

Деплеция нуклеопорина Elys не приводит к нарушению клеточного цикла в клетках S2 дрозофилы

Симонов Р.А., Михалева Е.А., Иванникова А.Я., Шевелев Ю.Я.*

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

* shevelev@img.ras.ru

Ключевые слова: нуклеопорин; Elys; кинетохор; клеточный цикл; дрозофила

Мотивация и цель: Компонент комплексов ядерных пор (КЯП) нуклеопорин Elys является ключевым фактором, определяющим сборку КЯП на выходе из митоза в многоклеточных организмах [1–4]. У млекопитающих, ксенопуса и нематоды во время митоза фракция Elys локализуется на кинетохорах [1, 2, 5, 6]. В соответствии с этим, деплеция Elys у этих организмов приводит к митотическим дефектам и задержке в прохождении клеточного цикла [1, 5, 6]. Однако в работе [7] было обнаружено, что в ходе митоза у дрозофилы Elys отсутствует на кинетохорах. В этой связи возникал вопрос, влияет ли деплеция Elys на клеточный цикл в клетках дрозофилы.

Методы и алгоритмы: 1.5×10^6 клеток S2 были собраны, дважды сполоснуты в PBS, зафиксированы холодным 70 % этанолом в течение 30 мин при 4 °C и промыты дважды в PBS. Клетки инкубировали 30 мин при 37 °C в 50 мкл PBS, содержащего 100 мкг/мл РНКазы А. Затем клетки инкубировали 10 мин при комнатной температуре в 250 мкл PBS, содержащего 40 мкг/мл пропидиум йодида. После этого с использованием проточного цитофлуориметра BD Accuri™ C6 Plus определяли долю клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, у примерно 10^4 контрольных клеток и клеток после нокдауна Elys. Перед процедурой цитофлуориметр калибровали на необработанных клетках S2.

Результаты: Сначала мы подтвердили, что Elys не локализуется на кинетохорах во время митоза у дрозофилы. Иммуноокрашивание клеток S2 антителами против Elys, против α -тубулина и против CenpA (последние антитела выявляют центромеры) показало, что во время метафазы Elys диффузно распределяется вокруг конденсированных хромосом, но отсутствует на кинетохорах. Затем мы провели проточный цитофлуориметрический анализ клеточного цикла в контрольных клетках S2 и в клетках S2 после нокдауна Elys. Эффективный нокдаун Elys в клетках S2 достигался методом РНК-интерференции. В результате мы обнаружили лишь незначительные изменения (если они вообще были) в прохождении клеточного цикла после нокдауна Elys в клетках S2 (рис. 1).

Выводы: Наши результаты показывают, что, в отличие от других организмов, в клетках S2 дрозофилы Elys не присутствует на кинетохорах во время митоза и его деплеция не приводит к нарушению клеточного цикла. Иными словами, существует четкая корреляция между наличием либо отсутствием Elys на кинетохорах в ряде организмов и аномальным либо нормальным митозом после деплеции Elys в этих организмах. На основании этого мы предполагаем, что Elys не влияет на митоз у дрозофилы по причине того, что он не связан с кинетохорами в этом организме.

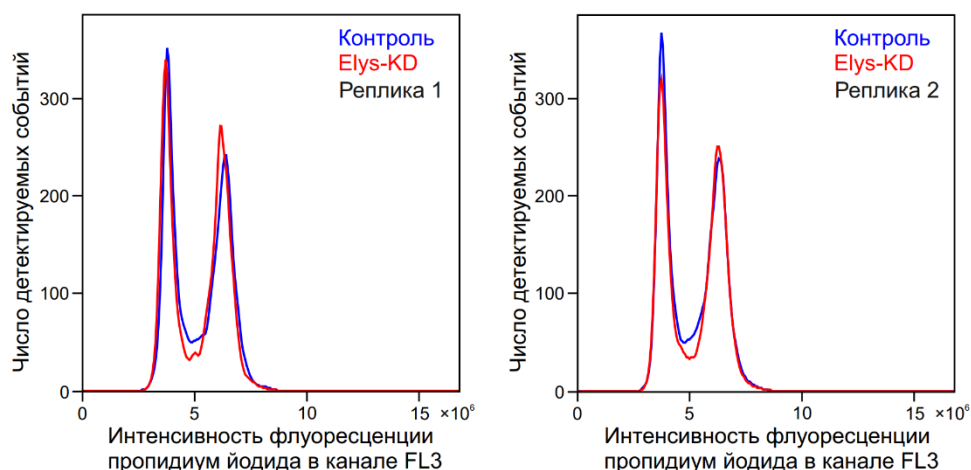


Рис. 1. Цитофлуориметрический анализ контрольных клеток S2 (синяя кривая) и клеток S2 после нокдауна Elys (красная кривая), ДНК которых была окрашена пропидиум йодидом. Показаны результаты для двух реплик. Пики, соответствующие клеткам до и после репликации, в контроле и опыте практически не отличаются

Финансирование: Исследование выполнено в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Depletion of nucleoporin Elys does not result in cell cycle defects in *Drosophila* S2 cells

Simonov R.A., Mikhaleva E.A., Ivannikova A.Y., Shevelyov Y.Y.*

National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

* shevelev@img.ras.ru

Key words: nucleoporin; Elys; kinetochore; cell cycle; *Drosophila*

Motivation and Aim: Nucleoporin Elys, the constituent of nuclear pore complexes (NPCs), is a key factor determining NPC reassembly upon mitotic exit in multicellular organisms [1–4]. In mammals, *Xenopus* and nematode, a fraction of Elys is localized on kinetochores during mitosis [1, 2, 5, 6]. Accordingly, depletion of Elys in these organisms results in mitotic defects and in the delay of cell cycle progression [1, 5, 6]. However, Mehta et al. [7] revealed that, in *Drosophila*, Elys is absent on kinetochores during mitosis. Therefore, the question arises whether Elys depletion affects cell cycle progression in *Drosophila* cells.

Methods and Algorithms: Approximately 1.5×10^6 S2 cells were collected, rinsed twice in PBS, fixed with 70 % cold ethanol for 30 min at 4 °C and washed twice in PBS. Cells were incubated in 50 μ l of PBS containing 100 μ g/ml RNase A for 30 min at 37 °C. Then, cells were incubated in 250 μ l of PBS containing 40 μ g/ml propidium iodide for 10 min at room temperature. After that, the ratio of control and Elys-KD cells in different phases of cell cycle was analyzed for $\sim 10^4$ single cells using BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer which has been calibrated on the untreated S2 cells.

Results: We first confirmed that Elys does not localize at kinetochores during mitosis in *Drosophila*. Immunostaining of S2 cells with anti-Elys, anti- α -tubulin and anti-CenpA

antibodies (the latter reveal the centromeres) has shown that, during metaphase, Elys is diffusely distributed around condensed chromosomes, and is absent on kinetochores. Next, we performed flow cytometry analysis of cell cycle progression in control S2 cells and in S2 cells after *Elys* knockdown. Efficient *Elys* knockdown in S2 cells was achieved by applying RNA-interference technique. As a result, we found only minor changes (if any) in cell cycle progression upon *Elys* knockdown in S2 cells (Fig. 1).

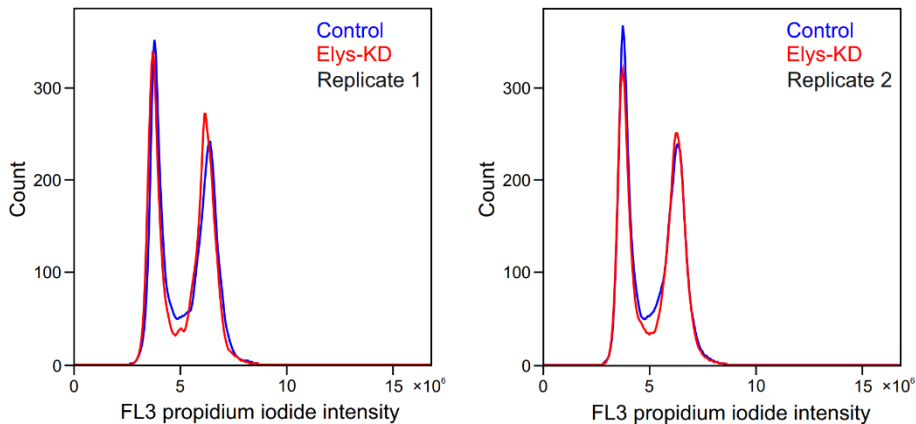


Fig. 1. Flow cytometry analysis of control (blue curve) and Elys-KD (red curve) S2 cells after DNA staining with propidium iodide. Two replicates are indicated. The peaks corresponding to cells before and after replication are practically the same in the control and after Elys-KD

Conclusion: Our results indicate that, unlike in other organisms, in *Drosophila* S2 cells Elys does not stay at kinetochores during mitosis and its depletion does not lead to the disturbance of cell cycle progression. In other words, there is a clear correlation between Elys presence or absence on kinetochores in the organisms and abnormal or normal mitosis upon Elys depletion in these organisms. We, therefore, suggest that *Drosophila* Elys does not affect mitosis because it is not bound with kinetochores in this organism.

Funding: The study was carried out within the framework of the state task of NRC “Kurchatov Institute”.

Список литературы/References

1. Rasala B.A., Orjalo A.V., Shen Z., Briggs S., Forbes D.J. ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:17801-17806. doi 10.1073/pnas.0608484103
2. Franz C., Walczak R., Yavuz S., Santarella R., Gentzel M., Askjaer P., Galy V., Hetzer M., Mattaj I.W., Antonin W. MEL-28/ELYS is required for the recruitment of nucleoporins to chromatin and postmitotic nuclear pore complex assembly. *EMBO Rep*. 2007;8:165-172. doi 10.1038/sj.embor.7400889
3. Gillespie P.J., Khoudoli G.A., Stewart G., Swedlow J.R., Blow J.J. ELYS/MEL-28 chromatin association coordinates nuclear pore complex assembly and replication licensing. *Curr Biol*. 2007;17:1657-1662. doi 10.1016/j.cub.2007.08.041
4. Rasala B.A., Ramos C., Harel A., Forbes D.J. Capture of AT-rich chromatin by ELYS recruits POM121 and NDC1 to initiate nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell*. 2008;19:3982-3996. doi 10.1091/mbc.e08-01-0012
5. Fernandez A.G., Piano F. MEL-28 is downstream of the Ran cycle and is required for nuclear-envelope function and chromatin maintenance. *Curr Biol*. 2006;16:1757-1763. doi 10.1016/j.cub.2006.07.071
6. Galy V., Askjaer P., Franz C., López-Iglesias C., Mattaj I.W. MEL-28, a novel nuclear-envelope and kinetochore protein essential for zygotic nuclear-envelope assembly in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2006;16:1748-1756. doi 10.1016/j.cub.2006.06.067
7. Mehta S.J.K., Kumar V., Mishra R.K. *Drosophila* ELYS regulates Dorsal dynamics during development. *J Biol Chem*. 2020;295:2421-2437. doi 10.1074/jbc.RA119.009451