

На правах рукописи

Павлова Гера Алексеевна

**РОЛЬ БЕЛКОВ RCD1, RCD5 И MBD-R2 КОМПЛЕКСА NSL В МИТОЗЕ
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК S2 *DROSOPHILA MELANOGASTER***

03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена на базе лаборатории клеточного деления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Невзорова Татьяна Александровна** кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань

Официальные оппоненты: **Фёдорова Светлана Александровна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая Сектором генетики клеточного цикла ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Рыкова Елена Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Ведущее учреждение: Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, г.Москва

Защита состоится: 29 января 2020 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49, e-mail: ovant@mcb.nsc.ru. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Веретено деления (ВД) является высокодинамичной структурой, состоящей из микротрубочек (МТ), которая обеспечивает точное разделение и расхождение сестринских хроматид в ходе деления клеток. В процессе формирования ВД принимают участие различные белки, которые специфически связываются с МТ и регулируют их динамику. В последние годы все чаще появляется информация об участии белков хроматина в митозе. Последние диссоциируют с хроматина в начале митоза, а затем возвращаются в ядро во время телофазы. Вероятно, они играют функциональную роль, как в интерфазе, так и при формировании ВД. Одним из ярких примеров являются компоненты комплекса KANSL у млекопитающих, который включает в себя, по меньшей мере, шесть белков: KANSL1, KANSL2, KANSL3, MCRS1, PHF20, WDR5, ассоциированных с белком MOF. Комплекс KANSL локализуется в ядре интерфазных клеток, где регулирует транскрипцию определенных генов и способствует поддержанию плюрипотентности стволовых клеток за счет подавления экспрессии генов дифференцировки [Ravens *et al.*, 2014; Chelmicki *et al.*, 2014]. Исследования на клетках человека и экстрактах яиц *Xenopus laevis* показали, что во время митоза белки KANSL1, KANSL3 и MCRS1 связываются с минус-концами МТ митотического веретена, играя существенную роль в сборке ВД и сегрегации хромосом [Meunier and Vernos, 2011; Meunier *et al.*, 2015]. Таким образом, субъединицы комплекса KANSL, которые связаны с хроматином во время интерфазы, вероятно, выполняют определенные функции в митотических клетках.

Комплекс NSL дрозофилы является ортологом комплекса KANSL. Он включает шесть консервативных белковых субъединиц: Nsl1/Wah (KANSL1), Dgt1/Nsl2 (KANSL2), Rcd1/Nsl3 (KANSL3), Rcd5 (MCRS1), MBD-R2 (PHF20), Wds (WDR5), также ассоциированных с белком Mof (MOF/KAT8) и связанных с промоторами более 4000 генов домашнего хозяйства [Feller *et al.*, 2012]. Как и в случае с ортологами человека, дефицит ряда белков комплекса NSL приводит к митотическим дефектам. Так, например, один из генетических скринингов, направленных на идентификацию генов, вовлеченных в митотические процессы у дрозофилы, выделил белки MBD-R2 и Rcd1. Данные, представленные в этой работе, предполагают участие белков MBD-R2 и Rcd1 в процессах разделения сестринских хроматид, регуляции динамики МТ ВД [Somma *et al.*, 2008]. Кроме того, РНК-интерференция гена *MBD-R2* приводит к возникновению хромосомных aberrаций, а при нокдауне гена *Rcd1* отмечалось нарушение конгрессии хромосом на стадии метафазы [Somma *et al.*, 2008]. Другой скрининг, основанный на РНК-интерференции, показал, что белки комплекса NSL – Dgt1, Rcd1 и Rcd5 – участвуют в дупликации центриолей и поддержании структуры centrosom [Dobbelaere *et al.*, 2008]. Однако существующие литературные данные

являются поверхностными и не описывают механизмы, посредством которых компоненты комплекса NSL оказывают влияние на митоз. Соответственно, белки MBD-R2, Rcd1 и Rcd5 явились первоочередными кандидатами для детального исследования их влияния на митотические процессы.

Цели и задачи исследования. Целью исследования является установление вклада белков Rcd1, Rcd5 и MBD-R2 в процесс митоза культивируемых клеток S2 *Drosophila melanogaster*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить и охарактеризовать митотические нарушения, а также оценить количество центромерного белка Cid и кинетохорных компонентов Mitch и Ndc80 при дефиците белков Rcd1, Rcd5 и MBD-R2.
2. Определить эффект нокдауна генов *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2* на уровень экспрессии генов, кодирующих центромерные и кинетохорные белки, а также компоненты центросом.
3. Установить влияние белков Rcd1, Rcd5 и MBD-R2 на формирование микротрубочек от кинетохоров после обработки коллемецидом в клетках со сниженным количеством указанных компонентов комплекса NSL.
4. Определить внутриклеточную локализацию белков Rcd1, Rcd5 и MBD-R2 в митозе.

Научная новизна и практическая ценность. Впервые детально охарактеризованы митотические функции эволюционно консервативных генов *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2*, кодирующих компоненты комплекса NSL дрозофилы, которые играют важную роль в регуляции транскрипционной активности большого числа генов домашнего хозяйства. Установлено, что митотические дефекты после нокдауна вышеперечисленных генов являются следствием нарушения транскрипции генов, кодирующих основные элементы митотического аппарата. Впервые продемонстрирована локализация белков Rcd1 и Rcd5 в отдельных структурах митотических клеток. Результаты представляют интерес для понимания молекулярных механизмов митоза. Поскольку большинство белков, принимающих участие в митозе *D. melanogaster* эволюционно консервативны, исследование способствует формированию представления о механизмах функционирования веретена деления у многоклеточных организмов. Полученные данные могут быть использованы в учебном процессе высшей школы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

Нокдаун генов, кодирующих белки MBD-R2, Rcd1 и Rcd5, приводит к задержке митотического цикла на стадии метафазы в культуре клеток S2 *D. melanogaster*. Кроме того, наблюдаются дефекты разделения и расхождения сестринских хроматид.

Снижение количества белков MBD-R2, Rcd1 и Rcd5 в культуре клеток S2 *D. melanogaster* приводит к нарушению экспрессии ряда генов митотического аппарата и дефициту соответствующих белков.

В ходе митоза белки комплекса NSL специфически локализируются в различных компартментах митотического аппарата: белок MBD-R2 остается связанным с хромосомами, в то время как белки Rcd1 и Rcd5 выявляются в области centrosом и центральной области борозды деления.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на:

Международной конференции «Chromosome 2015» (Новосибирск, Россия, 2015); III Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015» (Новосибирск, Россия, 2015); Международной мини-конференции «Chromosomes and Mitosis 2015» (Новосибирск, Россия, 2015); 10th International conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology «BGRS/SB-2016» (Новосибирск, Россия, 2016); II Всероссийском научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Казань, Россия, 2016); Italian Drosophila Research Conference (Bologna, Italy, 2016); V Съезде биохимиков России (Сочи, Россия, 2016); Международной мини-конференции «Chromosomes and Mitosis 2016» (Новосибирск, Россия, 2016), Международной конференции «Chromosome 2018» (Новосибирск, Россия, 2018), 14th International conference on Drosophila heterochromatin (Spoleto, Italy).

Вклад автора. Автором выполнена вся экспериментальная часть работы, связанная с культурами клеток S2 дрозофилы, а также обработка и анализ полученных результатов. Антитела к белку Rcd1 были получены совместно с Е.Н. Андреевой. Биоинформатический анализ литературных данных ChIP был проведен А.В. Пиндюриным. Трансгенные клеточные линии были получены Л.А. Яринич. Электронные микрофотографии были получены на базе ИЦИГ СО РАН А.А. Струновым. Подготовка публикаций осуществлялась автором совместно с М. Гатти, А.В. Пиндюриным, Е.Н. Андреевой, П. Сомма.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах текста и состоит из введения, обзора научной литературы, описания использованных материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 165 наименований. Работа включает в себя 15 таблиц и 24 рисунка.

Материалы и методы. В работе использовалась клеточная линия S2 *Drosophila melanogaster*, имеющая эмбриональное происхождение. Для определения прижизненной клеточной локализации белков и их функциональности были использованы трансгенные линии клеток S2, экспрессирующие гибридный флуоресцентный белок mCherry- α -тубулин и исследуемый белок-eGFP.

Генно-инженерные конструкции для синтеза двуцепочечной РНК создавались на основе плазмидного вектора pGEM-T Easy Vector System I (Promega, США) с использованием классических протоколов клонирования и трансформации. Синтез (транскрипция *in vitro*) двуцепочечной РНК (дцРНК) осуществляли с помощью набора для *in vitro* транскрипции на основе T7 ДНК-зависимой РНК полимеразы (Fermentas,

США) согласно прилагаемому протоколу производителя. Нокдаун целевых генов осуществляли с помощью РНК-интерференции путем добавления в клеточную суспензию соответствующих дцРНК, концентрации которых были подобраны экспериментально. Эффективность РНК-интерференции оценивали с помощью определения уровня экспрессии исследуемых генов методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реального времени. Изменение количества исследуемых белков в контрольных и экспериментальных образцах анализировали методом вестерн-блот.

Методами непрямого иммуноокрашивания и флуоресцентной микроскопии определены митотические фенотипы в клетках *S2 D. melanogaster* при снижении количества исследуемых белков. Для анализа повторного роста МТ был использован метод деполимеризации МТ колцемидом с последующей фиксацией, непрямым иммуноокрашиванием и флуоресцентной микроскопией. Локализацию химерных белков *in vivo* устанавливали с использованием лазерной сканирующей микроскопии. Изменения экспрессии генов оценивали по результатам обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в режиме реального времени. Обработку данных осуществляли с помощью языка программирования R (<https://www.r-project.org/>) и программного обеспечения MS Excel. Достоверность различий оценивали при помощи критерия χ^2 (хи-квадрат) и Вилкоксона (двухпарный U-критерий Манна-Уитни) с учетом поправки Бонферрони.

Результаты и обсуждение. Для определения влияния компонентов комплекса NSL – белков Rcd1, Rcd5 и MBD-R2 – на митоз использовали метод РНК-интерференции. Для оценки эффективности РНК-интерференции проводили анализ количества транскриптов целевых генов или соответствующих белковых продуктов. На рисунке 1А приведены результаты оценки эффективности РНК-интерференции в используемой системе культуры клеток *S2 D. melanogaster* после нокдауна изучаемых генов. За 100% была принята экспрессия исследуемых генов в контрольных клетках S2, которые не обрабатывались дцРНК.

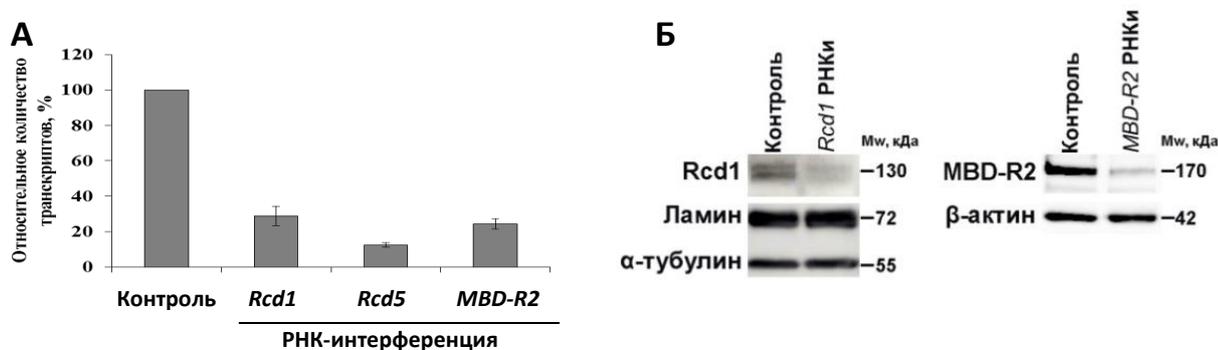


Рисунок 1. (А) Относительное количество мРНК генов, кодирующих исследуемые белки, в контрольных клетках S2 и после РНК-интерференции (РНКи). (Б) Снижение количества белков Rcd1 и MBD-R2 в экстрактах клеток S2 после РНКи, вестерн-блот анализ; белки ламин, α -тубулин и β -актин использовались в качестве контроля количества общего белка на дорожку

В результате использования дцРНК, которые специфичны к транскриптам генов-мишеней, экспрессия гена *Rcd1* снизилась до 29%, гена *Rcd5* – до 13% и гена *MBD-R2* до 24%, что свидетельствует об эффективности РНК-интерференции и сопровождается снижением количества соответствующих белковых продуктов в клетках S2 (Рисунок 1Б).

Влияние белков *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2* на структуру и формирование centrosом

После проведения РНК-интерференции дцРНК к кодирующей области генов контрольные и экспериментальные образцы были окрашены антителами против α -тубулина и маркера centrosом, белка DSpd2. Микроскопический анализ показал, что дефицит каждого из исследуемых компонентов комплекса NSL приводит к очевидным дефектам дупликации хромосом, выражающимся в увеличении доли клеток без или с единственной centrosомой. Детальный анализ показал восьмикратное увеличение доли клеток с фрагментированными centrosомами при снижении количества белков *Rcd1* и *Rcd5* (Таблица 1), что может свидетельствовать о стабилизации этими белками перичентриольного материала (ПЦМ).

Таблица 1. Доля клеток с указанным количеством centrosом или их фрагментацией

РНК-интерференция	N	Доля клеток с указанным числом centrosом, %			
		0-1	2	>2	Фрагментация
Контроль	762	3,8	82,4	11,9	1,8
<i>Rcd1</i>	318	19,8*	55,3	5,7*	19,2*
<i>Rcd5</i>	166	23,5*	50,6	6,6*	19,3*
<i>MBD-R2</i>	208	30,8*	53,4	10,1	5,8

* - $p < 0.05$ (Критерий хи-квадрат), N – количество проанализированных клеток

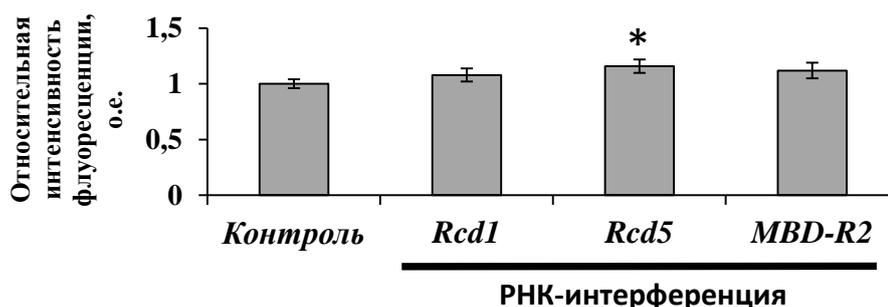


Рисунок 2. Количественный анализ флуоресценции centrosом, выявленных окрашиванием клеток антителами к белку DSpd2 в контрольных и экспериментальных образцах; для определения статистической значимости использовался Т-критерий Вилкоксона; * - $p < 0.05$

Измерение интенсивности флуоресценции сигналов DSpd2 в контрольных клетках и после РНК-интерференции показало, что нокаун гена *Rcd5* приводит к небольшому, но статистически значимому увеличению интенсивности флуоресценции, тогда как нокаун генов *MBD-R2* и *Rcd1* не оказал влияния на этот показатель (Рисунок 2). Обнаружено, что визуально интенсивность окрашивания и

форма астральных МТ в этих клетках не отличаются от таковых в контроле. Полученные данные согласуются с результатами работы Dobbelaere *et al.* [2008], авторы которой показали, что дефицит белка Rcd1 в клетках дрозофилы приводит к снижению количества centrosом, но не влияет на привлечение перицентриолярного материала (ПЦМ) в область centrosом, в то время как снижение количества белка Rcd5 оказывает умеренное влияние на накопление ПЦМ.

С целью более детального исследования centrosомных дефектов была использована трансгенная линия клеток S2, экспрессирующая химерные белки Asl-GFP и mCherry-tubulin. Белок Asl является одним из основных компонентов центриолей и связывает центриоли и ПЦМ [Varmark *et al.*, 2007; Dzhindzhev *et al.*, 2010; Mennella *et al.*, 2012]. Анализ таких клеток на стадии интерфазы после окрашивания антителами против GFP и α -тубулина показал, что после РНК-интерференции генов *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2* значительно возрастает доля клеток с единственным сигналом Asl-GFP (Таблица 2).

Таблица 2. Доля клеток с указанным количеством сигналов Asl-GFP

Число сигналов Asl-GFP	Доля клеток с указанным числом сигналов Asl-GFP			
	Контроль	РНК-интерференция		
		<i>Rcd1</i>	<i>Rcd5</i>	<i>MBD-R2</i>
1	4%	10%*	12%*	9%*
2	49%	50%	46%	52%
>2	47%	40%*	42%	39%*
N	557	546	681	667

* - $p < 0.05$ (Критерий хи-квадрат), N – количество проанализированных клеток

Влияние исследуемых компонентов комплекса NSL на ход митоза

Анализ митотического фенотипа в клетках с дефицитом белков Rcd1, Rcd5 или MBD-R2 выявил схожие дефекты разделения дочерних хромосом. Во всех случаях обнаружено критическое снижение доли анафаз (менее чем до 2,5%) и значительное увеличение доли псевдо-анателофаз (до 44%) (Таблица 3, Рисунок 3), которые ранее были обнаружены в клетках с дефицитом центромерных или кинетохорных компонентов [Somma *et al.*, 2008; Renda *et al.*, 2017].

Таблица 3. Распределение клеток по фазам митотического цикла при РНК-интерференции (РНКи) генов, кодирующих белки Rcd1, Rcd5 и MBD-R2

	N	Прометафаза (%)	Метафаза (%)	Анафаза (%)	Телофаза (%)	ПАТ (%)	Отстающие хромосомы (%)	
Контроль	1518	38,0	20,9	12,1	22,3	5,2	1,6	
РНКи	<i>Rcd1</i>	831	23,9	13,1	2,2*	17,1	35,4*	8,3*
	<i>Rcd5</i>	424	31,1	13,7	0,9*	14,4	35,4*	4,5*
	<i>MBD-R2</i>	668	23,4	19,6	0,6*	12,7	44,2*	6,6*

* - $p < 0.05$ (Критерий хи-квадрат), N – количество проанализированных клеток

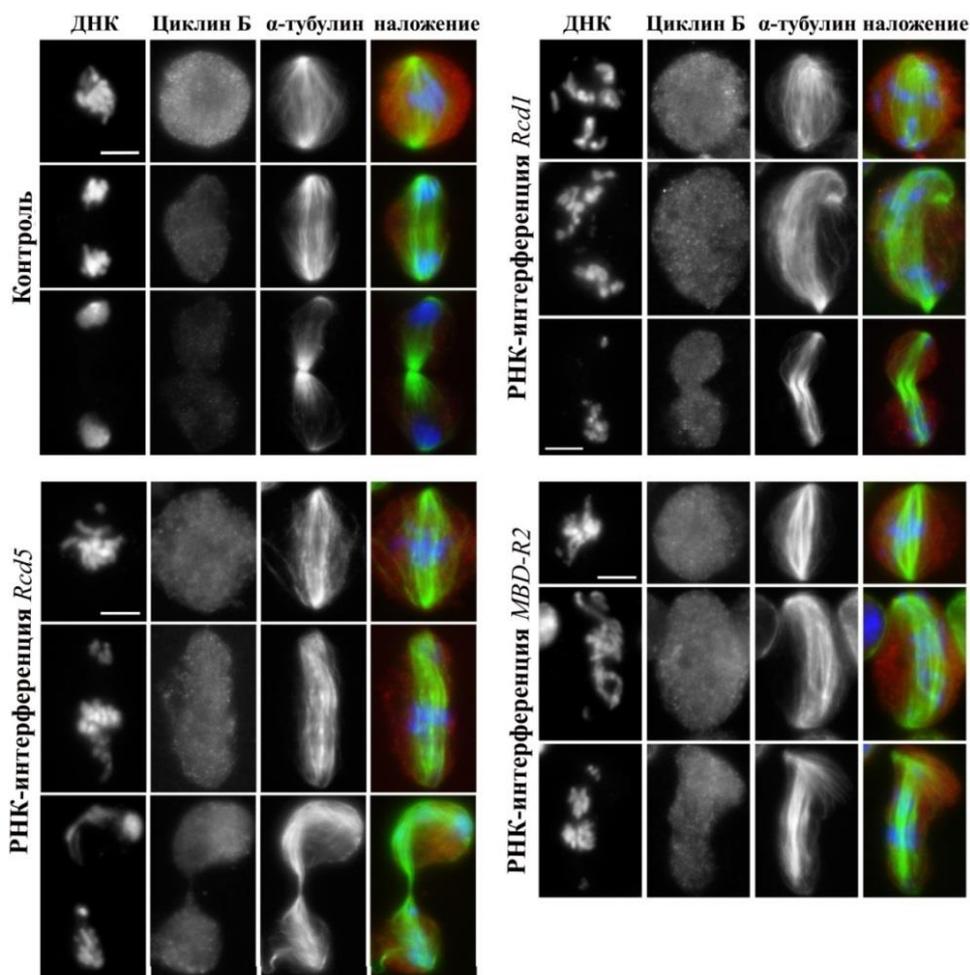


Рисунок 3. Типичные митотические фенотипы контрольных клеток (сверху вниз: прометафаза, анафаза и телофаза) и клеток после РНК-интерференции генов *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2* (ПАТ), иммуноокрашенных против α-тубулина (зеленый) и СусВ (красный). ДНК окрашена ДАПИ (синий). Шкала 5 мкм

В дополнение был проведен анализ нарушений ВД как в контрольных, так и в экспериментальных образцах. Измерения длины ВД в промета- и метафазе показали, что при РНК-интерференции генов *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2* этот показатель достоверно увеличен по сравнению с контролем (Таблица 4). Длина ВД ПАТ сопоставима с таковой в контрольных клетках на стадии телофазы (Таблица 4). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что часть проанализированных прометафаз на самом деле являлась ранней стадией ПАТ с удлинённым ВД и возможных нарушениях в работе контрольной точки перехода клеток из метафазы в анафазу.

Таблица 4. Длина ВД на разных стадиях митоза, статистическая значимость рассчитывалась с использованием Т-критерия Вилкоксона; N – количество проанализированных клеток на указанных стадиях митоза, статистическая достоверность при $p < 0.05$

	Контроль				РНК-интерференция					
	Промета + Мета	Ана	Тело	ПАТ	Промета + Мета	ПАТ	Промета + Мета	ПАТ	Промета + Мета	ПАТ
N	135	24	67	10	79	44	87	58	77	74
медиана	13,8	19,6	25,0	21,6	14,8	22,6	15,1	24,2	16,1	24,0
p	-	-	-	-	0,001391	0,009038	0,0002609	0,149	$1,988 \times 10^{-6}$	0,5716

Локализация GFP-меченых исследуемых белков в культуре клеток S2

Для выяснения роли исследуемых белков в процессе митоза важным этапом явилось определение их локализации в живых клетках. Для решения поставленной задачи были использованы клетки культуры S2, в которых целевой белок «сшит» с eGFP, а α -тубулин, входящий в состав МТ ВД, «сшит» с mCherry.

Прижизненная конфокальная микроскопия клеток S2, несущих конструкции Rcd1-eGFP, Rcd5-eGFP или MBD-R2-eGFP подтвердила локализацию исследуемых белков в ядрах интерфазных клеток (Рисунки 4-5). Однако когда клетки входят в митотический цикл белки Rcd1-eGFP и Rcd5-eGFP перемещаются в область центросом на стадиях промета- и метафазы (Рисунок 4).

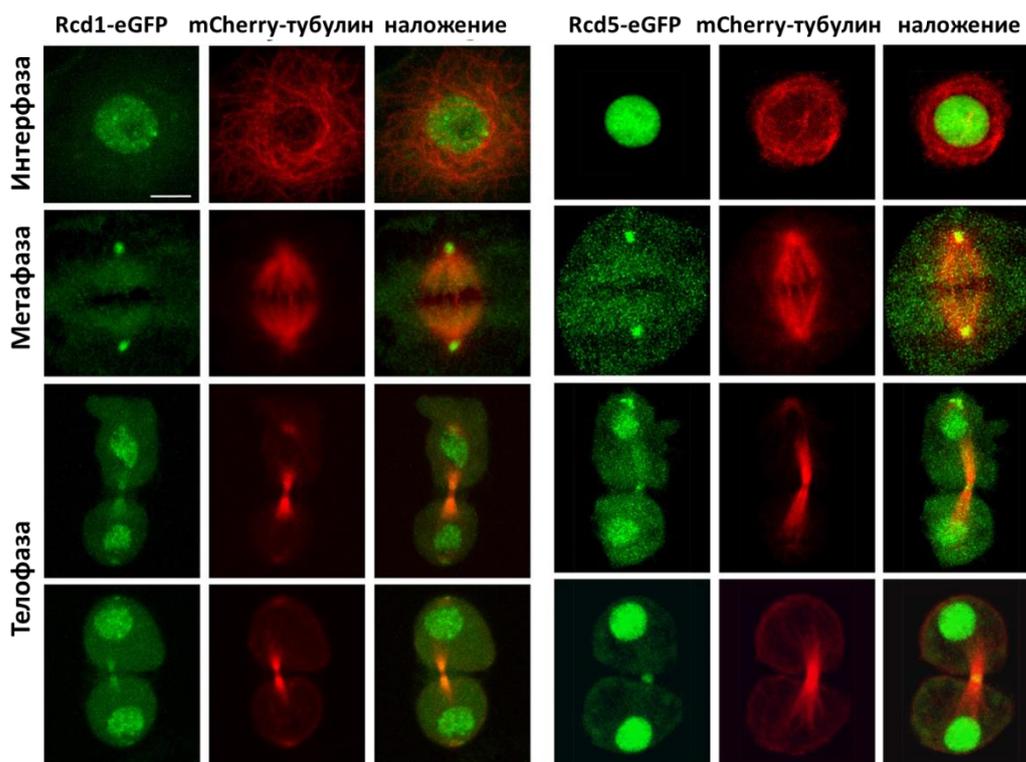


Рисунок 4. Типичные микрофотографии, демонстрирующие локализацию белков Rcd1- eGFP и Rcd5-eGFP в интерфазе и на различных стадиях митоза (метафаза; телофаза). Шкала 5 мкм

На стадии телофазы белки Rcd1-eGFP и Rcd5-eGFP начинают концентрироваться в ядрах дочерних клеток, а также в области центриолей/центросом и борозды деления (структуры, связывающей дочерние клетки на протяжении поздней телофазы и цитокинеза). Борозда деления включает в себя пучки антипараллельных МТ, плюс-концы которых перекрываются в центре этой структуры. Область, где происходит перекрытие, обычно затемнена после окрашивания антителами против α -тубулина за счет обогащения различными белками, которые блокируют связывание антител с мишенью [Hu *et al.*, 2012]. Интересно, что белок Rcd5-eGFP специфически локализован в затемненной области борозды деления, но в то же время белок Rcd1-eGFP расположен по обе стороны этой структуры (Рисунок 4). Такая специфическая локализация вызывает вопрос о непосредственном функционировании этих белков в

митозе. Однако, маловероятно, что белки Rcd1 и Rcd5 напрямую вовлечены в процесс разделения и расхождения сестринских хроматид или дупликации центриолей, поскольку эти процессы нарушены и в клетках с дефицитом белка MBD-R2, который детектировался исключительно в области хромосом во время митоза (Рисунок 5).

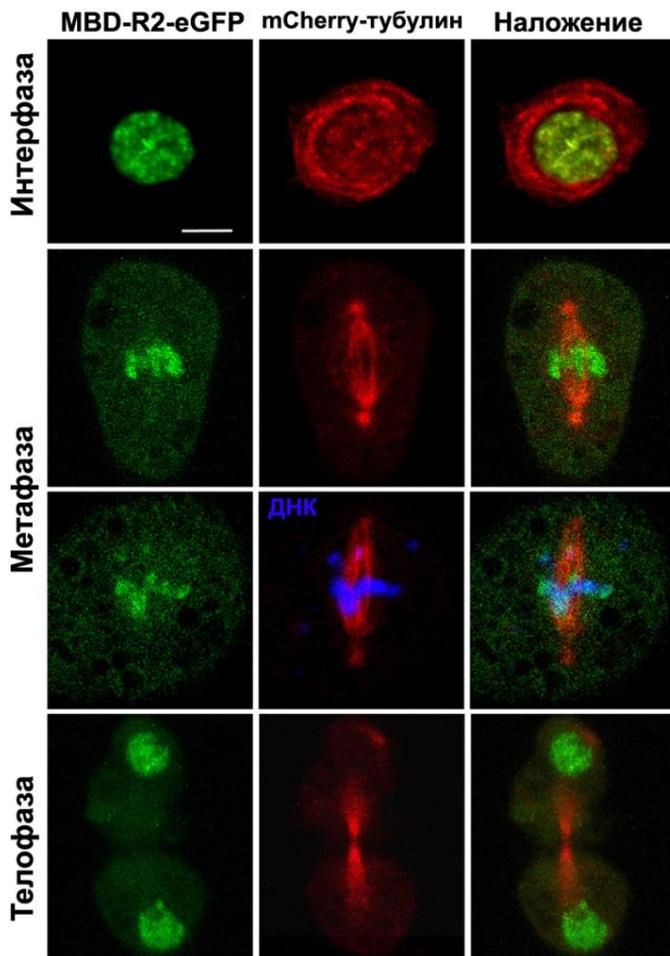


Рисунок 5. Типичные микрофотографии, демонстрирующие локализацию белка MBD-R2-eGFP в интерфазе и на различных стадиях митоза. ДНК окрашена прижизненным красителем Hoechst 33342. Шкала 5 мкм

Поскольку в трансгенных линиях клеток исследуемые компоненты комплекса NSL демонстрируют различные паттерны локализации в митозе, следующим этапом стало выяснение функциональности eGFP-меченых белков. Для этого были использованы дцРНК, мишенью которых являлись 5'- или 3'-нетранслируемые области эндогенных (untranslated regions, UTRs) транскриптов, но не кодирующие последовательности (coding sequences, CS) эндогенов и конструкций, кодирующих eGFP-химерные белки. Применение UTR дцРНК должно было позволить снизить количество эндогенных белков в трансгенных линиях клеток, при этом индукция экспрессии трансгенов сульфатом меди (II) должна была привести к наработке eGFP-химерных белков и, как следствие, дать возможность оценить функциональность последних.

В клетках, экспрессирующих eGFP-меченые белки, РНК-интерференция с применением CS дцРНК привела к фенотипу, схожему с таковым в клетках дикого типа. Использование UTR дцРНК в клетках дикого типа не выявило такого же

количества митотических дефектов, однако сохранилась сниженная и повышенная доля анафаз и ПАТ, соответственно (Таблица 5). Такой эффект, вероятно, связан с тем, что UTR дцРНК существенно короче, чем соответствующие CS дцРНК. Следовательно, при использовании дцРНК меньшей длины, образуется меньше малых интерферирующих РНК в клетке и, соответственно, распознается меньшее количество сайтов-мишеней на молекуле мРНК. Тем не менее, при проведении РНК-интерференции с использованием UTR дцРНК в трансгенных линиях клеток для каждого из исследуемых генов наблюдается восстановление фенотипа (доля анафаз и ПАТ сравнима с таковой в клетках дикого типа и контрольных трансгенных линиях клеток) (Таблица 5).

Таблица 5. Экспрессия eGFP-меченых белков комплекса NSL спасает митотические фенотипы, вызванные РНКи-опосредованным снижением уровня соответствующих эндогенных белков. Wt – клетки дикого типа, не несущие каких-либо трансгенов, CS – кодирующая последовательность; UTR – нетранслируемые области мРНК; Cu²⁺ – сульфат меди (II). Промета – прометафазы; Мета – метафазы; ПАТ – псевдоанателофазы; Ана – анафазы; Тело – телофазы. * - p<0.05 (Критерий хи-квадрат)

РНК-интерференция в клетках дикого типа или в трансгенных линиях клеток	N	Промета (%)	Мета (%)	ПАТ (%)	Ана (%)	Тело (%)	Отстающие хромосомы (%)
Контроль wt	1518	38,0	20,9	5,2	12,1	22,3	1,6
CS Rcd1 wt	831	23,9	13,1	35,4	2,2	17,1	8,3
CS Rcd5 wt	424	31,1	13,7	35,4	0,9	14,4	4,5
CS MBD-R2 wt	668	23,4	12,6	44,2	0,6	12,7	6,6
UTR Rcd1 wt	191	38,7	26,2	20,4*	0,5	12,6	1,6
Контроль Rcd1-GFP	343	38,8	32,7	5,5	9,3	12,0	1,7
UTR Rcd1 в Rcd1-GFP + Cu ²⁺	201	44,8	15,9	3,0*	11,4	22,4	2,5
CS Rcd1 в Rcd1-GFP	109	34,9	15,6	41,3	1,8	4,6	1,8
UTR Rcd5 wt	105	30,5	27,6	19,0*	3,8	16,2	2,9
Контроль Rcd5-GFP	338	42,9	34,9	2,1	8,3	9,2	2,7
UTR Rcd5 в Rcd5-GFP + Cu ²⁺	212	42,0	26,9	2,8*	8,0	17,9	2,4
CS Rcd5 в Rcd5-GFP	111	22,5	14,4	46,8	0,9	9,0	6,3
UTR MBD-R2 wt	200	42,0	22,0	15,0*	2,5	15,0	3,5
Контроль MBD-R2-GFP	328	41,8	26,8	3,0	11,3	15,2	1,8
UTR MBD-R2 в MBD-R2-GFP + Cu ²⁺	199	29,6	35,2	4,0*	8,0	20,6	2,5
CS MBD-R2 в MBD-R2-GFP	179	29,1	15,6	41,9	1,1	7,3	5,0

N – количество проанализированных клеток

Стоит отметить, что в каждом случае экспрессия экзогенного белка контролировалась экспериментально подобранной ранее концентрацией сульфата меди (II). Для наиболее полного представления о соотношении уровней эндогенного и

экзогенного белков, был проведен вестерн-блот анализ лизатов клеток, экспрессирующих белок Rcd1-eGFP или MBD-R2-eGFP.

Эксперименты показали, что максимальная концентрация (0,5 мМ) сульфата меди (II) приводит к наработке количества белка MBD-R2-eGFP, сопоставимого с количеством эндогенного белка MBD-R2 (Рисунок 6). В то же время количество белка Rcd1-eGFP было сопоставимо с количеством эндогенного белка Rcd1 при использовании индуктора в концентрации 0,1 М, тогда как сульфат меди (II) в концентрациях 0,25 и 0,5 М увеличивал количество белка Rcd1-eGFP в 2,5 и 3,9 раза, соответственно (Рисунок 6). Однако, митотическая локализация исследуемых белков, по-видимому, является специфической и не зависит от их внутриклеточной концентрации. Для клеток, экспрессирующих белок Rcd5-eGFP такой анализ не проводился из-за недоступности соответствующих антител.

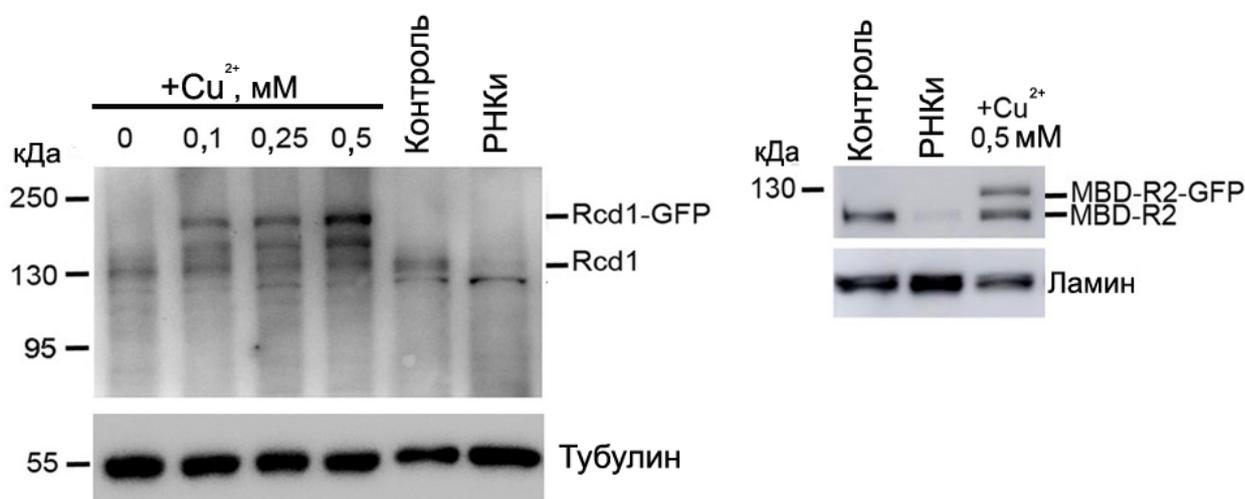


Рисунок 6. Изменение количества белков Rcd1-eGFP и MBD-R2-eGFP в зависимости от концентрации индуктора сульфата меди (II) (Cu^{2+}), вестерн-блот анализ. α -тубулин и ламин использовались в качестве контроля нагрузки общего белка на дорожку. В качестве контроля были использованы клетки дикого типа, РНКи – РНК-интерференция с использованием CS проб в клетках дикого типа

Таким образом, восстановление митотического фенотипа при дефиците эндогенных белков комплекса NSL с одновременным увеличением количества химерных белков в клетках указывает на то, что GFP-меченые компоненты комплекса являются функциональными, а значит их локализация в клетках, по-видимому, соответствует локализации эндогенных белков.

Влияние белков комплекса NSL на центромерные и кинетохорные компоненты

Поскольку наличие ПАТ обычно обусловлено нарушениями в функционировании контролирующей системы перехода из метафазы в анафазу, мы исследовали изменение паттерна локализации и/или внутриклеточного уровня белков Cid, Mitch и Ndc80 в клетках с нокдауном по генам *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2*.

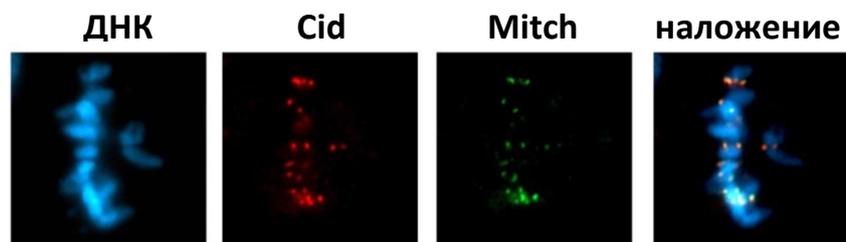


Рисунок 7. Локализация белков Cid и Mitch в контрольных клетках S2 *D. melanogaster*

Коровый центромерный белок Cid вовлечен в процесс формирования кинетохоров и визуализируется почти в 100% контрольных клеток на различных стадиях клеточного цикла (Рисунок 7, Таблица 6). Анализ цитологических препаратов после окрашивания антителами против белка Cid показал существенное снижение доли интерфазных клеток с сигналом этого центромерного компонента при дефиците белков *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2*. При этом в митотических клетках тех же образцов количество сигналов варьировало от 0 до 20 (в клетках S2 максимальное число сигналов может достигать 24). При РНК-интерференции генов *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2* доля клеток с условно отсутствующим сигналом (менее 10) существенно возрастает по сравнению с контролем (Таблица 6). Кроме того, интенсивность сигналов, полученных путем окрашивания антителами к белку Cid визуально ниже, чем в контрольных клетках. Эти данные согласуются с результатами вестерн-блот анализа, где количество белка Cid значительно снижено после каждого из нокдаунов (Рисунок 8).

Таблица 6. Распределение сигналов Cid и Mitch, выявленных путем окрашивания с использованием антител к этим белкам в интерфазных и митотических клетках, где (+) – доля клеток с условно положительным сигналом (более 9)

		Cid (+)			Mitch (+)	
		Интерфаза	Прометафаза	Метафаза	Прометафаза	Метафаза
Контроль		96%	68%	27%	62%	21%
РНК-интерференция	<i>Rcd1</i>	71,5%	46%	17%	45%	14%
	<i>Rcd5</i>	87%	47%	16%	48%	20%
	<i>MBD-R2</i>	61,5%	39%	16%	33%	10%

Белок Mitch – кинетохорный компонент, который локализован в непосредственной близости к белку Cid, выявляется в меньшей доле (около 90%) контрольных клеток. При цитологическом анализе контрольных и экспериментальных образцов также обнаружено визуальное снижение количества и интенсивности сигнала, полученного путем окрашивания антителами к белку Mitch после нокдауна генов *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2* (Таблица 6). Другой кинетохорный компонент – белок Ndc80 – принимает участие в присоединении МТ к кинетохорам, изменение его количества определяли методом вестерн-блот. Было установлено, что количество белка Ndc80 также значительно снижено после РНК-интерференции генов исследуемых белков (Рисунок 8). Таким образом, митотические дефекты, вызванные дефицитом

одного из компонентов комплекса NSL, в основном, являются следствием снижения количества белков митотического аппарата в клетках.

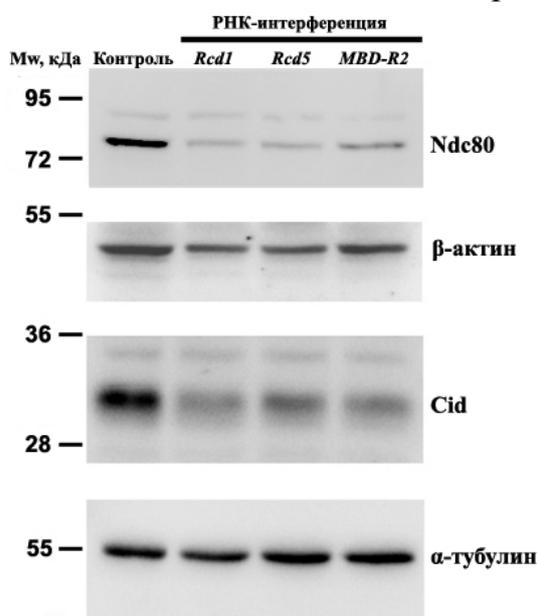


Рисунок 8. Изменение количества белков Cid и Ndc80 в контрольных и экспериментальных образцах, вестерн-блот анализ; β-актин и α-тубулин использовались в качестве контроля нагрузки общего белка на дорожку. Mw – молекулярный вес белков

Регуляция транскрипции centrosомных, центромерных и кинетохорных белков компонентами комплекса NSL

Тот факт, что белки Rcd1, Rcd5 и MBD-R2 локализуются в различных компартментах клетки во время митоза, и в то же время дефицит каждого из них приводит к схожим фенотипам, позволяет предположить, что исследуемые компоненты комплекса регулируют деление клеток дрозофилы на уровне транскрипции ключевых митотических генов или их взаиморегуляции. Эта гипотеза поддерживается предыдущими исследованиями, где авторы указывают на то, что компоненты комплекса NSL специфически связываются с промоторами генов домашнего хозяйства и активируют транскрипцию большинства из них ([Feller *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2012], Таблица 7).

Таблица 7. Связывание субъединиц комплекса NSL с промоторами указанных митотических генов и регуляция их экспрессии; значения в скобках - количество биологических повторов

Ген	Связывание с промоторами генов, согласно данным ChIP [Feller <i>et al.</i> , 2012]		Экспрессия генов после соответствующей РНКи (% от экспрессии в контроле)		
	Rcd1	MBD-R2	Rcd1	Rcd5	MBD-R2
<i>Cid</i>	+	+	54,2 (5)	50,8 (4)	47,7(4)
<i>Mis12</i>	+	+	20,9 (2)	26,8(2)	31,4 (2)
<i>Nnflb</i>	+	+	22,6 (2)	27,5 (2)	31,2 (2)
<i>Ndc80</i>	+	+	82,5 (3)	69,0 (3)	63,4 (2)
<i>Spc25 (Mitch)</i>	+	+	69,2 (5)	74,5 (4)	74,9 (4)
<i>Sas-4</i>	+	+	65,8 (2)	65,3 (3)	62,7 (2)
<i>Sas-6</i>	+	+	36,5(2)	39,8 (2)	22,7 (2)
<i>asl</i>	+	+	39,6 (2)	55,8 (3)	54,3 (2)

Настоящее исследование свидетельствует о том, что недостаток белка Rcd1, Rcd5 или MBD-R2 приводит к снижению транскрипции ряда генов (Таблица 7), вовлеченных в процессы сборки центромер и кинетохоров (*Cid*, *Mis12*, *Nnf1b*, *Ndc80*, *Mitch/Spc25*), а также дубликации центриолей (*Sas-4*, *Sas-6*, *asl*).

Согласно полученным результатам, митотические дефекты, вызванные дефицитом одного из исследуемых компонентов комплекса NSL, являются, в основном, следствием нарушения транскрипции генов, кодирующих основные компоненты митотического аппарата.

Влияние исследуемых белков Rcd1, Rcd5 и MBD-R2 на кинетохор-опосредованное формирование МТ

Исходя из данных, полученных в рамках настоящей работы, стало интересным исследовать влияние компонентов комплекса NSL на кинетохор-опосредованное формирование ВД после деполимеризации МТ. Несмотря на то, что обработка клеток холодом и использование митостатиков позволяют достигнуть максимальной деполимеризации МТ ВД и проанализировать повторный рост МТ, результаты, полученные при использовании этих методов, различаются.

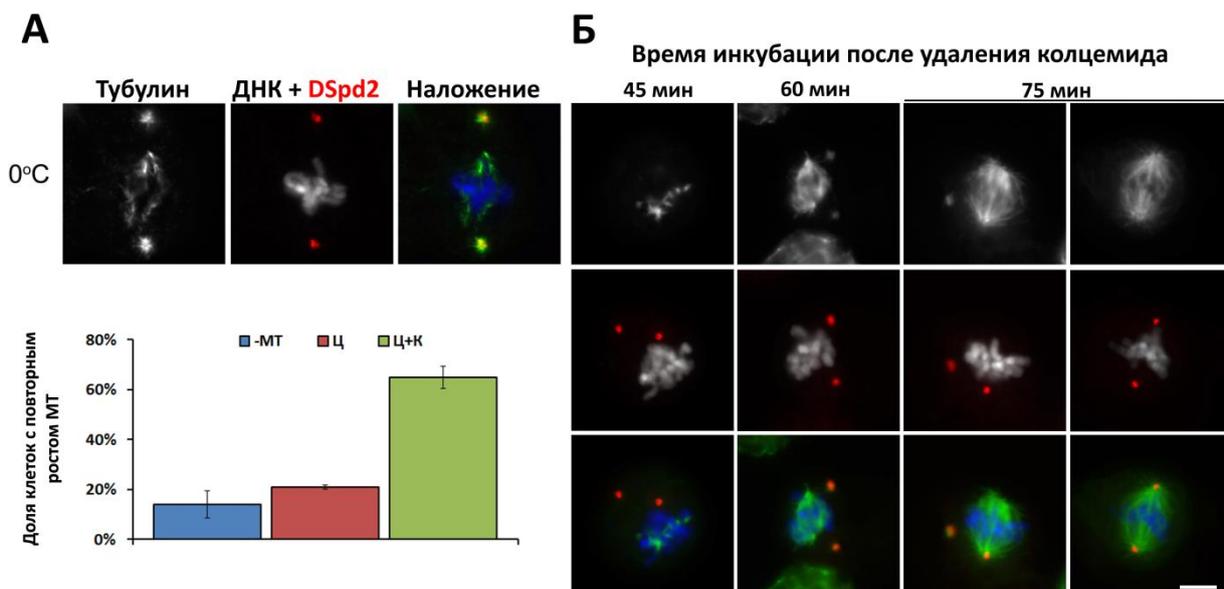


Рисунок 9. (А) Повторный рост МТ после холодной обработки клеток при 0°C; на графике представлены доли клеток, демонстрирующих отсутствие повторного роста (-МТ), повторный рост МТ только от centrosом (Ц) или от кинетохоров и centrosом (Ц+К) после обработки холодом (0°C); (Б) Повторный рост МТ от кинетохоров через 45, 60 и 75 минут после удаления колцемиды. Клетки окрашены на ДНК (DAPI, синий), DSpd2 (красный) и α -тубулин (зеленый). Шкала 5 мкм

Так, например, после инкубации клеток при 0°C в течение 3 часов повторный рост МТ наблюдался как от кинетохоров, так и от centrosом (60%) (Рисунок 9А). Обработка клеток митостатиком колцемидом, напротив, полностью блокирует способность centrosом образовывать МТ, но не оказывает влияния на кинетохор-зависимый рост МТ. Через 45 мин после удаления колцемиды повторно

формирующиеся МТ были обнаружены в области кинетохоров, а через 60 мин наблюдались уже сформированные пучки МТ, которые еще через 15 мин образовывали полюса анастральных ВД (Рисунок 9Б). Полное восстановление ВД после обработки холодом происходило в первые 3 мин после повышения температуры до 22°C, тогда как тот же самый процесс занимал около 75 мин после обработки колцемидом. Замедленное формирование МТ после обработки колцемидом и отсутствие астральных МТ позволило детально исследовать паттерн и скорость повторного роста МТ от кинетохоров.

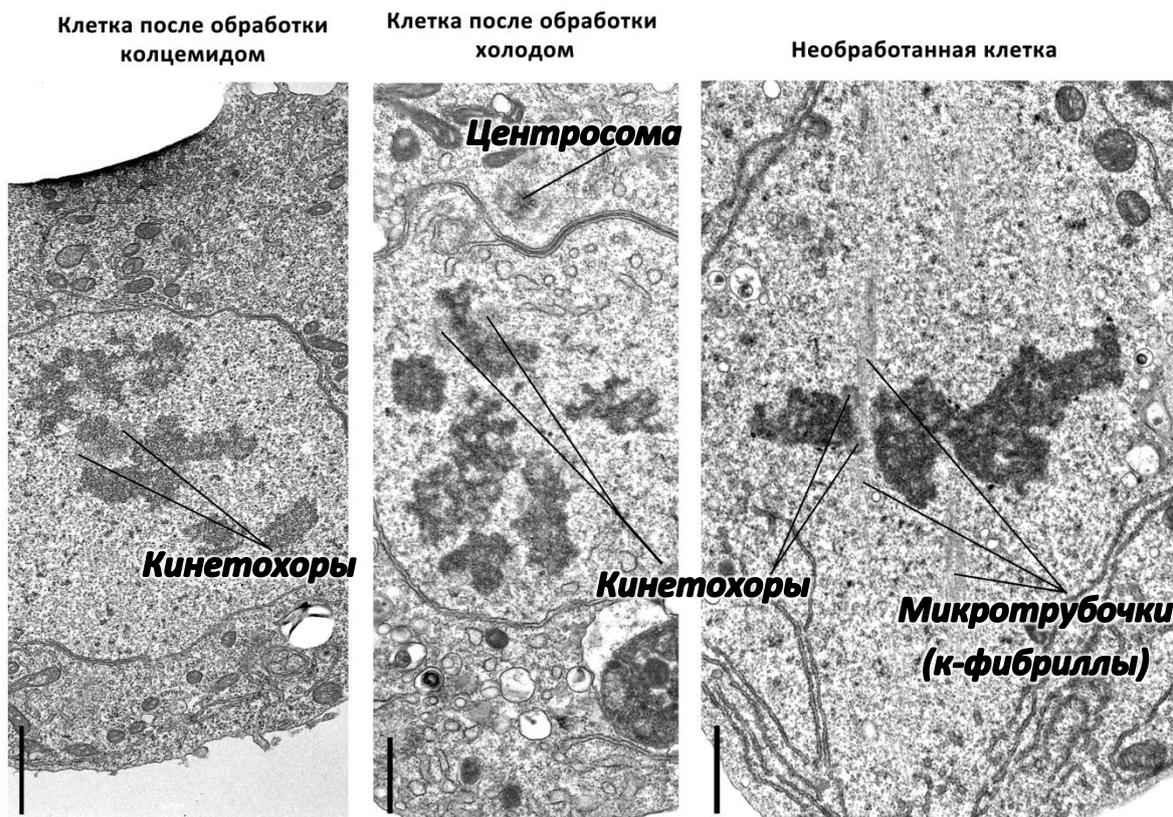


Рисунок 10. Электронные микрофотографии клеток S2 до и после обработки холодом/колцемидом в течение 3 часов, полученные методом трансмиссионной электронной микроскопии (любезно предоставлены А.А. Струновым, ИЦиГ СО РАН). Шкала 1 мкм

Ультраструктурный анализ клеток после обработки холодом и колцемидом показал, что подобранные нами условия деполимеризации для последующего исследования повторного роста МТ от кинетохоров являются оптимальными. На рисунке 10 представлены мета/прометафазы после обработки холодом или колцемидом, в которых полностью отсутствуют МТ или пучки МТ, образованных кинетохорами, которые формируются в необработанных митотических клетках. Соответственно, для определения влияния белков Rcd1, Rcd5 и MBD-R2 на кинетохоропосредованное формирование ВД наиболее подходящим методом явилась обработка клеток колцемидом с последующим анализом повторного роста МТ.

Для более корректного анализа экспериментальные данные были нормированы на соответствующие контрольные значения в каждой временной точке, принятые за 100%. На рисунке 11 показано, что при РНК-интерференции каждого из исследуемых генов скорость повторного роста МТ снижена через 30 мин после удаления митостатика из среды, что демонстрируется меньшей долей клеток с выявленными кинетохорными МТ (60-70% относительно 100% в контроле).

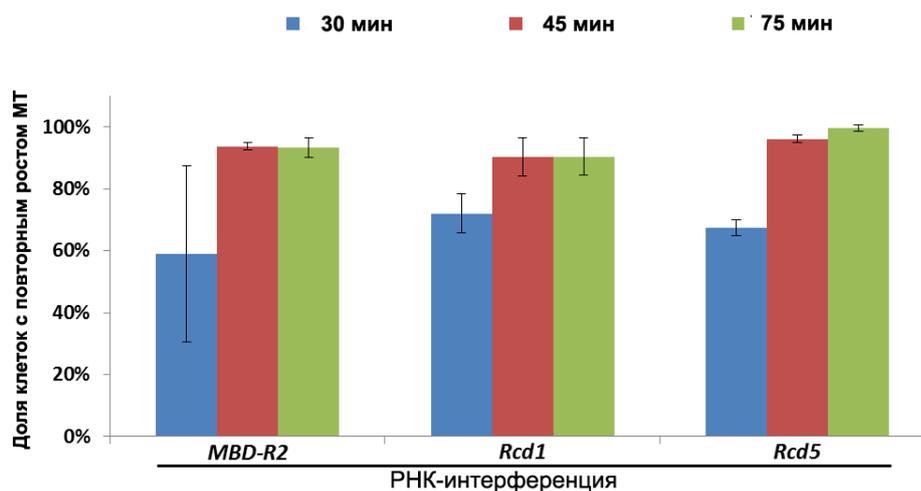


Рисунок 11. Динамика повторного роста кинетохорных МТ в клетках с нокаутом генов *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2* после обработки колцемидом в течение 3 часов и отмывки митостатика. На графике представлены средние значения трех независимых экспериментов, нормированные относительно соответствующего контроля, принятого за 100%

Для определения влияния белков комплекса NSL на полимеризацию МТ, а именно на включение субъединиц тубулина, измеряли интенсивность флуоресценции растущих МТ в процессе повторного роста. Поскольку через 30 мин после удаления колцемиды выявляются наибольшие различия между экспериментальными и контрольными данными, именно эта временная точка была выбрана для измерения флуоресценции растущих МТ. Дальнейший анализ показал, что во всех экспериментальных образцах интенсивность флуоресценции также снижена и составляет $0,64 \pm 0,24$, $0,81 \pm 0,3$ и $0,61 \pm 0,06$ о.е. при нокауне генов *MBD-R2*, *Rcd1* и *Rcd5*, соответственно. Однако через 45 и 75 мин образование МТ происходит в более чем 90% клеток (Рисунок 11), что свидетельствует о частичной блокировке формирования кинетохорных МТ на ранних этапах. Таким образом, несмотря на описанные выше митотические нарушения, клетки с дефицитом компонентов комплекса NSL сохраняют способность полностью восстанавливать ВД посредством кинетохорных МТ.

Заключение. Рост и развитие всех эукариотических организмов зависит от равномерного распределения хромосом. Во время митоза реплицированные хромосомы разделяются таким образом, чтобы каждая дочерняя клетка содержала одну копию генома. Веретено деления обеспечивает корректное расхождение

сестринских хроматид, стабилизируя взаимодействие последних с микротрубочками. Исследования, направленные на изучение механизмов регуляции митотических процессов, позволили выявить множество белков, необходимых на различных стадиях митоза. В последнее время большое внимание уделяется хроматиновым белкам, большинство из которых регулируют транскрипцию различных генов в интерфазе. Однако при входе клетки в митотический цикл некоторые транскрипционные факторы перемещаются в такие ключевые структуры митотического аппарата, как ВД, centrosомы, центромеры и кинетохоры. В литературных данных отмечено, что ряд компонентов комплекса KANSL/NSL могут выполнять специфические функции в митозе, не связанные с регуляцией транскрипции [Somma *et al.*, 2008; Dobbelaere *et al.*, 2008].

Настоящая работа посвящена детальному исследованию компонентов комплекса NSL, белков Rcd1, Rcd5 и MBD-R2, в митозе *D. melanogaster*. В рамках исследования описана локализация каждого из указанных белков на каждой стадии митоза. Белки Rcd1 и Rcd5 ассоциированы с centrosомами на стадиях промета- и метафазы, а затем на стадии телофазы оба компонента комплекса NSL диссоциируют в центральную область борозды деления. Белок MBD-R2, напротив, остается связанным с хромосомами на протяжении митотического цикла.

Характеристика митотического фенотипа при дефиците белков Rcd1, Rcd5 и MBD-R2 выявила множество дефектов, сходных между собой. А именно, нокдаун исследуемых генов привел к некорректному разделению и расхождению сестринских хроматид и задержке митоза на стадии анафазы. Дальнейший анализ показал, что указанные митотические дефекты после нокдауна генов *Rcd1*, *Rcd5* и *MBD-R2* являются следствием подавления транскрипции генов, кодирующих центромерные и кинетохорные компоненты.

Результаты настоящего исследования также свидетельствуют о том, что дефицит исследуемых компонентов комплекса NSL негативно влияет на формирование centrosом посредством подавления экспрессии генов, кодирующих компоненты центриолей. В совокупности, данные, полученные в текущей работе, предполагают наличие ранее неизвестных функций комплекса NSL в митозе *D. melanogaster* и являются основой для дальнейшего изучения данного аспекта. Поскольку компоненты комплекса NSL консервативны у большинства организмов, результаты работы могут расширить представление о функционировании комплекса KANSL у человека.

ВЫВОДЫ

1. Дефицит белков MBD-R2, Rcd1 и Rcd5 приводит к дефектам митоза на этапе деления и расхождения сестринских хроматид и неспособности клеток S2

D. melanogaster переходить на стадию анафазы. Выявленные нарушения происходят за счет снижения количества центромерного компонента Cid, белка Mitch в области кинетохоров и внутриклеточного уровня кинетохорного белка Ndc80. Обнаружены ошибки в процессе дубликации центриолей, что приводит к изменению числа centrosом или их фрагментации.

2. Выявлено подавление экспрессии генов, кодирующих центромерные, кинетохорные и centrosомные компоненты, при нокадауне генов *MBD-R2*, *Rcd1* и *Rcd5*, что объясняет снижение количества или изменения в характере распределения соответствующих белковых продуктов.
3. Снижение экспрессии генов *MBD-R2*, *Rcd1* и *Rcd5* приводит к замедлению повторного роста микротрубочек от кинетохоров после обработки колцемидом. Однако клетки с дефицитом продуктов указанных генов не полностью утрачивают способность формировать веретено деления, вероятно, за счет остаточной экспрессии генов, кодирующих центромерные и кинетохорные белки.
4. Белки *Rcd1* и *Rcd5* локализуются в области centrosом и борозды деления, тогда как белок *MBD-R2* ассоциирован с хромосомами. Различная локализация исследованных белков в митозе может свидетельствовать о прямых митотических функциях отдельных компонентов транскрипционного комплекса NSL.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

По результатам работы опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. **Pavlova G.A.**, Galimova Y.A., Popova Y.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. – P. 299–303.
2. **Pavlova G.A.**, Popova J.V., Andreyeva E.N., Yarinich L.A., Lebedev M.O., Razuvaeva A.V., Dubatolova T.D., Oshchepkova A.L., Pellacani C., Somma M.P., Pindyurin A.V., Gatti M. RNAi-mediated depletion of the NSL complex subunits leads to abnormal chromosome segregation and defective centrosome duplication in *Drosophila* mitosis // PLOS Genetics. – 2019. – V. 15. – P.e1008371.
3. Strunov A., Boldyreva L.V., Andreyeva E.N., **Pavlova G.A.**, Popova J.V., Razuvaeva A.V., Anders A.F., Renda F., Pindyurin A.V., Gatti M., Kiseleva E. Ultrastructural analysis of mitotic *Drosophila* S2 cells identifies distinctive microtubule and intracellular membrane behaviors // BMC Biology. – 2018. – V. 16. – P. 68.

4. 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.

Публикации по материалам конференций:

1. **Павлова ГА**, Попова ЮВ, Мунзарова АФ, Галимова ЮА, Разуваева АВ, Ренда Ф, Сомма МП, Пиндюрин АВ, Гатти М. Факторы, обуславливающие характер повторного роста микротрубочек веретена деления после деполимеризации тубулина у *Drosophila melanogaster*// *Acta Naturae*. – 2016. – V. S-2. – С. 70.
2. **Pavlova G.**, Popova J., Munzarova A., Galimova J., Razuvaeva A., Renda F., Somma P. Pindyurin A., Gatti M. Genetic dissection of kinetochore-driven microtubule formation during *Drosophila* spindle assembly// Сборник материалов «Italian *Drosophila* Research Conference». 14-16 September 2016 , Bologna, Italy. – P. 45.
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 второй международной научной конференции «Наука будущего», 20-23 сентября 2016 г., Казань, Россия. – С. 274.
4. **Pavlova G.**, Popova J., Munzarova A., Galimova J., Razuvaeva A., Renda F., Somma P. Pindyurin A., Gatti M. The mechanisms of *Drosophila* spindle assembly: The role of kinetochore-driven microtubule formation // Сборник тезисов второй международной научной конференции «Наука будущего», 20-23 сентября 2016 г., Казань, Россия. – С. 233.
5. Попова Ю.В., **Павлова Г.А.**, Разуваева А.В., Невзорова Т.А., Пиндюрин А.В., Гатти М. Участие компонентов комплекса NSL в делении культивируемых клеток *Drosophila*. Материалы международной конференции «Беляевские чтения», 7-10 августа 2017 г., Новосибирск, Россия. – С. 107.
6. **Pavlova GA**, Popova JV, Andreyeva EN, Yarinich LA, Lebedev MO, Razuvaeva AV, Dubatolova TD, Alekseeva AL, Pellacani C, Somma MP, Pindyurin AV, Gatti M. Roles of *Drosophila* NSL complex components in mitosis // Материалы международной конференции "Хромосома 2018", 20-24 августа 2018 г., Новосибирск, Россия. – С. 57-58.
7. **Pavlova GA**, Popova JV, Andreyeva EN, Yarinich LA, Lebedev MO, Razuvaeva AV, Dubatolova TD, Oshchepkova AL, Pellacani C, Somma MP, Pindyurin AV, Gatti M. Multiple function of the NSL complex subunits in *Drosophila* mitosis / *Acta Naturae*. – 2019. – V. S-2. – С. 95.