

На правах рукописи

Разуваева Алена Викторовна

**РОЛЬ БЕЛКОВ ASP И PATRONIN В ПРОЦЕССЕ
КИНЕТОХОР-ЗАВИСИМОГО ФОРМИРОВАНИЯ
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 – 2026

Работа выполнена в лаборатории клеточного деления Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН и в Новосибирском государственном университете, г.Новосибирск.

Научный руководитель: **Андреева Евгения Николаевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточного деления Института молекулярной и клеточной биологии СО 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

Корнилова Елена Сергеевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая Отделом внутриклеточной сигнализации и транспорта, ФГБУН Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

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 является одним из фундаментальных процессов онтогенеза, поскольку клеточное деление необходимо для развития и роста организма. Биологическое значение митоза состоит в строго одинаковом распределении хромосом между дочерними ядрами, что обеспечивает образование генетически идентичных дочерних клеток. Правильное прохождение митоза и сегрегация хромосом в дочерние клетки обеспечиваются веретеном деления – динамичной молекулярной машиной, которая состоит из микротрубочек (МТ) и нескольких сотен МТ-ассоциированных белков. Процесс сборки митотического веретена деления (ВД) является предметом активного изучения.

На данный момент известно, что в ходе сборки веретена деления нуклеация МТ может происходить от centrosом, кинетохоров или от уже существующих МТ. Наличие нескольких независимых друг от друга способов нуклеации МТ делает сборку веретена деления более надежной и устойчивой к повреждениям. Исследования, выполненные на культивируемых клетках дрозофилы и млекопитающих, показали, что образование МТ только от кинетохоров является необходимым и достаточным для сборки функционального ВД. В разных модельных системах было показано, что в этом процессе могут участвовать белки, необходимые для нуклеации МТ, полимеризации МТ или необходимые для сборки кинетохоров. Однако в настоящее время крайне мало известно о роли белков, связывающихся с минус-концами МТ, в процессе кинетохор-зависимого роста МТ. К данной группе белков относятся белок γ -тубулин (ключевой компонент комплекса γ TuRC), белки комплекса MCRC1-KANSL1-KANSL3, а также белки Asp/ASPM (здесь и далее указано название ортолога у дрозофилы/человека) и Patronin/CAMSAP. Показано, что в отсутствии белкового комплекса MCRC1-KANSL1-KANSL3 или белка γ -тубулина снижается формирование МТ от кинетохоров в культивируемых клетках человека. Участвуют ли белки Asp/ASPM и Patronin/CAMSAP в процессе кинетохор-зависимого роста МТ, неизвестно.

Белки Asp/ASPM и Patronin/CAMSAP являются высококонсервативными, и снижение их количества или отсутствие у млекопитающих приводят к серьёзным нарушениям развития нервной системы. Так, потеря функции гена *ASPM* у мыши и человека является одной из основных причин развития первичной микроцефалии (Pulvers et al., 2010; O'Neill et al., 2017). У человека мутации в гене *CAMSAP1* приводят к нарушению нейрональной миграции, которая может сопровождаться микроцефалией (Khalaf-Nazzal et al., 2022). У мышей потеря функции гена *CAMSAP1* приводит к дефектам миграции кортикальных нейронов (Zhou et al., 2020), а также к бесплодию у самцов (Hu et al., 2023).

Нарушение функции генов, кодирующих белки Asp/ASPM и Patronin/CAMSAP, у дрозофилы приводит к митотическим фенотипам, которые позволяют предполагать участие данных белков в процессе кинетохор-зависимого роста МТ. В нейробластах эмбрионов дрозофилы мутация по гену *asp* приводит к остановке клеточного цикла на стадии метафазы вследствие активации контрольной точки сборки веретена деления SAC. При истощении белка Patronin – единственного представителя семейства белков CAMSAP у дрозофилы – наблюдается фенотип короткого веретена деления в митозе и усиливается деполимеризация МТ в интерфазе за счёт отсоединения МТ от центров их нуклеации. Таким образом, на момент начала исследования было неизвестно, участвуют ли белки Asp/ASPM и Patronin/CAMSAP в процессе кинетохор-зависимого роста МТ, что и явилось предметом исследования в данной диссертационной работе на модели культивируемых клеток S2 дрозофилы.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является исследование роли белков Asp и Patronin в процессе кинетохор-зависимого формирования микротрубочек веретена деления.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить локализацию белков Asp и Patronin в ходе клеточного цикла и их возможную функциональную взаимосвязь при сборке веретена деления в культивируемых клетках S2 дрозофилы.
2. Определить роль белков Asp и Patronin в кинетохор-зависимом росте микротрубочек после их деполимеризации колцемидом в культивируемых клетках S2 дрозофилы.
3. Установить внутриклеточную локализацию химерных белков Asp-eGFP и Patronin-eGFP при деполимеризации микротрубочек веретена деления и в ходе восстановления веретена деления после обработки колцемидом трансгенных линий клеток S2 дрозофилы.

Научная новизна работы и практическая ценность. Впервые была изучена роль белков Asp и Patronin, связывающихся с минус-концами МТ, в процессе кинетохор-зависимого роста МТ. Показано, что белки Asp и Patronin необходимы для этого процесса и их действие различно: белок Asp подавляет рост вновь сформированных МТ, а белок Patronin участвует в стабилизации новых МТ, образующихся вблизи кинетохоров.

В ходе исследования впервые проанализирована локализация химерного белка Asp-eGFP во время кинетохор-зависимого формирования ВД в клетках S2 *Drosophila melanogaster* после колцемид-зависимой деполимеризации тубулина. Показано, что на самых ранних этапах кинетохор-зависимого формирования МТ белок Asp-eGFP локализуется на кинетохорах. На последующих этапах кинетохор-зависимого роста МТ белок Asp-eGFP связывается с минус-концами МТ и сшивает их между собой с образованием

астро-подобных структур, что говорит о роли данного белка в фокусировке МТ на всех этапах формирования ВД, начиная с самых ранних.

В данной работе уточнена локализация белка Patronin в ходе клеточного цикла в клетках S2. Особое внимание уделено локализации белка в митозе на стадии прометафазы. Впервые продемонстрировано, что в митозе загрузка белка Patronin-eGFP на минус-концы МТ происходит на стадии прометафазы. Проанализирована локализация химерного белка Patronin-eGFP во время кинетохор-зависимого формирования ВД в клетках S2. Впервые показано, что белок связывается с МТ, образованными от кинетохоров, на более поздних стадиях формирования ВД, когда МТ представляют из себя длинные пучки.

Результаты данной работы расширяют список молекулярных участников процесса кинетохор-зависимой нуклеации МТ в клетках S2, а также позволяют углубить понимание механики самого процесса кинетохор-зависимого роста МТ. Поскольку белки Asp/ASPM и Patronin/CAMSAР являются эволюционно консервативными, полученные данные способствуют формированию более полного представления о протекании митоза у эукариот. Результаты данного исследования могут быть использованы в учебном процессе высшей школы.

Положение, выносимое на защиту. Белки Asp и Patronin участвуют в процессе кинетохор-зависимого роста микротрубочек во время митоза клеток S2 дрозофилы: белок Asp необходим для фокусировки минус-концов микротрубочек с самых ранних стадий их формирования вблизи хромосом, а белок Patronin – для стабилизации минус-концов микротрубочек, начиная со стадии прометафазы.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на XII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Перспективы развития фундаментальных наук" (Томск, Новосибирск, 2015), международной конференции «Chromosome and mitosis» (Новосибирск, Россия, 2016, 2018, 2019), V Съезде биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), международной конференции «Chromosome 2018» (Новосибирск, Россия, 2018), 11th International conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology «BGRS\SB-2018» (Новосибирск, Россия, 2018).

Вклад автора. Автор диссертационной работы самостоятельно выполнила большинство этапов настоящей работы: получение двуцепочечной РНК, специфичных к исследуемым генам, культивирование клеточных линий S2 дрозофилы, проведение процедуры РНК-интерференции, деполимеризация микротрубочек колцемидом, индукция синтеза химерных белков в трансгенных линиях клеток, приготовление цитологических препаратов с их последующим непрямым иммуноокрашиванием, флуоресцентная и конфокальная микроскопия препаратов фиксированных клеток, обработка и анализ полученных результатов. Конфокальная прижизненная микроскопия

была проведена самостоятельно либо совместно с Андреевой Е.Н. Трансгенные клеточные линии были получены Яринич Л.А. и Лебедевым М.О. Подготовка публикаций осуществлялась автором совместно с Гатти М., Пиндюриным А.В., Павловой Г.А, Поповой Ю.В., Андреевой Е.Н.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 117 страницах и состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, обзора использованных материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 205 наименований. Работа содержит 36 рисунков и 5 таблиц.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в зарубежных рецензируемых журналах и 7 тезисов международных конференций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает четыре раздела и заключение. Подробно описано строение веретена деления и его составных компонентов – микротрубочек, центросом и кинетохоров. Отдельный раздел посвящен описанию контрольной точки сборки ВД (SAC). Дано описание различных путей нуклеации микротрубочек и их взаимодействия во время формирования митотического ВД. Приведена классификация белковых факторов, участвующих в сборке ВД, а также имеющиеся на момент выполнения данной работы сведения об исследуемых белках Asp и Patronin.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы клеточные линии S2 *Drosophila melanogaster* дикого типа, любезно предоставленные Маурицио Гатти (университет La Sapienza, Рим, Италия). Определение внутриклеточной локализации белков проводилось на трансгенных линиях клеток S2, экспрессирующих гибридный белок mCherry- α -тубулин в сочетании с химерными белками Asp-eGFP или Patronin-eGFP. В работе применялись молекулярно-биологические методы, методы работы с клеточными культурами, РНК-интерференция, иммуногистохимические методы, флуоресцентная и конфокальная микроскопия, статистическая обработка данных.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Локализация белков Asp и Patronin в клеточном цикле

Для определения внутриклеточной локализации целевых белков использовались трансгенные клеточные линии дрозофилы S2, нарабатывающие химерные белки Asp или Patronin, слитые в одной рамке считывания с флуоресцентным белком eGFP. В каждой из этих линий помимо одного из исследуемых белков (Asp-eGFP или Patronin-eGFP),

экспрессировался гибридный белок mCherry- α -тубулин для детекции МТ веретена деления. Все трансгены находились под контролем промотора гена *Metallothionein A (MtnA)* *D. melanogaster*, индуцируемого сульфатом меди. После индукции экспрессии трансгенов локализация химерных белков оценивалась при помощи двух подходов: прижизненно и путём непрямого иммуноокрашивания с использованием антител к eGFP и α -тубулину.

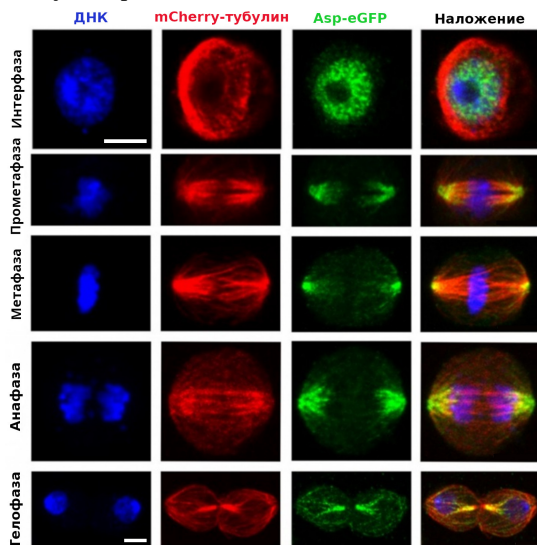


Рисунок 1. Локализация химерного белка Asp-eGFP в клетках S2 (флуоресцентная микроскопия). Непрямое иммуноокрашивание антителами к α -тубулину (красный) и eGFP (зеленый). ДНК окрашена DAPI (синий). Размер шкалы 5 мкм.

Анализ клеток S2, нарабатывающих химерный белок Asp-eGFP, показал, что этот белок с прометафазы до анафазы локализовался на полюсах ВД и в среднем теле ВД во время телофазы, за исключением зоны сократительного кольца (Рис. 1). Во время интерфазы химерный белок Asp-eGFP локализовался в ядре. Окраска на маркер плотного фибриллярного компонента яд-рышка фибрилларин, показала, что Asp-eGFP не колокализуется с ним (Рис. 2).

На стадии интерфазы клетки S2 демонстрировали Patronin-eGFP-позитивные сегменты пучков МТ разной длины (Рис. 3). В профазе белок Patronin-eGFP связывался с некоторыми, но не всеми пучками МТ, идущими от centrosом, и не по всей длине. В разных клетках количество таких Patronin-eGFP-позитивных пучков МТ различалось. В прометафазе вариабельность окраски МТ на белок Patronin-eGFP от клетки к клетке была ещё больше, чем в профазе. В метафазе практически все кинетохорные волокна (к-волокна) были связаны с белком Patronin-eGFP непрерывно или практически непрерывно. В анафазе и телофазе большинство пучков МТ были покрыты химерным белком Patronin-eGFP частично или полностью. Однако среднее тело ВД, где находятся плюс-концы перекрывающихся МТ, было всегда лишено белка Patronin-eGFP.

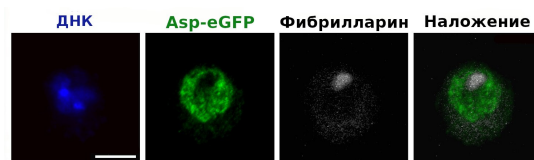


Рисунок 2. Локализация химерного белка Asp-eGFP и фибрилларина в клетках S2 (конфокальная микроскопия, трёхмерная реконструкция). Непрямое иммуноокрашивание антителами к eGFP (зеленый) и фибрилларину (белый). ДНК окрашена DAPI (синий). Размер шкалы 5 мкм.

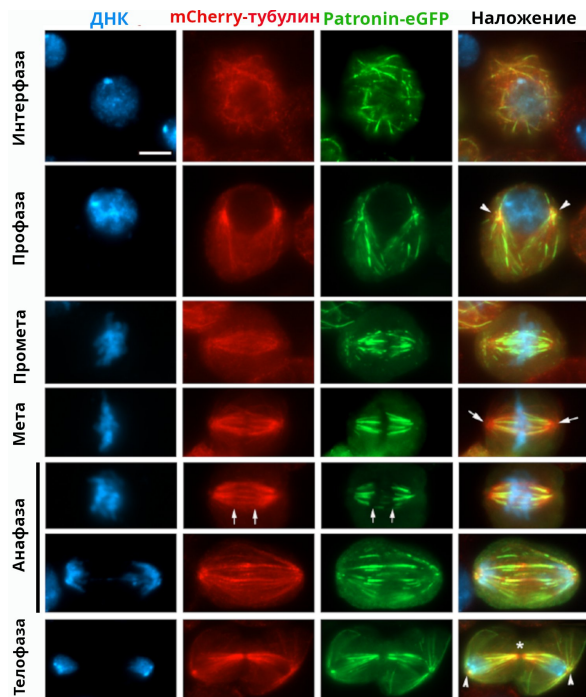


Рисунок 3. Локализация химерного белка Patronin-eGFP в клетках S2 (флуоресцентная микроскопия). Непрямое иммуноокрашивание антителами к α -тубулину (красный) и eGFP (зеленый). ДНК окрашена DAPI (синий). В прометафазе (Промета), метафазе (Мета) и ранней анафазе концы Patronin-eGFP-положительных пучков в основном исключены из полюсов ВД (обозначены стрелками в клетке на стадии метафазы), тогда как в профазе и поздней телофазе некоторые пучки заканчиваются в центре астр (обозначены наконечниками стрел). В ранней анафазе тонкие пучки МТ в центре клетки не обогащены Patronin-eGFP (обозначены двумя стрелками). В телофазе средняя область центрального веретена (отмечено звездочкой) не связана с Patronin-eGFP. Размер шкалы 5 мкм.

Для того, чтобы проанализировать взаимное расположение Patronin-eGFP-позитивных фрагментов МТ и centrosом, которые являются фокусами локализации минус-концов МТ в ВД, был использован centrosомальный маркер Spd-2 (Рис. 4). Было выявлено, что в клетках на стадии профазы Patronin-eGFP-позитивные тубулиновые волокна отходят непосредственно от centrosом. В прометафазе, метафазе и ранней анафазе centrosомы, наоборот, постоянно отделены от Patronin-eGFP-позитивных пучков МТ областью, которая окрашивается только антителами к α -тубулину. В клетках на стадиях телофазы химерный белок Patronin-eGFP покрывает астральные пучки МТ, отходящие от centrosом.

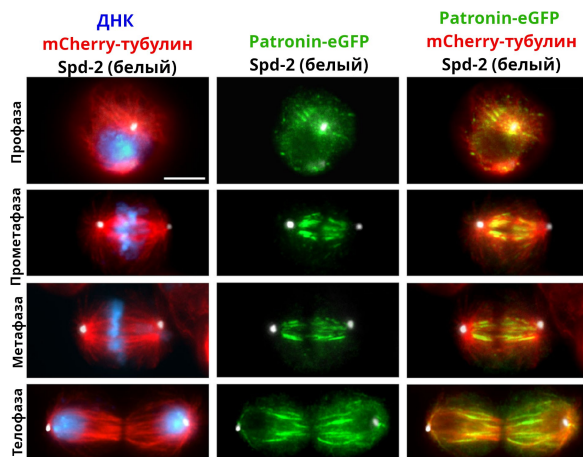


Рисунок 4. Локализация химерного белка Patronin-eGFP и centrosомального белка Spd-2 в клетках S2 (флуоресцентная микроскопия). Непрямое иммуноокрашивание антителами к α -тубулину (красный), centrosомальному маркеру Spd-2 (белый) и eGFP (зеленый). ДНК окрашена DAPI (синий). Размер шкалы 5 мкм.

Для того чтобы лучше понять природу высокой вариабельности локализации химерного белка Patronin-eGFP, наблюдаемой на стадии прометафазы при непрямом иммуноокрашивании, было проведено прижизненное наблюдение клеток S2, нарабатывающих белок Patronin-eGFP, при помощи конфокальной микроскопии (Рис. 5). Было показано, что в живых клетках на стадии прометафазы белок Patronin-eGFP был связан со всем веретеном деления, что проявлялось в виде слабой, но равномерной окраски всего ВД. Однако, спустя некоторое время наблюдения, на веретенах деления в этих клетках появлялись ярко флуоресцирующие сигналы Patronin-eGFP, расположенные вблизи хромосом. Эти яркие сигналы распространялись к

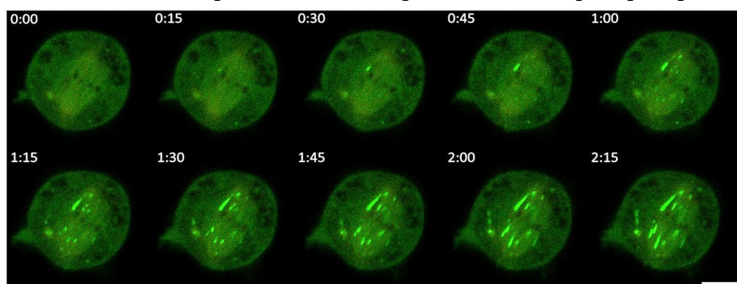


Рисунок 5. Динамическая локализация химерного белка Patronin-eGFP в клетке S2 на стадии прометафазы (конфокальная микроскопия, оптический срез). Покадровая съёмка живой клетки, нарабатывающей белок Patronin-eGFP (зелёный). Сверху каждой микрофотографии указано время (мин:сек), прошедшее с начала прижизненной съёмки. Размер шкалы 5 мкм.

полюсам клеток вдоль ранее существовавших к-волокон, но не достигали полюсов веретена деления. Была посчитана скорость, с которой растут Patronin-eGFP-позитивные участки к-волокна, и она составила 1.44 ± 0.16 мкм/мин. Полученное значение входит в диапазон измеренной ранее скорости тубулинового потока в прометафазе клеток S2 (Buster et al., 2007; Rath et al., 2009; Goodwin and Vale, 2010, Munzarova et al., 2016).

РНК-интерференция (РНКи) генов, кодирующих белки Asp и Patronin

Перед изучением роли белков Asp и Patronin в кинетохор-зависимом росте МТ была отработана процедура РНКи-опосредованного снижения уровня транскриптов генов *asp* и *Patronin* в культивируемых клетках S2 дрозофилы. Эффективность РНКи оценивалась методом обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в реальном времени. Для каждого гена относительный уровень транскриптов был рассчитан как среднее значение, по крайней мере, трех независимых РНКи экспериментов. Было установлено, что относительный уровень транскриптов гена *asp* после РНКи составил $6.4 \pm 0.9\%$, а гена *Patronin* – $28.0 \pm 3.0\%$. В данной работе не удалось добиться более высокой эффективности РНКи гена *Patronin*, но фенотип, который демонстрировали клетки после РНКи, соответствовал ранее опубликованному (Goodwin and Vale, 2011). Нужно подчеркнуть, что эффективность РНКи против гена *Patronin* в клетках S2 ранее не оценивалась ни на уровне белка, ни на уровне мРНК (Goodwin and Vale, 2011; Gillard et al., 2021).

После каждой процедуры РНКи оценивали влияние снижения уровня транскриптов исследуемых генов на следующие параметры митоза: распределение клеток по фазам митоза, доля клеток с псевдо-ана-телофазами (ПАТ), количество centrosом в клетке, длина ВД и другие изменения в морфологии веретена деления. ПАТ – нарушение митоза, характеризующееся расхождением хромосом без разделения сестринских хроматид и одновременно высоким уровнем циклина В, что говорит о том, что метаболически данные клетки находятся на стадии метафазы.

Митотические фенотипы клеток S2 после снижения уровня транскриптов гена *asp*, *Patronin* или двух генов одновременно

Клетки S2, в которых посредством РНКи был значительно снижен уровень транскриптов гена *asp*, демонстрировали статистически значимое увеличение частоты встречаемости ПАТ (12.1% против 5.1% в контрольных клетках), а также некоторое увеличение доли клеток на стадии метафазы (23% против 16.4% в контрольных клетках). Также после РНКи гена *asp* были отмечены изменения в морфологии ВД такие как широкие, плохо сфокусированные полюса ВД и centrosомы, отсоединенные от полюсов ВД.

После РНКи-опосредованного снижения уровня транскриптов гена *Patronin* различий в распределении митотических фаз обнаружено не было.

Было выявлено достоверное увеличение частоты встречаемости ВД с множественными centrosомами (16.3% по сравнению с 4.6% в контроле). Веретена деления в прометафазе и метафазе были плохо организованы: они имели короткие, случайно ориентированные пучки микротрубочек.

Двойная РНКи против генов *asp* и *Patronin* приводила к более сильному митотическому фенотипу, чем фенотипы, наблюдаемые при РНКи отдельных генов. Одновременная РНКи обоих генов вызывала блокировку митоза на стадии метафазы (26.2% по сравнению с 16.4% в контрольных клетках) и уменьшение доли клеток на стадии ана- и телофазы по сравнению с контролем (12.5% и 39.8%, соответственно) и с клетками, подвергшимися РНКи против одного из генов (30.7% в случае РНКи гена *asp* и 37.5% при РНКи гена *Patronin*). Это коррелирует с высокой частотой встречаемости ПАТ при двойной РНКи (22.4% против 4.6% в контроле). Морфологически веретена деления клеток, подвергшихся двойной РНКи, демонстрировали аддитивный фенотип с дефектами, наблюдаемыми в клетках с РНКи отдельных генов: нефокусированные, дезорганизованные пучки МТ, centrosомы, отделенные от полюсов веретена деления, и множественные centrosомы.

Измерение длины ВД в клетках на стадии промета- и метафазы показало статистически значимое увеличение длины веретена деления при РНКи гена *asp* (медианное значение равно 15.0 мкм против 13.7 мкм в контрольных клетках, $p < 0.05$ согласно *U*-критерию Манна-Уитни) и уменьшение длины веретена деления при РНКи гена *Patronin* (11.7 мкм, $p < 0.05$). При одновременной РНКи двух генов длина веретена деления составляла 15.0 мкм – как при РНКи против гена *asp*.

Функциональные взаимоотношения белка Patronin с белками Klp10A и Dgt6

Ранее было показано, что фенотип короткого митотического веретена клеток S2, обедненных по белку Patronin, восстанавливается при совместном истощении деполимеразы МТ Klp10A. Чтобы понять, являются ли восстановленные веретена деления функциональными, нами была проведена РНКи против гена *Klp10A* и двойная РНКи против генов *Patronin* и *Klp10A* и проанализированы полученные митотические фенотипы. Клетки, в которых был снижен уровень транскриптов гена *Klp10A* (до $8.0 \pm 1.3\%$ по сравнению с контролем), чаще демонстрировали веретена со множественными centrosомами (9.4% по сравнению с 4.6% в контроле), а также показывали статистически значимое увеличение частоты встречаемости ПАТ (10.8% против 5.1% в контроле). Длина ВД после РНКи гена *Klp10A* была достоверно выше, чем в контрольных клетках (медианное значение равно 16.7 мкм и 13.7 мкм, соответственно, $p < 0.05$ согласно *U*-критерию Манна-Уитни). В клетках, в которых был совместно снижен уровень транскриптов генов *Patronin* и *Klp10A*, наряду с увеличенной частотой встречаемости ПАТ,

наблюдалось уменьшение доли клеток в анафазе (4.8% против 11.5% в контроле). Доля клеток с множественными centrosомами, которая повышалась при отдельных РНКи, восстанавливалась до контрольных значений при одновременной РНКи генов *Patronin* и *Klp10A*. Веретено деления после одновременной РНКи двух генов было даже длиннее, чем в контрольных клетках (медианное значение равно 17.9 мкм по сравнению с 13.7 мкм в контроле, $p < 0.05$).

Для того чтобы понять, влияет ли белок Klp10A на локализацию белка Patronin, были также проанализированы клетки, нарабатывающие белок Patronin-eGFP, в которых была проведена РНКи против гена *Klp10A*. Было обнаружено, что истощение белка Klp10A не влияет на ассоциацию белка Patronin с пучками микротрубочек ВД.

Интересно отметить, что выявленный нами паттерн распределения химерного белка Patronin-eGFP во время митоза (Рис. 3) сходен с локализацией в клетках S2 белка Dgt6 – одного из компонентов комплекса augmin, который необходим для нуклеации МТ внутри веретена деления. Для определения функциональных взаимосвязей между данными белками, мы исследовали митотический фенотип, возникавший в результате РНКи гена *dgt6* и двойной РНКи против генов *Patronin* и *dgt6*. После РНКи гена *dgt6* наблюдалась низкая доля клеток на стадиях ана- и телофазы (11.8% против 39.8% в контроле), а также высокая частота встречаемости ПАТ (23.8% против 5.1% в контроле). Двойная РНКи против генов *Patronin* и *dgt6* уменьшала количество ПАТ (до 11.8%) и увеличивала долю клеток на стадиях ана- и телофазы по сравнению с клетками после РНКи гена *dgt6* (до 25%). Веретена деления в клетках S2 после одновременной РНКи генов *Patronin* и *dgt6* соединяли в себе дефекты, наблюдаемые после РНКи отдельных генов: длина веретена деления была меньше (медианное значение равно 11.9 мкм по сравнению с 13.7 мкм в контроле, $p < 0.05$ согласно U-критерию Манна-Уитни), как в случае РНКи гена *Patronin*, и плотность микротрубочек ВД была ниже, как в случае РНКи гена *dgt6*. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что белки Patronin и Dgt6 преимущественно играют независимые роли во время митоза.

Роль белков Asp и Patronin в кинетохор-зависимом росте МТ в культивируемых клетках S2

Для того чтобы проанализировать роль белков Asp и Patronin в процессе кинетохор-зависимого формирования МТ, был изучен эффект их РНКи-опосредованного истощения на повторный рост МТ после деполимеризации тубулина, индуцированной колцемидом. Предыдущие работы показали, что после обработки колцемидом centrosомы не могут нуклеировать астральные МТ и можно непосредственно наблюдать кинетохор-зависимый рост микротрубочек в отсутствие centrosомальной активности, что делает такую

систему очень удобной для изучения процесса кинетохор-зависимой нуклеации МТ (Pavlova et al, 2016).

Клетки S2, контрольные и после РНКи генов *asp* или *Patronin*, подвергали воздействию колцеемидом в течение 3 ч. Затем клетки тщательно промывали для удаления колцеемида. Предварительные эксперименты показали, что видимый повторный рост после деполимеризации тубулина колцеемидом начинается через 20 мин после отмывки митостатика, а через 75 мин после отмывки в 60% клеток обнаруживаются частично или полностью повторно сформированные веретена деления. В связи с этим фиксацию клеток формальдегидом (3.7%) проводили через 20, 30, 45 и 75 мин после удаления колцеемида. Часть клеток фиксировали после обработки колцеемидом до удаления митостатика, чтобы проверить степень деполимеризации МТ (время 0). Все клетки были иммуноокрашены на α -тубулин и белок Spd-2 (маркеры МТ и centrosom, соответственно), а для детекции ДНК использовали краситель DAPI. Была подсчитана доля клеток, демонстрирующих кинетохор-зависимый повторный рост МТ (КПРМТ) в контроле и после РНКи генов *asp* или *Patronin*. Мы ограничили наши наблюдения клетками на стадии промета- и метафазы, поскольку кинетохоры клеток на этих стадиях митоза обладают способностью стимулировать образование к-волокон и сборку биполярного веретена. Клетками положительными по КПРМТ считались те, которые демонстрировали по крайней мере один яркий сигнал тубулина, связанный с кинетохорами.

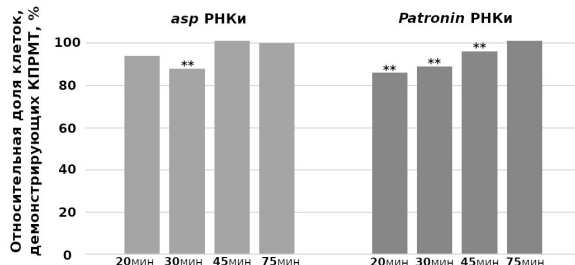


Рисунок 6. Относительная доля клеток, демонстрирующих кинетохор-зависимый повторный рост МТ (КПРМТ), после РНК-интерференции (РНКи) генов *asp* или *Patronin*. Столбцы показывают частоту встречаемости КПРМТ в клетках относительно контроля в разные временные точки после отмывки колцеемида. Контроль был взят за 100%. ** обозначают статистически значимые различия со значением $p \leq 0.01$ в тесте χ^2 . Данные получены из трёх независимых экспериментов. Общее число клеток, посчитанных в разные временные точки (число РНКи клеток/число контрольных клеток): для гена *asp* – 20 мин 847/835, 30 мин 630/626, 45 мин 434/420, 75 мин 419/419, для гена *Patronin* – 20 мин 830/865, 30 мин 770/830, 45 мин 579/619, 75 мин 594/638.

Доля клеток, демонстрирующих КПРМТ, после РНКи гена *asp* была в целом аналогична контрольным значениям (Рис. 6). Исключение составляли клетки через 30 мин повторного роста, где кинетохор-зависимый повторный рост МТ встречался статистически значимо реже, чем в контроле. После

75 мин после отмывки колцемида практически все контрольные и подвергшиеся РНКи гена *asp* клетки демонстрировали КПРМТ. В условиях снижения уровня транскриптов гена *Patronin* доля клеток, показывающих КПРМТ, через 20, 30 и 45 мин после удаления колцемида была статистически значимо ниже, чем в контроле (Рис. 6). Через 75 мин после отмывки колцемида доля клеток с детектируемым КПРМТ практически не отличается от контроля.

Дополнительно был проанализирован паттерн повторного роста МТ после колцемид-опосредованной деполимеризации. Для этой цели была введена следующая классификация фигур повторного роста МТ от кинетохоров: (1) «короткие пучки МТ» – кинетохор-ассоциированные точечные сигналы тубулина (Рис.7.1), (2) «длинные пучки МТ» – пучки МТ, образованные в результате элонгации точечных сигналов (Рис.7.2, 7.3); (3) «кластеры МТ/ астры», образованные в результате ассоциации и перекрытия повторно растущих пучков МТ (Рис.7.4). Для анализа паттерна КПРМТ использовались контрольные клетки и клетки, подвергшиеся РНКи, на стадии промета- и метафазы, зафиксированные через 30 мин после удаления колцемида, поскольку клетки в данной временной точке демонстрируют четкие кинетохор-ассоциированные сигналы тубулина, которые можно дифференцировать и исследовать на морфологию.

Клетки после РНКи гена *asp* показали значительное увеличение количества кластеров МТ/астр по сравнению с контролем (Рис. 8). В соответствии с этим частота встречаемости коротких пучков МТ в условиях снижения уровня транскриптов гена *asp* была достоверно ниже, чем в контроле. В клетках, в которых был снижен уровень транскриптов гена *Patronin*, частота встречаемости коротких пучков МТ была выше, а длинных пучков МТ и кластеров МТ/астр – снижена, однако все выявленные различия статистически незначимы (Рис. 8).

Для более полной характеристики влияния белков Asp и Patronin на кинетохор-зависимый рост МТ в клетках, был измерен уровень сигнала флуоресцентно меченого тубулина, ассоциированного с хромосомами, в контрольных клетках и клетках, подвергшихся РНКи. Этот анализ был проведен на клетках, которые демонстрировали по крайней мере один кинетохор-ассоциированный сигнал тубулина. Клетки после РНКи гена *asp*, показали значительное увеличение интенсивности сигнала флуоресценции тубулина, ассоциированного с кинетохорами (в 2.6 раза по сравнению с контролем, $p \leq 0.05$, U -критерий Манна-Уитни), что согласуется с увеличением частоты встречаемости кластеров МТ/астр по сравнению с контролем (Рис. 8). В клетках, подвергшихся РНКи гена *Patronin*, которые демонстрировали характер повторного роста МТ, сравнимый с контролем (Рис. 8), среднее значение интенсивности флуоресценции было достоверно ниже, чем в контрольных клетках (70% от контрольного уровня, $p \leq 0.01$, U -критерий Манна-Уитни). Это может говорить о том, что в клетках, истощенных по

белку Patronin, содержится меньше кинетохор-ассоциированных фокусов нуклеации МТ, чем в контрольных клетках. Также возможно, что эти фокусы нуклеации содержат в себе меньшее число микротрубочек или более короткие микротрубочки.

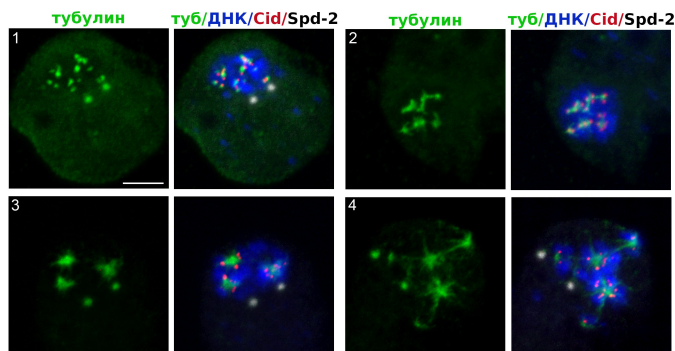


Рисунок 7. Различные паттерны кинетохор-зависимого повторного роста МТ в клетках S2 после коллемеидной обработки (конфокальная микроскопия, трёхмерная реконструкция). Непрямое иммуноокрашивание антителами к α -тубулину (зеленый), маркеру центромер Cid (красный), маркеру центросом Spd-2 (белый). ДНК окрашена DAPI (синий). Размер шкалы 5 мкм.

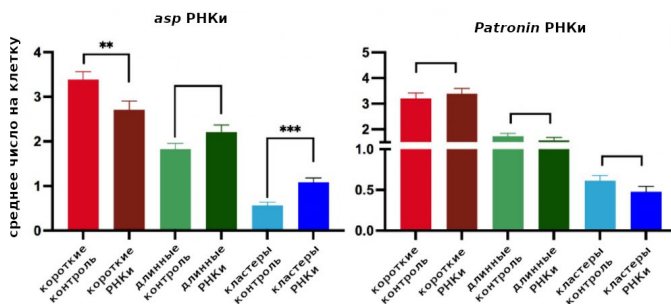


Рисунок 8. Среднее число различных фигур кинетохор-зависимого повторного роста МТ (короткие пучки МТ, длинные пучки МТ и кластеры МТ/астры) на клетку, наблюдаемых через 30 мин после отмывки коллемеида. Данные получены из трёх независимых экспериментов. Пределы погрешностей отражают стандартную ошибку (SEM). Общее число проанализированных клеток (число РНКи клеток/число контрольных клеток): для гена *asp* – 123/143, для гена *Patronin* – 113/124. **, *** обозначают статистически значимые различия со значением $p < 0.01$ и 0.001 , соответственно, согласно U -критерию Манна-Уитни.

Внутриклеточная локализация химерных белков Asp-eGFP и Patronin-eGFP в ходе восстановления веретена деления

Для того чтобы уточнить роль белков Asp и Patronin в процессе кинетохор-зависимого формирования МТ, эксперименты по повторному росту микротрубочек были выполнены в клетках, нарабатывающих mCherry- α -тубулин и Asp-eGFP (или Patronin-eGFP). В этой системе была проанализирована локализация белков Asp и Patronin в ходе КППМТ после

воздействия коллемеида в течение 3 ч. Для контроля степени деполимеризации тубулина (временная точка 0) часть клеток была зафиксирована в конце обработки коллемеидом, непосредственно перед его удалением. Фиксация клеток на разных временных точках с момента удаления коллемеида (через 30, 45, 90 и 120 мин) позволила нам проанализировать локализацию изучаемых белков на различных стадиях повторного формирования ВД, начиная с ранних, состоящих в основном из коротких пучков микротрубочек, и заканчивая поздними стадиями, содержащими удлинённые пучки МТ, часто сходящиеся в полностью сформированное биполярное веретено.

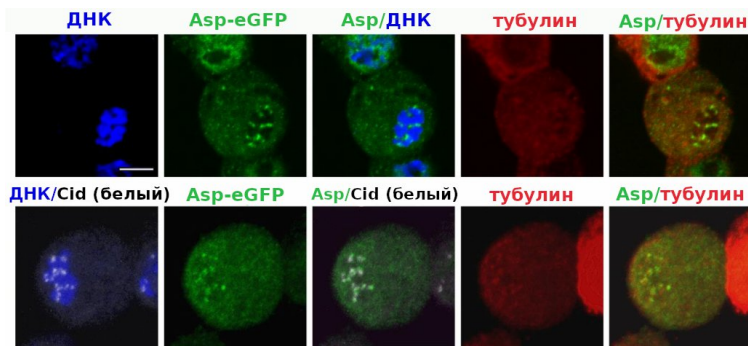


Рисунок 9. Локализация химерного белка Asp-eGFP после коллемеид-опосредованной деполимеризации тубулина (конфокальная микроскопия, трёхмерная реконструкция). На верхней панели показана живая клетка S2, окрашенная прижизненным красителем ДНК Hoechst 33342 (синий). На нижней панели показано не прямое иммуноокрашивание клетки S2, фиксированной перед отмывкой коллемеида, антителами к eGFP (зеленый), маркеру центромер Cid (белый) и маркеру микротрубочек α -тубулину (красный). ДНК окрашена DAPI (синий). Размер шкалы 5 мкм.

Обнаружено, что в момент времени 0 белок Asp-eGFP был сконцентрирован на кинетохорах или вблизи них в 50% клеток ($n = 200$; Рис. 9). На самых ранних стадиях КПРМТ белок Asp-eGFP продолжал оставаться на кинетохорах/хромосомах, демонстрируя частичную колокализацию с начальными очагами полимеризации тубулина (Рис. 10 A1, B1). Затем белок Asp-eGFP обнаруживался в центре тубулиновых кластеров/астр (Рис. 10 A2, B2-B3). По мере прогрессирования повторного роста МТ белок Asp-eGFP ассоциировал с удлинёнными пучками МТ и накапливался на их минус-концах (Рис. 10 A3-A4, B4).

В отличие от белка Asp-eGFP белок Patronin-eGFP в момент времени 0 или на самых ранних стадиях КПРМТ был диффузно распределен в цитоплазме. Яркие сигналы Patronin-eGFP появлялись на более поздних стадиях восстановления ВД, и паттерн их локализации сильно отличался от распределения белка Asp-eGFP: Patronin-eGFP-позитивные фрагменты МТ располагались внутри кластеров МТ или были ассоциированы с удлинёнными пучками МТ, исходящими из тубулиновых кластеров/астр (Рис. 11).

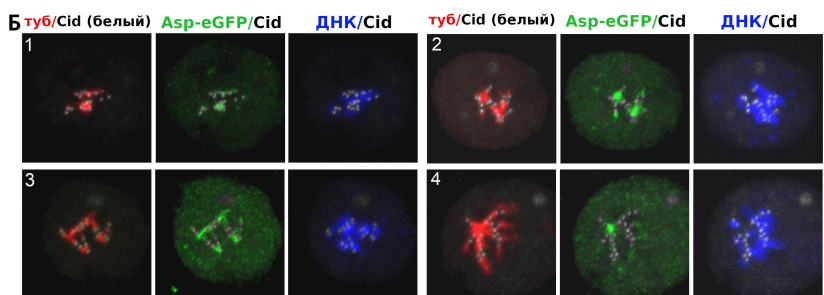
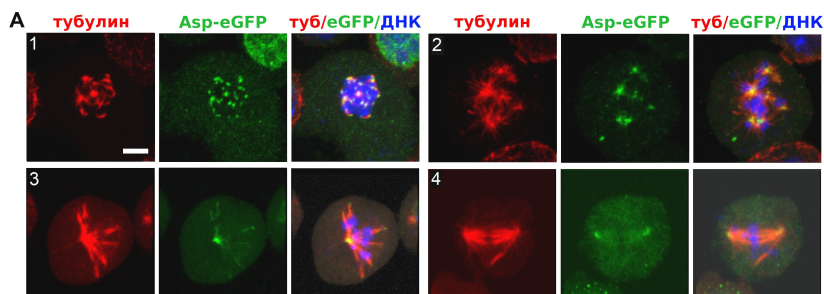


Рисунок 10. Локализация белка Asp-eGFP во время кинетохор-зависимого повторного роста МТ после деполимеризации тубулина, индуцированной колцемидом (конфокальная микроскопия, трёхмерная реконструкция). Непрямое иммуноокрашивание антителами к маркеру микротрубочек α -тубулину (красный), eGFP (зеленый), маркеру центромер Cid (белый, панель Б). ДНК окрашена DAPI (синий). Представлены характерные примеры ранней стадии КПРМТ (А1, Б1, Б2), более продвинутых стадий КПРМТ, характеризующихся присутствием кластеров МТ/астер (А2, Б3, Б4) и различные варианты восстановления ВД после колцемид-опосредованной деполимеризации тубулина (А3, А4). Размер шкалы 5 мкм.

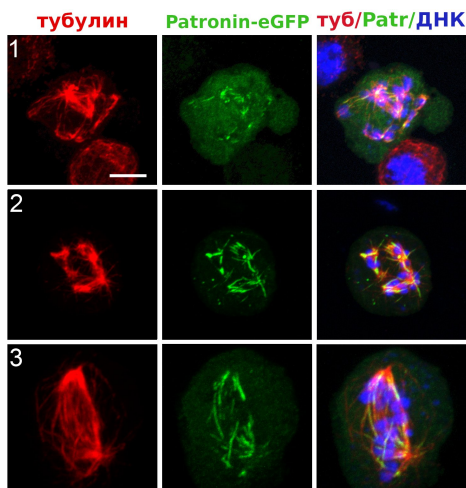


Рисунок 11. Локализация белка Patronin-eGFP в ходе повторного формирования ВД после деполимеризации тубулина, индуцированной колцемидом (конфокальная микроскопия, трёхмерная реконструкция). Непрямое иммуноокрашивание антителами к α -тубулину (красный) и eGFP (зеленый). ДНК окрашена DAPI (синий). Размер шкалы 5 мкм.

ВЫВОДЫ

1. В клетках S2 дрозофилы белок Asp-eGFP в митозе связан с минус-концами микротрубочек на полюсах веретена деления с прометафазы и до телофазы, а в интерфазе белок Asp-eGFP находится в ядре, за исключением зоны плотного фибриллярного компонента ядрышка.
2. В клетках S2 дрозофилы в интерфазе и на стадии профаза митоза формируются Patronin-eGFP-позитивные пучки микротрубочек разной длины. На минус-концы кинетохорных волокон белок Patronin-eGFP загружается во время прометафазы и остаётся связанным с ними вплоть до телофазы.
3. Белки Asp и Patronin необходимы для сборки веретена деления и функционируют независимо друг от друга, связываясь с минус-концами микротрубочек разных классов и на разных стадиях клеточного цикла.
4. Белки Asp и Patronin необходимы для процесса кинетохор-зависимого роста микротрубочек и их действие различно. Белок Asp не принимает участие в нуклеации микротрубочек вблизи кинетохоров, но подавляет их полимеризацию. Белок Patronin участвует в стабилизации микротрубочек, образующихся вблизи кинетохоров, но не оказывает значительного влияния на скорость их полимеризации.
5. В условиях деполимеризации микротрубочек колцемидом белок Asp-eGFP локализуется на кинетохорах. Начиная с ранних этапов кинетохор-зависимого роста микротрубочек и до полного восстановления веретена деления белок Asp-eGFP локализован на минус-концах микротрубочек и фокусирует микротрубочки в пучки/астро-подобные структуры.
6. При полной деполимеризации микротрубочек колцемидом белок Patronin-eGFP локализован в клетках диффузно и связывается с минус-концами микротрубочек только на поздних стадиях кинетохор-зависимого восстановления веретена деления.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ:

1. **Razuvaeva AV**, Graziadio L, Palumbo V, Pavlova GA, Popova JV, Pindyurin AV, Bonaccorsi S, Somma MP, Gatti M. The multiple mitotic roles of the ASPM orthologous proteins: insight into the etiology of ASPM-dependent microcephaly. (doi: 10.3390/cells12060922) Cells 12:922, 2023.
2. Popova JV, Pavlova GA, **Razuvaeva AV**, Yarinich LA, Andreyeva EN, Anders AF, Galimova YA, Renda F, Somma MP, Pindyurin AV, Gatti M. Genetic control of kinetochore-driven microtubule growth in Drosophila mitosis. (doi: 10.3390/cells11142127) Cells 11(14): 2127, 2022.
3. Pavlova GA, **Razuvaeva AV**, Popova JV, Andreyeva EN, Yarinich LA, Lebedev MO, Pellacani C, Bonaccorsi S, Somma MP, Gatti M, Pindyurin AV. The role of Patronin in Drosophila mitosis. (doi: 10.1186/s12860-019-0189-0) BMC Mol Cell Biol 20 (Suppl 1): 7, 2019.