

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЦЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ЦТП ФХФ РАН)

УДК 577.3.01 577.38 577.3:51-76
Per. N НИОКТР АААА-А17-117112470049-3
Per. N ИКРБС

УТВЕРЖДАЮ
И.О. директора ЦТП ФХФ РАН
д.ф.н., проф. физ.-мат. наук
М.А. Пантелеев
2018 г.



ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная
биология и постгеномные технологии»

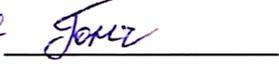
**СОЗДАНИЕ НАУЧНОЙ ГРУППЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ МИТОЗА
(промежуточный, этап 1)**

Руководитель НИР,
канд. биол. наук,


А.В. Зайцев

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, канд.биол.наук	27.12.18		А.В. Зайцев (введение, заключение)
Ответственный исполнитель, канд.физ.-мат.наук	27.12.18		Н.Б. Гудимчук (введение, нормоконтроль)
Исполнители:			
Мл.научн.сотр.	28.12.18		Д.С. Виноградов (раздел 1)
Мл.научн.сотр.	28.12.18		М.Г. Годзи (раздел 1)
Мл.научн.сотр.	27.12.2018		И.В. Гончар (раздел 1)
Научн.сотр., канд.биол.наук	28.12.18		Д.Ю. Нечипуренко (раздел 1)

Отчет 11 с., 1 кн., 1 рис., 6 источн.

КИНЕТОХОР, АВРОРА В, МИКРОТРУБОЧКА, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ
МОДЕЛИРОВАНИЕ, ДЕЛЕНИЕ КЛЕТКИ

Объект исследования – кинетохор.

Предлагаемая к созданию научная группа поставила перед собой цель исследовать молекулярные механизмы митоза. В рамках реализации данной цели научная группа выполняет работу по трем направлениям:

1. Исследование механизмов закреплений хромосом за микротрубочки веретена деления.
2. Исследование механизмов коррекции ошибочных закреплений.
3. Исследования механизмов доставки хромосом в экваториальную плоскость веретена деления клетки во время прохождения прометафазы.

Основные научные результаты:

- 1 Создана конструкция Авроры В, обладающая SNAP-tag.
- 2 Разработана математическая модель, описывающая систему реакций Аврора В – фосфатаза в пространстве.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ	2
СОДЕРЖАНИЕ	4
ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	8
1. Исследование градиента активности Авроры В.....	8
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	10
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	11

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

NDC-80 - белок кинетохора NDC80 гомолог (англ. Kinetochore protein NDC80 homolog)

SNAP-tag – представляет собой самомаркирующуюся белковую метку, коммерчески доступную в различных векторах экспрессии.

ВВЕДЕНИЕ

Аврора В, компонент хромосомального пассажирского комплекса (ХПК), является одной из необходимых клеточных киназ. Аврора В регулирует деление клетки: первоначально она локализуется на внутреннем центромере и, в дальнейшем, в центральной зоне веретена в анафазе. Аврора В способна фосфорилировать субстраты, которые находятся на значительном расстоянии от её основных сайтов связывания. В анафазе далеко распространяющийся градиент фосфорилирования формируется вокруг центральной зоны веретена, но простирается далеко за основные сайты локализации киназы. В метафазе наблюдается, фосфорилирование снижено на субстратах, расположенных дальше от сайтов связывания Авроры В, что также указывает на существование градиента активности Авроры В. Для объяснения механизмов такого сложного поведения этой киназы привлекались различные модели, однако ни одна из них не получила достаточно хорошего экспериментального подтверждения.

На данный момент в области существуют две гипотезы о механизме избирательной регуляции NDC80 киназой Авроры В. Первый механизм исходит из расположения киназы в центромерном регионе хромосомы на длинном линкере, образованном белками комплекса СРС, в состав которого она входит. При натяжении со стороны корректно закрепленной микротрубочки, NDC80 выходит из области, куда дотягивается киназа, ограниченная длиной линкера. Второй механизм регуляции подразумевает образование градиента киназной активности в системе, где присутствуют растворенная в цитоплазме и связанная в центромерном регионе киназа, а также противодействующая ей растворенная фосфатаза. Этот градиент активности имеет пик в центромерном регионе между сестринскими хромосомами, соответственно корректные закрепления, через натяжения выводят NDC80 из зоны высокой активности Авроры В, уменьшая его фосфорилирование и усиливая силу закреплений. На сегодняшний день обе гипотезы каждого из механизмов имеют определенные доводы в свою пользу, в том числе и в моих работах, однако прямая проверка этих гипотез до сих пор отсутствует. Предлагаемое экспериментальное исследование позволит однозначно прямым экспериментом проверить гипотезы о роли каждого из механизмов и описать количественного вклад каждого из них. Кроме этого смогут быть изучены возможные дополнительные механизмы пространственной регуляции NDC80

киназой Авроры В, такие как предполагаемая роль связывание и диффузии комплекса СРС с Авророй В по микротрубочкам.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Исследование градиента активности Авроры В

Одной из важнейших проблем митоза является выяснение механизма создания пространственного градиента активности киназы Aurora В в области кинетохора хромосомы в метафазе митоза. Согласно существующим представлениям, этот градиент обеспечивает избирательную стабилизацию корректных закреплений микротрубочек за хромосому и дестабилизирует прочие, что делает его критически важной частью механизма исправления ошибок.

Первый год проекта был посвящен двум задачам:

(1) созданию генноинженерной конструкции Авроры В, максимально соответствующей задаче реконструкции *in vitro* системы белков, обеспечивающих формирование градиента активности Авроры В;

(2) разработке количественной математической модели системы реакций, обеспечивающих формирование градиента Авроры В.

В ходе выполнения проекта в 2018 году была создана конструкция Авроры В, обладающая SNAP тагом. Белок успешно экспрессируется в *E. Coli* и обладает достаточной активностью по отношению к синтетическим субстратам, а также способностью к автоактивации. Это позволило нам иммобилизовать фермент на полистироловых шариках. Идет подбор наиболее подходящего геля, который позволит имитировать центрмерную зону кинетохора для иммобилизации на нем формирования градиента.

Кроме этого, была разработана математическая модель, описывающая систему реакций Аврора В – фосфатаза в пространстве. Модель учитывает кинетику реакций автоактивации Авроры В, ее связывания в пространственно распределенной сети, реакции дефосфорилирования фосфатазой. Модель позволила количественно описать образование градиента активности Авроры В с параметрами, близкими к наблюдаемым в экспериментах на культурах клеток (Рис. 1).

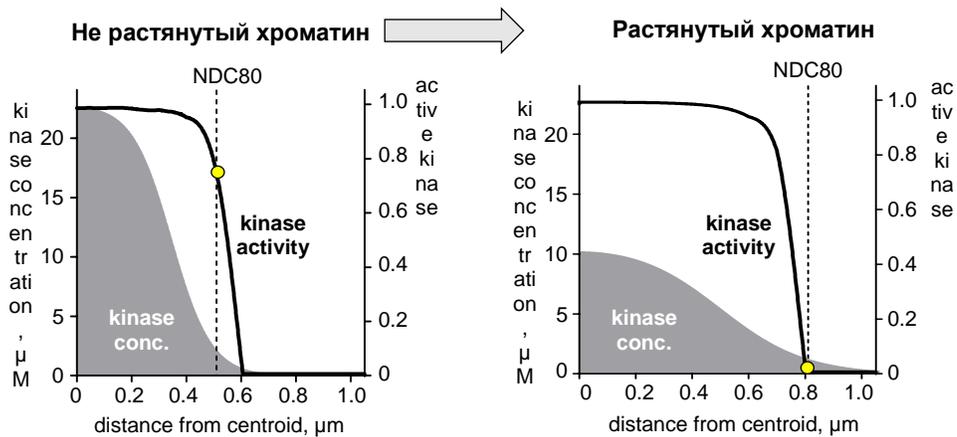


Рис. 1. Распределение активности киназы Аврора В вдоль оси веретена. Серая зона показывает распределение концентрации Авроры В, черная кривая – распределение активности Авроры В. Видно, что градиент активности киназы гораздо круче градиента ее концентрации. Пунктиром показана локализация главной мишени киназы в митозе – белка NDC-80. Слева показана ситуация, когда между сестринскими хромосомами нет натяжения, что имеет место при наличии неправильно закрепленных микротрубочек. В этом случае NDC-80 находится в зоне высокой активности киназы и должен быть фосфорилирован. Это сильно ослабляет его взаимодействие с микротрубочками, что приводит к их откреплению. Справа показана ситуация, когда все неправильно закрепленные микротрубочки открепились и область, связывающая сестринские хромосомы растянулась. Расстояние от центра между хромосомами увеличилось как до NDC-80, так и до местоположения градиента. Но градиент сдвинулся меньше, так что NDC-80 оказался в зоне низкой активности Авроры. В результате этого фосфатаза дефосфорилирует NDC-80, что сильно стабилизирует его связывание с микротрубочками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- 1 Создана конструкция Авроры В, обладающая SNAP тагом.
- 2 Разработана математическая модель, описывающая систему реакций Аврора В – фосфатаза в пространстве.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Tan L, Kapoor TM. Examining the dynamics of chromosomal passenger complex (CPC)-dependent phosphorylation during cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 4;108(40):16675-80.
2. Keating P1, Rachidi N, Tanaka TU, Stark MJ. Ipl1-dependent phosphorylation of Dam1 is reduced by tension applied on kinetochores. *J Cell Sci*. 2009 Dec 1;122(Pt 23):4375-82.
3. He J, Liu X, Ding Y, Yu C, Weng Y, Chen X, Gao R, Wang Y. An improved method for staining kinetochores of human chromosomes. *Indian J Exp Biol*. 2009 May;47(5):376-8.
4. Welburn JP1, Vleugel M, Liu D, Yates JR 3rd, Lampson MA, Fukagawa T, Cheeseman IM.
5. Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell*. 2010 May 14;38(3):383-92.
6. DeLuca KF, Lens SM, DeLuca JG. Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis. *J Cell Sci*. 2011 Feb 15;124(Pt 4):622-34.