T.C., Bretscher A. Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast // *Nature*. – 2000. – V. 406. – P. 1013–1015.
248. Yokoyama H., Nakos K., Santarella-Mellwig R., Rybina S., Krijgsveld J., Koffa M., Mattaj I. CHD4 is a RanGTP-dependent MAP that stabilizes microtubules and regulates bipolar spindle formation // *Curr. Biol.* – 2013. – V. 23. – P. 2443–2451.
249. Yokoyama H., Rybina S., Santarella-Mellwig R., Mattaj I., Karsenti E. ISWI is a RanGTP-dependent MAP required for chromosome segregation // *J. Cell Biol.* – 2009. – V. 187. – P. 813–829.
250. Yu C.T., Hsu J.M., Lee Y.C., Tsou A.P., Chou C.K., Huang C.Y. Phosphorylation and stabilization of HURP by Aurora-A: implication of HURP as a transforming target of Aurora-A // *Mol. Cell Biol.* – 2005. – V. 25. – P. 5789–5800.
251. Zhang G, Breuer M., Förster A., Egger-Adam D., Wodarz A. Mars, a *Drosophila* protein related to vertebrate HURP, is required for the attachment of centrosomes to the mitotic spindle during syncytial nuclear divisions // *J. Cell Sci.* – 2009. – V. 122. – № 4. – P. 535–545.
252. Zhang J., Harnpicharnchai P., Jakovljevic J., Tang L., Guo Y., Oeffinger M., Rout M.P., Hiley S.L., Hughes T., Woolford J.L. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes // *Genes Dev.* – 2007. – V. 21. – P. 2580–2592.