

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)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в лаборатории клеточного деления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Андреева Евгения Николаевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточного деления, Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Бураков Антон Владимирович**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва

Фёдорова Светлана Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая Сектором генетики клеточного цикла, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», г. Новосибирск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, г. Москва

Защита состоится: «___» _____ 20__ г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 (Д 003.011.01) на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383) 363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.icgbio.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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. Правильную сегрегацию хромосом как во время митоза, так и во время мейоза обеспечивает веретено деления (ВД) – высокодинамичная клеточная структура, состоящая 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 -тубулин (γ -TuRC; γ -tubulin ring complex), который встроен в centrosомы, обогащен вблизи кинетохор и связан с МТ за счет взаимодействия с белковым комплексом augmin. Исследования, проведенные на культивируемых клетках млекопитающих и 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, рост МТ от centrosом и кинетохоров происходит почти одновременно. Для решения этих проблем используются несколько подходов, позволяющих замедлить скорость данного процесса, физически разделить повторный рост МТ от centrosом и от хромосом и/или кинетохоров либо визуализировать их по отдельности. Первый подход – прижизненное изучение формирования кинетохорных МТ (к-волокон) в centrosом-содержащих клетках, экспрессирующих GFP-меченый тубулин. Вторым методом является использование клеточных моделей, лишенных функциональных centrosом, таких как цитоплазматические экстракты зрелых ооцитов *Xenopus laevis*, или клеток, дефектных по наиболее важным centrosомным белкам, необходимым для формирования МТ. Третий способ заключается в анализе повторного формирования ВД после деполимеризации МТ, вызванной обработкой клеток митостатиками (колцемидом, нокодазолом и т. д.) либо холодной обработкой.

В данной 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 и 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.

Цель 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 дрозофилы.
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 дрозофилы.

Научная новизна и практическая ценность. 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 дрозофилы. 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 дрозофилы.

Положения, выносимые на защиту.

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. Материалы диссертации 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.

Вклад автора. Автором самостоятельно выполнены следующие этапы настоящей работы: молекулярно-биологические методы (синтез дцРНК, специфичных к исследуемым генам; количественная ПЦР в режиме реального времени); методы работы с клеточными культурами (РНК-и; индукция трансгенных линий клеток; обработка клеток низкими температурами либо коллемеидом); цитологические методы (приготовление цитологических препаратов с последующим непрямим иммуноокрашиванием, флуоресцентная либо конфокальная микроскопия). 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 диссертации. 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.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в российских и зарубежных рецензируемых журналах, все из списка ВАК, и имеется 9 публикации в виде тезисов международных конференций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает пять разделов и заключение. Подробно описана информация о формировании и регуляции длины митотического ВД, динамике МТ, структуре и функции кинетохоров. Приведены имеющиеся на момент выполнения данной работы сведения про исследуемые белки Eb1, Mars (или D-HURP), Non3, Mei-38 (или D-TPX2) и Mast (также известный как Orbit, Chb или CLASP). В обзоре литературы описаны различные способы деполимеризации МТ (обработка различными деполимеризирующими веществами либо воздействие низких температур). Дано описание ряда культивируемых клеточных линий дрозофилы, в том числе полная характеристика линии S2.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для исследования использованы клеточные линии S2 *D. melanogaster* дикого типа (любезно предоставленные Маурицио Гатти, университет La Sapienza, Рим, Италия) и трансгенные линии S2 дрозофилы, экспрессирующие гибридный белок mCherry- α -тубулин либо mScarlet- α -тубулин в сочетании с исследуемыми белками, слитыми с флуоресцентным белком eGFP (получены Яринич Л.А., сотрудником ЛКД ИМКБ СО РАН). В работе использованы различные молекулярно-биологические и биохимические методы, методы работы с клеточными

культурами, цитологические методы, прижизненная конфокальная микроскопия, статистическая обработка данных в программной среде R.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для понимания механизмов, лежащих в основе кинетохор-зависимого формирования МТ, в настоящем исследовании 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 (Bucciarelli et al., 2009). Метод деполимеризации ВД был применен по причине того, что в клетках формирование МТ от центросом и кинетохоров происходит почти одновременно и очень быстро, и соответственно практически невозможно исследовать рост 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 – непрямое иммуоокрашивание антителами к центросомальному белку DSpd2 и компоненту микротрубочек белку α -тубулину.

Колцемидная обработка клеток S2 *D. melanogaster*

В первую очередь были проведены эксперименты по подбору условий деполимеризации МТ с помощью колцемидной обработки (концентрация и время воздействия на клетки). Двух часов оказалось недостаточно для полной деполимеризации МТ колцемидом, а при сравнении результатов обработки клеток на протяжении 3 или 4 часов не было обнаружено существенной разницы. При подборе концентрации было показано, что через 3 часа обработки клеток колцемидом с концентрацией 3, 4 или 5 мкг/мл доля клеток с деполимеризацией МТ составила 80%, 95% и 96%, соответственно. Поэтому в дальнейшей работе использовали колцемид с конечной концентрацией 4 мкг/мл и обработка клеток на протяжении 3 часов. Вдобавок был проанализирован ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров на различных временных точках после отмывки клеток от колцемиды (15, 20, 30, 45, 60 и 75 мин). Точка 0 мин использовалась для оценки эффективности деполимеризации МТ колцемидом. При подсчете доли клеток с ПРМТ не было показано существенной разницы между точками 15 и 20 мин после отмывки клеток от колцемиды, а также между 45 и 60 мин, в итоге точки 15 и 60 мин в дальнейших экспериментах не использовались.

Показано, что в нулевой момент времени ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров отсутствует, тубулин равномерно распределен в цитоплазме (Рисунок 1). Через 20–30 мин после удаления колцемиды в контрольных клетках возобновление роста МТ происходит только от хромосом и/или кинетохоров (в 28,3% клеток через 20 мин и в 77% клеток через 30 мин), при этом ПРМТ вокруг центросом отсутствует. Через 45 мин после удаления колцемиды 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 (в 72% клеток), в остальных клетках (в 28% случаев) – сформирован как минимум один полюс ВД, второй начинает формироваться (Рисунок 1). Примечательно, что почти не наблюдалось явного возобновления роста

МТ от centrosom (только в 5% клеток); в большинстве клеток были обнаружены ВД с полюсными МТ, не связанными с одной или с обеими centrosomaми (Рисунок 1, «75 мин»). Таким образом установлено, что колцемидная обработка нарушает способность клеток S2 дрозофилы формировать МТ от centrosom, но не от кинетохоров. Полученные данные хорошо согласуются с исследованиями ПРМТ на клетках млекопитающих (Tulu et al., 2006; Torosantucci et al., 2008).

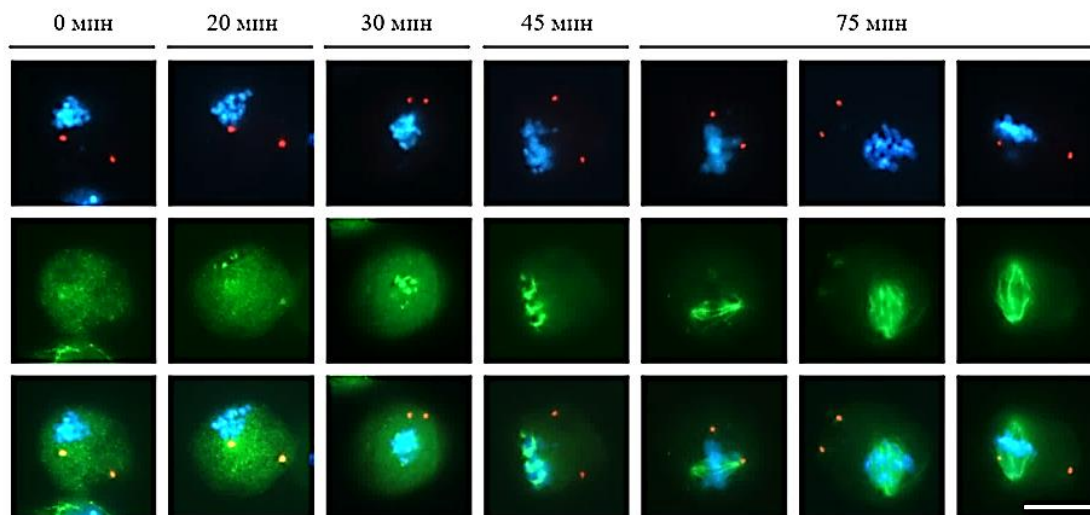


Рисунок 1. Повторный рост митотических микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров после колцемидной обработки в клетках S2 дрозофилы, зафиксированных через 0, 20, 30, 45 или 75 мин после отмывки от колцемиды. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosom DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Холодовая обработка 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. Поэтому 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, показано, что необходимое время инкубации клеток на низкой температуре составляет 3 часа. При более коротких инкубациях доля клеток с полной деполимеризацией МТ составляла около 50–60%.

Исследование промета- и метафазных клеток через 30 сек после возвращения на 22°C (температура подобрана экспериментально; использование стандартной температуры культивирования клеток S2 дрозофилы (25°C) приводит к более быстрому ПРМТ) показало, что характер ПРМТ зависит от температуры деполимеризации (0, -1 или -2°C) (Рисунок 2). Доля клеток с полностью деполимеризованными МТ 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 centrosomaх полюсные МТ (21% случаев). Использование температуры -1°C для деполимеризации МТ приводит к увеличению доли клеток с ПРМТ только от centrosom (в 50% клеток). Однако в случае понижения температуры деполимеризации до -2°C наблюдается сильное изменение характера

ПРМТ – 70% клеток демонстрировали инициирование ПРМТ только от centrosom (Рисунок 2). 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 centrosom значительно ниже, чем при использовании температуры -1°C или -2°C.

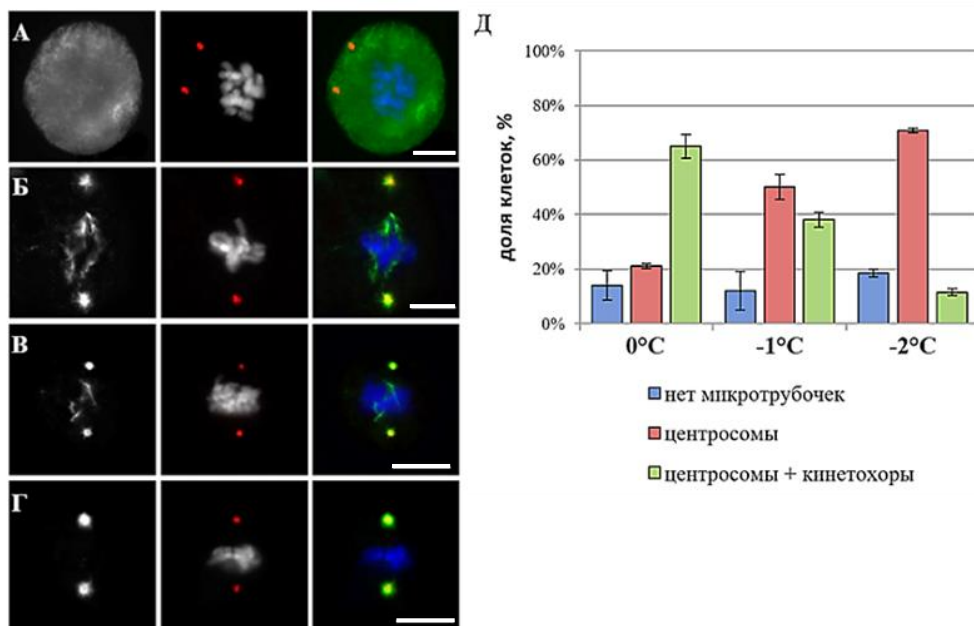


Рисунок 2. Повторный рост микротрубочек после холодной обработки клеток S2 дрозофилы. **А.** Клетка с деполимеризованными микротрубочками (временная точка 0 сек). **Б-Г.** Повторный рост микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров и centrosom после обработки клеток холодом (временная точка 30 сек после 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 centrosom DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (серый/зеленый цвет), 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 centrosom («centrosom») либо как от centrosom, так и от хромосом и/или кинетохоров («centrosom + кинетохоры»), с отсутствием повторного роста микротрубочек («нет микротрубочек»). Указаны 95% доверительные интервалы для медиан.

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 низкой температурой (0°C). В нулевой момент времени наблюдается практически полная деполимеризация МТ, белок тубулин равномерно распределяется в цитоплазме (Рисунок 3). После возвращения клеток на 22°C через 20–30 сек наблюдается ПРМТ в виде коротких пучков, растущих от хромосом и/или кинетохоров, рост МТ от centrosom отсутствует либо пучки МТ очень короткие, выглядят как отдельные точки и/или короткие пучки МТ. Через 40 сек ПРМТ наблюдается уже и от centrosom. После 1–3 мин уже сложно определить, откуда берет начало тот или иной пучок МТ (Рисунок 3). После 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 centrosom МТ становятся слишком большими и очень часто перекрывают таковые от хромосом и/или кинетохоров, в дальнейшем для изучения процесса кинетохор-зависимого ПРМТ, использовалась только временная точка 30 сек.

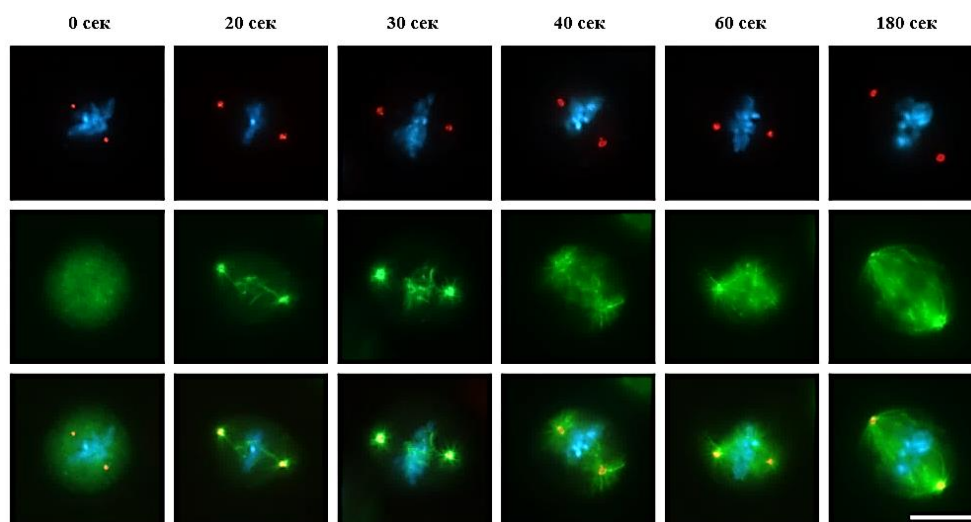


Рисунок 3. Повторный рост митотических микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров после холодной обработки в клетках S2 дрозофилы, зафиксированных через 0, 20, 30, 40, 60 или 180 сек после возвращения клеток на 22°C. Непрямым иммуноокрашиванием антителами детектировали белок centrosом DSpd2 (красный цвет), компонент микротрубочек белок α -тубулин (зеленый цвет), ДНК-специфическим красителем DAPI выявляли хромосомы (синий цвет) (флуоресцентная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

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

Перед изучением роли исследуемых белков в кинетохор-зависимом формировании МТ была отработана процедура снижения уровня транскриптов генов *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* и *mast* с помощью метода РНК-и в клетках S2 дрозофилы. Для этого были экспериментально определены оптимальные параметры процедуры РНК-и (концентрация и количество доз дцРНК, продолжительность воздействия на клетки), позволяющие максимально снизить количество транскриптов каждого из исследуемых генов при сохранении жизнеспособности клеток и их способности к делению. Эффективность процедуры РНК-и проверяли при помощи обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием специфических праймеров. В качестве контроля использовались клетки S2 дрозофилы, которые не подвергались обработке дцРНК. В результате было показано, что после РНК-и количество транскриптов исследуемых генов существенно снизилось: 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*. В случае с РНК-и гена *Non3* также была выполнена оценка количества белка посредством полуколичественного Вестерн-блот анализа с помощью специфических антител к белку *Non3*; обнаружено, что произошло существенное снижение (на более 90%) количества белка *Non3* по сравнению с контрольными клетками.

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

При обработке процедуры РНК-и генов *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* и *mast* в клетках S2 дрозофилы были проанализированы митотические фенотипы. 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 по описанной ранее методике (Strunov et al., 2016). Для каждой из РНК-и исследуемых генов было отмечено наличие каких-либо нарушений протекания митоза: фрагментация centrosом, изменение размера ВД, задержка клеток на стадии промета- и метафазы, увеличение доли монополярных

клеток, клеток с отстающими хромосомами и псевдо-ана-телофаз (ПАТ). ПАТ – аномальная митотическая клетка, для которой характерно наличие удлинённого 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.

РНК-и гена *Eb1* приводит к снижению количества клеток, находящихся на стадии телофазы (16,4% против 23,6% в контрольных клетках), повышению количества клеток с фенотипом ПАТ (с 6,3% в контрольных клетках до 11,7%), повышение доли клеток с увеличением количества centrosом (13,1% против 7,2% в контрольных клетках); полюсные и межполюсные МТ отсутствуют. РНК-и гена *mars* не влияет на распределение клеток по стадиям митоза по сравнению с контрольными клетками, однако обнаружено небольшое повышение доли клеток на стадии анафазы и телофазы с отстающими хромосомами (4% против 1,2% в контрольных клетках). РНК-и гена *mei-38* приводит к повышению доли прометафазных клеток (46% против 37% в контроле), повышению доли клеток с одной centrosомой (10,8% против 3,4% в контроле), множеством centrosом (14,1% против 7,2% в контроле), с фрагментацией centrosом (3,3% по сравнению с 1,2% в контроле), а также были выявлены клетки с нарушением расхождения centrosом. РНК-и гена *mast* приводит к частому (34,5% против 3,4% в контроле) образованию монополярного ВД, остановке 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). При снижении количества белка Non3 повышаются доли клеток, находящихся на стадии метафазы (28,5% против 20,9% в контрольных клетках), с отстающими хромосомами (7,2% против 1,2% в контроле) и клеток с фенотипом ПАТ (10,4% по сравнению с 6,3% в контроле). Ещё одной характерной особенностью РНК-и гена *Non3* являются визуально бóльшие по размеру полюсные МТ в сравнении с контролем на всех стадиях митоза, вне зависимости от количества centrosом.

Измерение длины ВД (в промета- и метафазных клетках с биполярными ВД) в контрольных клетках и в клетках после РНК-и исследуемых генов показало, что для контрольных клеток медианная длина ВД составляет 14,05 мкм. При РНК-и гена *mars* либо *Non3* не происходит существенного 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).

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 в клетках S2 дрозофилы были получены трансгенные линии S2 клеток, экспрессирующие гибридный белок mCherry- α -тубулин либо mScarlet- α -тубулин в сочетании с исследуемыми белками, слитыми с флуоресцентным белком eGFP (далее в тексте будет использоваться сокращённый вариант написания названия линий «белок-eGFP»). Экспрессия трансгенов проводилась под контролем индуцируемого ионами меди промотора MtnA. Для каждой из трансгенных линий подбиралась концентрация CuSO₄ и время индукции таким образом, чтобы сшитый с eGFP исследуемый белок можно

было визуализировать и при этом не возникало нарушений в формировании ВД и последующем делении клеток из-за сверхэкспрессии гибридных белков.

Прижизненная конфокальная микроскопия трансгенных линий клеток S2 дрозofilы, несущих конструкции Eb1-eGFP, Mars-eGFP, Non3-eGFP, Mei-38-eGFP и Mast-eGFP, показала, что локализация гибридных eGFP-белков совпадает с локализацией эндогенных белков, описанной ранее в литературе. Белок Eb1-eGFP связан с МТ на всех стадиях митоза и обогащен на растущих плюс-концах МТ. Белок Mars-eGFP во время интерфазы локализуется в ядрышке, со стадии промета- и до конца анафазы ко-локализуется с МТ (в основном с кинетохорными), со стадии телофазы локализуется сначала на хромосомах (ранняя телофаза), а затем в ядрышке (поздняя телофаза). Белок Mei-38-eGFP ко-локализуется с МТ (в большей степени с кинетохорными) на стадиях промета-, мета- и анафазы, а со стадии телофазы локализуется в области поперечной перетяжки. Белок Mast-eGFP на стадии интерфазы ко-локализуется с МТ, на стадиях промета-, мета- и анафазы специфически обогащен на хромосомах в области кинетохоров, а также на полюсах ВД на стадии мета- и анафазы, на стадии телофазы локализуется в области поперечной перетяжки.

На момент настоящего исследования данные о локализации белка Non3 во время митоза отсутствовали; было лишь известно, что белок Non3-eGFP локализуется в ядрышке в интерфазе (Moutinho-Pereira et al., 2013). Нами впервые показано, что белок Non3-eGFP в профазе выявляется в основном в ядрышке (Рисунок 4 А), во время метафазы он не ко-локализуется с МТ, однако присутствует небольшое обогащение сигнала Non3-eGFP вокруг хромосом (Рисунок 4 Б). Начиная со стадии анафазы, данный белок локализуется сначала на хромосомах, а затем, начиная со стадии телофазы, – снова в ядрышке (Рисунок 4 В, Г).

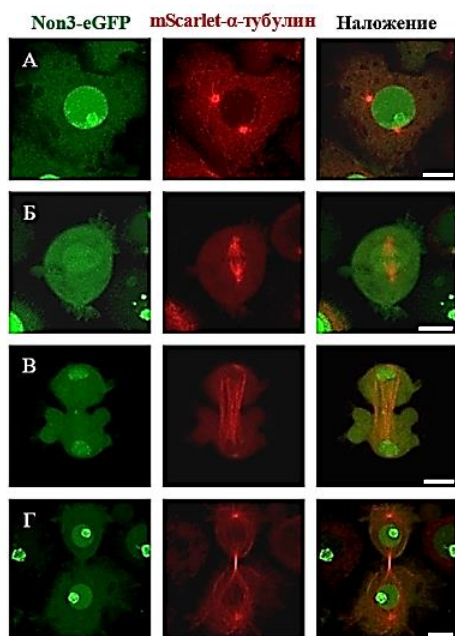


Рисунок 4. Прижизненная локализация белка Non3-eGFP в трансгенной линии клеток S2 дрозofilы. А. Профаза. Б. Метафаза. В. Анафаза. Г. Телофаза. Зеленый цвет – белок Non3-eGFP, красный – белок mScarlet-α-тубулин (конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

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

При изучении роли белков Eb1, Mars, Non3, Mei-38 и Mast в процессе ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров в клетках S2 дрозofilы после колцевидной обработки для каждой из РНК-и исследуемых генов (и соответствующего

контроля) была посчитана частота ПРМТ как минимум в трех биологических повторах (минимум 200 клеток/эксперимент), итоговое количество проанализированных клеток указано в Таблице 1. 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* либо *mei-38* происходит снижение доли клеток с ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров лишь на начальных стадиях восстановления МТ (точки 20 и 30 мин), при этом на поздних временных точках (45 и 75 мин) разница между РНК-и и контрольными клетками отсутствует. Снижение количества белка Non3 статистически значимо влияет на процесс кинетохор-зависимого ПРМТ только во временной точке 20 мин по сравнению с контролем. При РНК-и гена *mast* отмечено самое сильное влияние на динамику ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров, поскольку доля клеток с кинетохор-зависимым ПРМТ 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 1).

Таблица 1. Частота повторного роста микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров после РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* либо *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, не подвергавшиеся обработке диРНК. 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).

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, б) относительно длинные пучки МТ, в) кластеры МТ. 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, поскольку в этот момент времени происходит активное формирование повторно зарождающихся пучков МТ (Таблица 2).

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 2). 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 2). 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 2). Данный анализ проводился на тех же клетках, которые использовались для подсчетов в Таблице 1.

Снижение доли клеток с «длинными пучками МТ» и «кластерами МТ» (Таблица 2) 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 коллемеидной обработкой клеток S2 дрозофилы (Таблица 2). Измерения интенсивности флуоресценции производились на тех же клетках, которые были использованы при подсчете характера ПРМТ в Таблице 2.

Таблица 2. Характер повторного роста и интенсивность флуоресценции повторно растущих от хромосом и/или кинетохоров микроотрубочек после РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках S2 дрозофилы после коллемеидной обработки (30 мин после отмывки клеток от коллемеида).

РНК-интерференция	Характер повторного роста микроотрубочек 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, не подвергавшиеся обработке дцРНК. Представлены средние значения как минимум трех биологических повторов после нормирования на соответствующий контроль, принятый за 1. Данные по интенсивности флуоресценции получены Разуваевой А.В. с использованием программы ImageJ. МТ – микроотрубочки; о.е. – относительные единицы. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (χ^2 тест).

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

Для более полного изучения роли исследуемых белков в процессе кинетохор-зависимого ПРМТ была проанализирована локализация белков *Eb1-eGFP*, *Mars-eGFP*, *Mei-38-eGFP* и *Mast-eGFP* до начала и в процессе восстановления ВД после обработки клеток коллемеидом. 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 4), а также по данным коллемеидной (Таблица 1, 2) либо холодной (0°C) (Рисунок 7, Таблица 3, см. ниже) обработки клеток S2 дрозофилы снижение количества белка *Non3* практически или совсем не влияет на ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров.

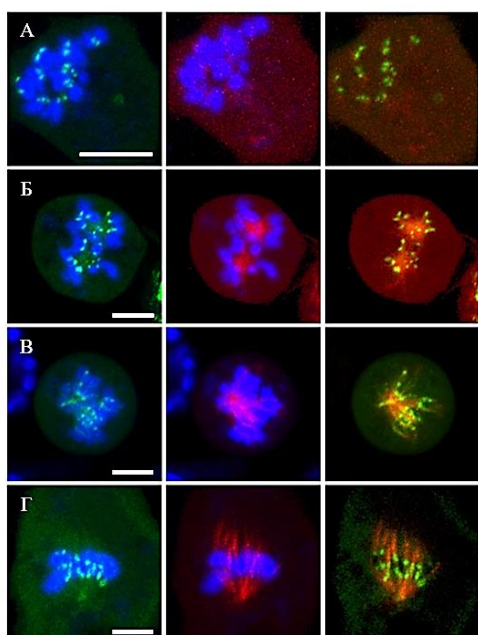


Рисунок 5. Локализация белка Mast-eGFP во время повторного роста микротрубочек после колцемидной обработки. **А.** Локализация белка Mast-eGFP до отмывки клеток от колцемиды. **Б-Г.** Локализация белка Mast-eGFP во время восстановления веретена деления. Синий цвет – прижизненный ДНК-специфический краситель Hoechst (33342), красный – mCherry- α -тубулин, зеленый – белок Mast-eGFP (прижизненная конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

Обнаружено, что белок Mast-eGFP локализуется на хромосомах в области кинетохоров в нулевой момент времени (до отмывки клеток от колцемиды) (Рисунок 5 А), когда ПРМТ отсутствует. Был сделан вывод, 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, а сигналы белка Mast-eGFP окружали кластеры МТ (Рисунок 5 Б, В). Белок Mast-eGFP также ко-локализуется с отрастающими пучками МТ, однако на данных МТ интенсивность флуоресценции eGFP значительно ниже, чем в области кинетохоров (Рисунок 5 Г).

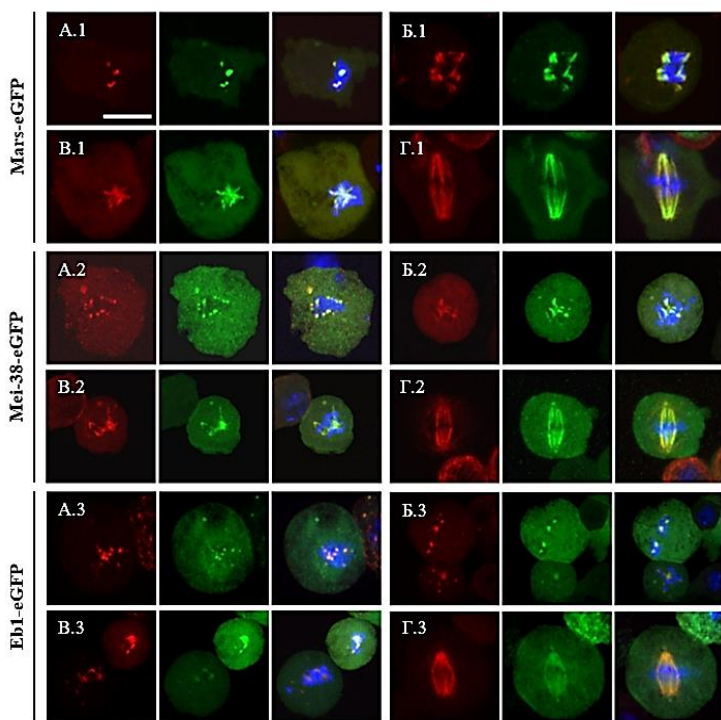


Рисунок 6. Локализация белков Mars-eGFP, Mei-38-eGFP, Ebl-eGFP в трансгенных линиях клеток S2 дрозофилы во время повторного роста микротрубочек после колцемидной обработки. **А.** Начальные фазы повторного роста микротрубочек от хромосом и/или кинетохоров с небольшими сигналами тубулина, которые ко-локализируются с eGFP-мечеными белками. **Б, В.** Более поздние фазы повторного роста микротрубочек, характеризующиеся наличием кластеров микротрубочек. **Г.** Полностью сформированное веретено деления после колцемидной обработки клеток. **1.** Локализация белка Mars-eGFP. **2.** Локализация белка Mei-38-eGFP. **3.** Локализация белка Ebl-eGFP. Синий цвет – ДНК-специфический краситель DAPI, красный – белок α -тубулин (компонент микротрубочек), зеленый – «белок-eGFP» (GFP) (прижизненная конфокальная микроскопия). Масштаб – 10 мкм.

В отличие от белка Mast-eGFP, белки Mars-eGFP, Mei-38-eGFP и Ebl-eGFP не были выявлены на кинетохорах при полной деполимеризации МТ ВД (нулевой момент времени); показано, что данные белки начинают ко-локализоваться с короткими пучками МТ лишь в начале процесса ПРМТ (Рисунок 6 А.1, А.2 и А.3)

и сохраняют свою локализацию в течение всего процесса восстановления ВД (Рисунок 6 Б.1–Г.1, Б.2–Г.2, Б.3–Г.3).

При исследовании процесса ПРМТ после колцевидной обработки трансгенных линий клеток S2 дрозофилы, экспрессирующих eGFP-меченые белки, было отмечено, что формирование повторно растущих МТ от хромосом и/или кинетохоров начинается позже, чем в клетках S2 дикого типа. В трансгенных линиях клеток S2 дрозофилы ВД полностью формируется через 120–160 мин после отмывки клеток от колцемида, а в клетках S2 дрозофилы дикого типа – примерно через 75 мин. Гипотеза о возможном влиянии использованного индуктора (CuSO₄) на динамику ПРМТ не подтвердилась, поскольку при изучении динамики ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров в трансгенной линии S2+tubulin-GFP, для работы с 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. Клетки S2 дрозофилы дикого типа культивируются 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). Трансгенные линии клеток S2 дрозофилы культивируются при 25°C в среде Shields and Sang M3, содержащей 5% FBS, инактивированной тепловой обработкой (65°C, 1 час).

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* в сочетании с обработкой клеток низкой температурой (0°C) проводилось для подтверждения результатов, полученных после колцевидной обработки клеток S2 дрозофилы, поскольку холодная обработка исключает воздействие каких-либо веществ на клетку. Анализ ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров выполнялся на временной точке 30 сек. Для каждого из исследуемых генов (и соответствующего контроля) была посчитана частота ПРМТ после холодной обработки в двух биологических повторах (минимум 100 клеток/эксперимент) (Рисунок 7).

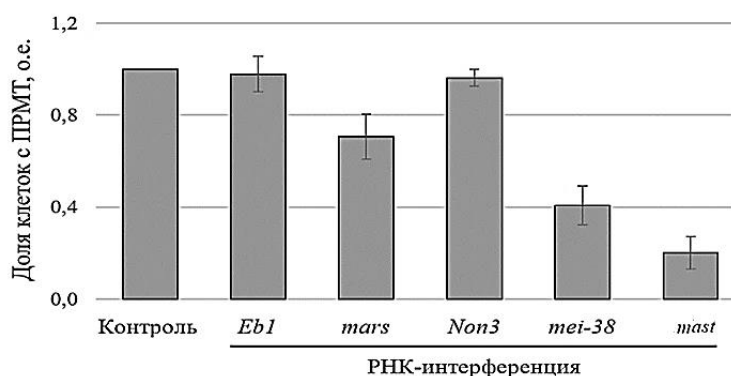


Рисунок 7. Повторный рост микротрубочек (ПРМТ) от хромосом и/или кинетохоров после РНК-интерференции гена *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в клетках S2 дрозофилы после холодной обработки (0°C) (30 сек после возвращения клеток на 22°C). В качестве контроля использованы клетки S2 дрозофилы, не обработанные дцРНК, но прошедшие процедуру обработки низкой температурой. 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 (0°C). 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 транскриптов гена *mei-38* либо *mast* (Рисунок 7). Отличия в результатах, полученных с помощью коллемеидной и холодной обработок (особенно для РНК-и гена *Eb1*) могут быть объяснены тем, что при коллемеидной обработке блокируется ПРМТ от центросом, который также вносит существенный вклад в формирование ВД.

Для изучения характера ПРМТ после обработки клеток низкой температурой (0°C) (Таблица 3) была введена следующая классификация: а) один или несколько коротких пучков МТ; б) длинные случайно ориентированные пучки МТ; в) длинные пучки МТ, ориентированные в веретено-подобную форму. Отмечено, что контрольные и РНК-и клетки демонстрируют схожий характер ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров после холодной обработки, но он варьируется по частоте в зависимости от РНК-и конкретного гена. 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. Анализ проводился на тех же клетках, данные по которым использовались при создании графика на Рисунке 7.

Таблица 3. 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) (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	длинные пучки МТ, ориентированные в веретено-подобную форму
<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, не подвергавшиеся обработке дцРНК. Представлены средние значения как минимум двух биологических повторов после нормирования на соответствующий контроль, принятый за 1. МТ – микротрубочки, о.е. – относительные единицы. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (χ^2 тест).

Обнаружено, что после РНК-и гена *mast*, *mars* либо *mei-38* в более чем 3,6 раза увеличена доля клеток с короткими пучками ПРМТ по сравнению с контролем (Таблица 3). 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. 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 пучками повторно растущих МТ, ориентированных как в ВД, снижена вдвое. Снижение количества белка *Non3* статистически значимо не влияет на характер ПРМТ от хромосом и/или кинетохоров (Таблица 3). Измерения интенсивности флуоресценции тубулина в экспериментах по холодной обработке клеток S2 дрозофилы не выполнялись по причине того, что в большинстве клеток повторно растущие от

центросом МТ накладывались на МТ, повторно формирующиеся 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 центросом-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 центросом-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 центросом-зависимого ПРМТ (Рисунок 8). Измерения производились в промета- и метафазных клетках с биполярными ВД. 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 8).

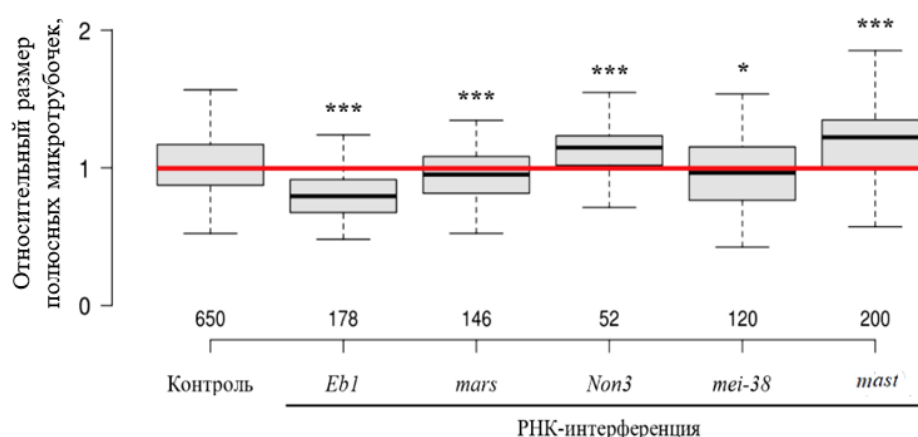


Рисунок 8. Относительный размер полюсных микротрубочек (астр) при РНК-интерференции генов *Eb1*, *mars*, *Non3*, *mei-38* или *mast* в сочетании с методом холодной обработки (0°C) в клетках S2 дрозофилы (30 сек после возвращения клеток на 22°C). Представлены медианные значения как минимум двух биологических повторов после нормирования на соответствующий контроль, принятый за 1. Под графиком указано количество измеренных астр. Красная линия – медианное значение для контрольных клеток. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (*U*-критерий Манна-Уитни).

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-локализируются с вновь растущими микротрубочками на протяжении всего процесса повторного формирования веретена деления после колцемидной обработки трансгенной линии 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 ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ:

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.