

# Changes in valve morphogenesis of *Aulacoseira islandica* by $\gamma$ -tubulin inhibitor gatastatin

Bedoshvili Ye.D.\*, Bayramova E.M., Zakharova Yu.R.

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** Diatom valve morphogenesis occurs under the control of microtubules. It is known that  $\gamma$ -tubulin is an important component of the microtubule center, which controls the polymerization of microtubules and provides their nucleation in the cell. In this work, using *Aulacoseira islandica* as an example,  $\alpha$ -tubulin was visualized during valve formation after cytokinesis and during interphase. It was shown that inhibition of  $\gamma$ -tubulin in *A. islandica* cells causes the formation of valves with an abnormal structure and an increased number of death cells in culture at gatastatin concentrations of 3 and 10  $\mu$ M, with a threefold decrease in the number of dividing cells. The small number of valves formed under the influence of gatastatin suggests that  $\gamma$ -tubulin activity is required both for the nucleation of microtubules in the cell and for the onset of valve morphogenesis. The results obtained clarify the role of the microtubule center in the morphogenesis of diatom valves.

**Keywords:** cytoskeleton, valve morphogenesis, gatastatin,  $\gamma$ -tubulin

## 1. Introduction

Diatoms are unicell eukaryotes belonging to the kingdom Chromista (Cavalier-Smith, 2018); the morphology of their silica frustules is widely various (Round et al., 1990). Diatom systematics are based on the frustule structure and phylogeny of marker genes such as *18S rRNA* and *rbcL* (Medlin and Kaczmarska, 2004; Theriot et al., 2010). Silica frustules consist of two valves and a ring of several overlapping girdle bands (Pickett-Heaps et al., 1990). Frustule details are synthesized sequentially during the cell cycle; after mitosis, valve morphogenesis occurs and girdle bands are formed throughout interphase.

The efforts of many researchers are aimed at searching for genetic and cell mechanisms providing species specific differences in diatom frustule symmetry and structure. It is known that valve morphogenesis is under cytoskeleton control, and the microtubule role is the most studied (Tesson and Hildebrand, 2010; Bedoshvili and Likhoshway, 2021). The correct functioning of microtubules is based on the dynamic polymerization/depolymerization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin (Mitchison and Kirschner, 1984; Caudron et al., 2005). It was shown that treatment of diatom cells with microtubule inhibitors led to various valve anomalies (Oey and Schnepf, 1970; Cohn et al., 1989; Van de Meene and Pickett-Heaps, 2002; Van de Meene

and Pickett-Heaps, 2004; Kharitonenko et al., 2015; Bedoshvili et al., 2018). It was shown that colchicine can stop nucleus division; however, for some species, valve morphogenesis still occurred; thus, under the influence of colchicine, the cells of centric *Cyclotella cryptica* and *Aulacoseira islandica* (Oey and Schnepf, 1970; Bedoshvili et al., 2018) formed “lateral” valves whose morphology was similar to that of normal valves, but their only face surface was adjacent to mature girdle bands. It is supposed that such morphology is possible when microtubules disrupt under the colchicine influence at the mitosis beginning (Bedoshvili et al., 2018). Due to the disruption of karyokinesis and cytokinesis after colchicine treatment, cells with lateral valve formation have a single irregularly shaped nucleus.

The microtubule formation (nucleation) does not occur randomly in the cells; there are specialized nucleation sites, mostly in the Microtubule Organizing Center (MTOC). Diatoms have a specific acentriolar MTOC with atypical features (De Martino et al., 2009). There are variations in the MTOC morphology; however,  $\gamma$ -tubulin underlies all these structures forming large complexes with other proteins (Zheng et al., 1995; Oegema et al., 1999). These complexes do not include  $\alpha$ - or  $\beta$ -tubulins, and  $\gamma$ -tubulin is an essential condition for microtubule nucleation. Earlier, it was shown that diatom genomes contain  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -tubulins (De Martino et al., 2009; Aumeier, 2012;

\*Corresponding author.

E-mail address: [bedoshvilied@list.ru](mailto:bedoshvilied@list.ru) (Ye.D. Bedoshvili)

**Received:** November 27, 2023; **Accepted:** December 11, 2023;

**Available online:** December 13, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Findeisen et al., 2014). More detailed analysis allows to identify structural features of the predicted amino acid sequences of diatom  $\gamma$ -tubulin (Khabudaev et al., 2022), but its significance for silica valve morphogenesis was not shown.

Gatastatin is a recently synthesized anti-cancer drug, which is able to bind with  $\gamma$ -tubulin and block microtubule nucleation without influencing  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin (Hayakawa et al., 2012). The use of gatastatin makes it possible to demonstrate the role of  $\gamma$ -tubulin in the diatom valve morphogenesis. The freshwater diatom *Aulacoseira islandica* turned out to be a convenient model for studying abnormal valve morphology due to its valve with a high mantle and large girdle bands. The main purpose of this study was to study  $\gamma$ -tubulin role in the valve morphogenesis of *Aulacoseira islandica*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cultivation

The *Aulacoseira islandica* Mr553 strain was isolated from a natural population in Lake Baikal and cultivated in the DM medium (Thompson et al., 1988) at 4°C with natural light and a day–night cycle. The procedure of isolation and cultivation were made according to the protocol described earlier (Zakharova et al., 2020).

### 2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

The frustules were cleaned according to the previously described protocol (Kharitonenko et al., 2015). Suspensions of cleaned frustules were pipetted onto cover glasses, dried, and mounted on SEM stubs with carbon double-sided adhesive tape (SPI Supplies, West Chester, USA). Morphological analysis among the 200 frustules encountered was carried out using a QUANTA 200 scanning electron microscope (FEI Company, Hillsboro, USA).

### 2.3. Gatastatin treatment

The *Aulacoseira islandica* culture was incubated for 48 hours in the presence of gatastatin at concentrations selected according to literature data and manufacturer's recommendations (10, 3, 0.3, and 0.03  $\mu$ M) and in the presence of PDMPO (Thermo Fisher Scientific, USA) to visualize the forming silica frustules. All experiments were carried out in triplicate. At the end of the experiment, the cells were fixed with paraformaldehyde (4% in the culture medium) for 2 hours. After fixation, the cells were washed with phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) and mounted on glass slides in Mowiol® 40-88 (Sigma-Aldrich, Germany) for fluorescent and laser scanning microscopy.

Cells forming parts of the frustules (valves immediately after division or girdle bands during interphase) were counted among 100 randomly encountered cells. Cells without internal contents and without chloroplast fluorescence or PDMPO staining were considered dead. Counting was made with an

optical microscope Axiovert 200 equipped with a blue filter for light with a wavelength of 546 nm.

### 2.4. Immunostaining and laser scanning microscopy (LSM)

To localize  $\alpha$ -tubulin, a previously proposed modified protocol was used (Pasternak et al., 2015). Cell cultures were fixed with a 2% paraformaldehyde solution with the addition of 0.1% Triton X-100 in a microtubule stabilizing buffer (MTSB - PIPES 0.1M, EGTA 0.01M, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01M, KOH 0.1M, pH 7.0) for 30 min, washed with the same buffer, and permeabilized with a solution of 1% Triton X-100 and 10% DMSO for 20 min at 37 °C. Blocked with 2% BSA solution in MTSB. To localize alpha-tubulin, monoclonal antibodies to the fragment 426-450 a.a. of the chicken  $\alpha$ -tubulin were used. Antibodies were conjugated with Alexa488 (Alexa Fluor® 488 Anti-alpha Tubulin antibody [DM1A] (ab195887), Abcam). Cells were incubated with antibodies at a dilution of 1:200 for 2 h at 37°C, after which the cells were washed with buffer, additionally stained with DAPI (10  $\mu$ g/ml for 10 min), and mounted on glass using Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich, Germany).

The samples were examined using a laser scanning microscope LSM 710 (Zeiss) equipped with a Plan-Apochromat 63 $\times$ /1.40 Oil DIC M27 immersion lens (Zeiss). Chloroplast autofluorescence was excited with a 561 nm laser; emission was registered in the range of 650–723 nm. Alexa488 fluorescence was excited with a 488 nm laser; emission was registered in the range 496-647 nm. DAPI fluorescence was excited with a 405 nm laser; emission was registered in the ranges of 410-492 nm. Three-dimensional reconstructions were obtained from 100 optical sections (z-thickness 15–30  $\mu$ m). PDMPO fluorescence was excited by a laser with a wavelength of 405 nm, and emission was recorded in the range of 441–587 nm. The 3D reconstruction was obtained from 100 optical sections (z-thickness 15-70  $\mu$ m).

## 3. Results

Figure 1 shows electron microscopy of the frustules of *Aulacoseira islandica* strain 3Mr553. The strain studied was characterized by the formation of valves of different lengths in sister cells (Fig. 1A). All control valves have spatulate connecting spines and ordered rows of areoles (Fig. 1B). The girdle bands covering the valves from the beginning of formation until the next division are sometimes so densely packed on the valves that they remain there even after harsh multi-stage chemical treatment (Fig. 1C).

In the cells of the studied strain,  $\alpha$ -tubulin was localized in interphase and at the early stage of valve formation (Fig. 2). Interphase cells are characterized by a star-shaped distribution of microtubules; large bundles of microtubules are irradiated from a center that is in close connection with the nucleus and indicate indirectly the location of the microtubule center (Fig.

2A). Microtubule strands are localized in *A. islandica* in a thin layer of cytoplasm, and often a single optical layer is sufficient to visualize them. During the early stages of valve morphogenesis, the microtubule packing was not dense enough to be visible in transmitted light, so large strands of microtubules were not observed (Fig. 2B).

3D-reconstructions of the valves and girdle bands of *Aulacoseira islandica* formed during the experiment and stained with PDMPO are presented in Figure 3. During the experiment, the cells that formed the girdle bands were able to synthesize from one to three of them. Abnormal morphology was observed among valves formed in the presence of gatastatin. Figure 3 shows the main anomalies encountered among them: anomalies of connecting spines (or their absence) and, in rare cases, disruption of striation (disordered areolae).

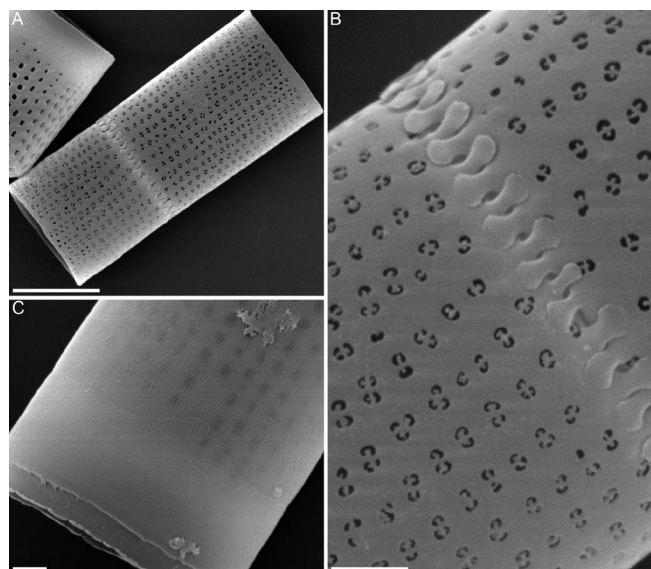
The studied strain was characterized by the presence of at least 30% dead cells in the culture (Fig. 4). Most cells formed actively both valves and girdle bands. At all gatastatin concentrations, the number of dead cells was higher than in the control. The number of colored valves was lowest at gatastatin concentrations of 3 and 10  $\mu\text{M}$ , while at gatastatin concentrations from 0.03 to 3  $\mu\text{M}$ , the number of girdle bands remained approximately the same, but less than in the control.

For *A. islandica*, it was shown that the number of forming valves and girdle bands decreased with an increase in gatastatin concentration in the medium. At gatastatin concentrations of 0.3 and 0.03  $\mu\text{M}$ , the number of formed valves and girdle bands was comparable to control samples (Fig. 4). At concentrations of 3 and 10  $\mu\text{M}$ , all found staining valves had changes in morphology.

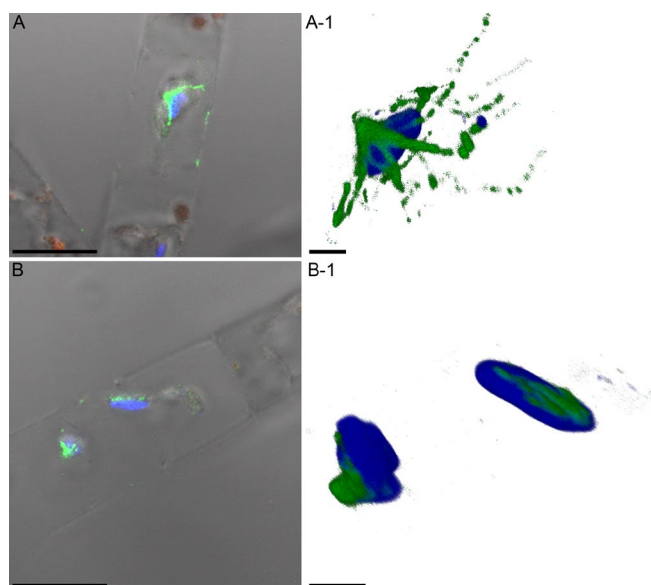
#### 4. Discussion

Earlier, it was shown that diatom  $\gamma$ -tubulin is present in their microtubule center (*Craticula cuspidata* – Aumeier, 2012). However, even in the large cells of some diatom species, visualization of  $\gamma$ -tubulin is hampered by its small size. Of all the diatom tubulins,  $\gamma$ -tubulin was the least conserved (Khabudaev et al., 2022), therefore poorly visualized by antibodies to  $\gamma$ -tubulin in other organisms. Despite the fact that the main part of the microtubule center is  $\gamma$ -tubulin and proteins of the  $\gamma$ -tubulin complex, the localization of  $\alpha$ -tubulin allows indirect detecting of the microtubule center localization in the cells of *Aulacoseira islandica* and to show the microtubule polymerization degree. It was shown that microtubule bundles that were described earlier for large cells of *Coscinodiscus granii* (Tesson and Hildebrand, 2010) localized not so much during valve morphogenesis as in the interphase cell, when the valve was already formed. It is likely that such a difference is due to the small volume of cytoplasm in *A. islandica* cells compared to the previously studied *C. granii*.

Tubulins are highly conserved proteins, and the diatom  $\alpha$ -tubulin sequence fragment (426-450 a.a.) is identical to the homologous sequence of chicken



**Fig.1.** Fine structure of valves and girdle bands of *Aulacoseira islandica* strain 3Mr553 (SEM). Scale: A – 5  $\mu\text{m}$ ; B, C – 1  $\mu\text{m}$ .



**Fig.2.** Visualization of  $\alpha$ -tubulin at the early stage of valve formation and in interphase in one optical section (A, B) and 3D-reconstructions (A-1, B-1) in the cells of *A. islandica* (LSM). Green – fluorescence of Alexa-488 after staining of  $\alpha$ -tubulin, blue – fluorescence of DAPI, red – autofluorescence of chlorophyll. Scale bar: A, B – 10  $\mu\text{m}$ ; A-1, B-1 – 2  $\mu\text{m}$ .

tubulin, from which the antibodies used were obtained. Thus, although the  $\alpha$ -tubulin sequence of *A. islandica* is not available, there is no doubt about the identity of the localized protein (Fig. 2).

The structure of mature valves can be described using electron microscopy; however, different stages of valve morphogenesis remain mostly inaccessible because forming valves are closed by girdle bands during the cell cycle for research unless the cells are treated with harsh reagents to remove organic matter. Due to the short exposure time of gatastatin (48 hours), most of the valves formed under its influence remain hidden for examination using SEM. The use of intravital fluorescent dyes and laser scanning microscopy enables

to observe the developing valves as 3D-reconstructions. This method allows to determine accurately the valves formed specifically in the current experiment.

Previously it was shown that under the influence of colchicine cells of *A. islandica* formed valves with the only center of symmetry, which was the cause of the failed cytokinesis. In this case, the valve morphogenesis occurs and new forming valve is positioned like a giant girdle band (Bedoshvili et al., 2018). Colchicine did not cause high cell mortality at the high concentration of 20 and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , unlike gatastatin. The results of the study show that the effect of gatastatin caused not so much the formation of abnormal valves but rather a stop in cell division, accompanied by an arrest of the valve morphogenesis. Furthermore, under the influence of gatastatin, lateral valve morphogenesis did not occur indicating that valve formation in *A. islandica* was impossible without the participation of the microtubule center.

It is known that gatastatin is able to bind not only to  $\gamma$ -tubulin, but also to  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin, although, the dissociation constant with the latter is more than ten times higher (Chinen et al., 2015). It is obvious that anomalies in the structure of the valves are precisely associated with the ability of gatastatin to bind to all types of tubulins, and the formation of spines in *A. islandica* occurs throughout the entire morphogenesis of the valve; therefore, they are the most sensitive structure to various aberrations (Bedoshvili et al., 2018).

## 5. Conclusion

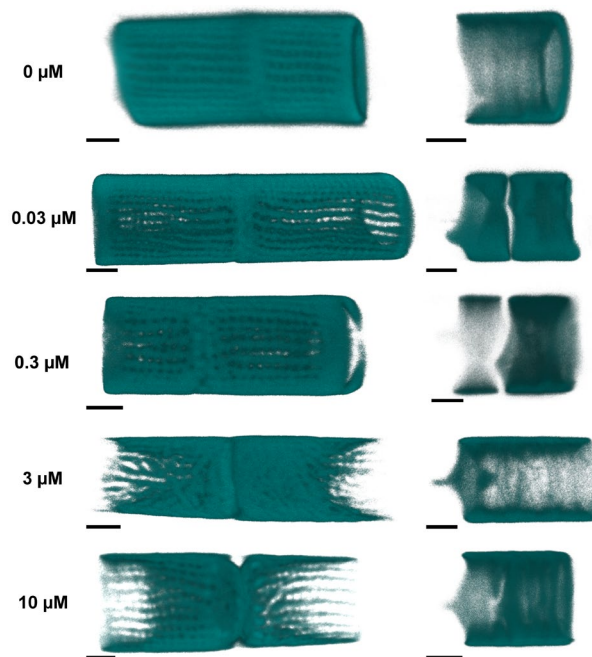
Specific staining enabled to localize  $\alpha$ -tubulin in *Aulacoseira islandica* cells during valve morphogenesis and in interphase. The microtubule nucleation center was visualized in close association with the nucleus, which was a characteristic of a microtubule center. Inhibition of  $\gamma$ -tubulin using the specific inhibitor gatastatin showed a decrease in the number of valve-forming cells suggesting that a properly functioning microtubule center was required to initiate valve morphogenesis. Thus, the results obtained suggest that the microtubule center is an important structure not only for cell division, but is also necessary for the onset of valve morphogenesis.

## Acknowledgements

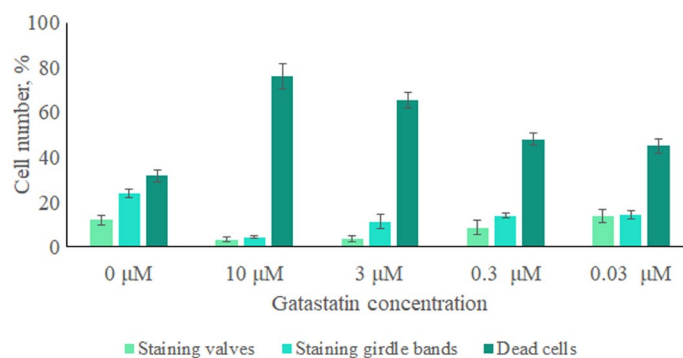
This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 22-24-00080. The microscopy studies were performed at the Electron Microscopy Center of the Shared Research Facilities "Ultramicroanalysis" of Limnological Institute, <https://www.lin.irk.ru/copp/>.

## References

Aumeier C. 2012. The cytoskeleton of diatoms structural and genomic analysis. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany (Doctoral dissertation)



**Fig.3.** Valves (left) and girdle bands (right) of *A. islandica* formed under the influence of different concentrations of gatastatin (indicated on the left) (LSM, 3D-reconstruction). Scale bar – 2  $\mu\text{m}$ .



**Fig.4.** Morphogenesis of valves and girdle bands in the cells of *A. islandica* under the influence of gatastatin.

Bedoshvili Ye.D., Gneusheva K.V., Popova M.S., Avezova T.N., Arsentyev K.Yu., Likhoshway Ye.V. 2018. Frustule morphogenesis of raphid pennate diatom *Encyonema ventricosum* (Agardh) Grunow. *Protoplasma* 255: 911-921 DOI: [10.1007/s00709-017-1199-4](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1199-4)

Bedoshvili Ye.D., Likhoshway Ye.V. 2021. The effects of cytoskeletal inhibitors in diatom valve morphogenesis. In: Annenkov V.V., Seckbach J., Gordon R. (Eds.) *Diatom Morphogenesis*, Beverly, MA, USA, pp. 349-364. DOI: [10.1002/9781119488170.ch14](https://doi.org/10.1002/9781119488170.ch14)

Caudron M., Bunt G., Bastiaens P., Karsenti E. 2005. Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science* 309(5739): 1373-1376. DOI: [10.1126/science.1115964](https://doi.org/10.1126/science.1115964)

Cavalier-Smith T. 2018. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. *Protoplasma* 255(1): 297-357. DOI: [10.1007/s00709-017-1147-3](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1147-3)

Cohn S., Nash J., Pickett-Heaps J. 1989. The effects of drugs on diatom valve morphogenesis. *Protoplasma* 149: 130-143

- De Martino A., Amato A., Bowler C. 2009. Mitosis in diatoms: rediscovering an old model for cell division. *Bioessays* 31(8): 874-84. DOI: [10.1002/bies.200900007](https://doi.org/10.1002/bies.200900007)
- Findeisen P., Mühlhausen S., Dempewolf S. et al. 2014. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biology and Evolution* 6(9): 2274-88. DOI: [10.1093/gbe/evu187](https://doi.org/10.1093/gbe/evu187)
- Hayakawa I., Ikedo A., Chinen T. et al. 2012. Design, synthesis, and biological evaluation of the analogues of glaziovianin A, a potent antitumor isoflavone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20(19): 5745-56. DOI: [10.1016/j.bmc.2012.08.005](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.08.005)
- Khabudaev K.V., Petrova D.P., Bedoshvili Ye.D. et al. 2022. Molecular evolution of tubulins in diatoms. *International Journal of Molecular Sciences* 23(2): 618. DOI: [10.3390/ijms23020618](https://doi.org/10.3390/ijms23020618)
- Kharitonenko K.V., Bedoshvili Ye.D., Likhoshway Ye.V. 2015. Changes in the micro- and nanostructure of siliceous valves in the diatom *Synedra acus* under the effect of colchicine treatment at different stages of the cell cycle. *Journal of Structural Biology* 190(1): 73-80. DOI: [10.1016/j.jsb.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.12.004)
- Medlin L., Kaczmarek I. 2004. Evolution in diatoms. V. Morphological and cytological support of the major clades and taxonomic revision. *Phycologia* 43: 245-273. DOI: [10.2216/i0031-8884-43-3-245.1](https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-3-245.1)
- Mitchison T., Kirschner M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312(5991): 237
- Oegema K., Wiese C., Martin O.C., et al. 1999. Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *Journal of Cell Biology* 144: 721-33. DOI: [10.1083/jcb.144.4.721](https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.721)
- Oey J.L., Schnepf E. 1970. Über die Auslösung der Valvenbildung bei der Diatomee *Cyclotella cryptica*. *Archives of Microbiology* 71: 199-213
- Pasternak T., Tietz O., Rapp K. et al. 2015. Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods* 11: 50. DOI: [10.1186/s13007-015-0094-2](https://doi.org/10.1186/s13007-015-0094-2)
- Pickett-Heaps J., Schmid A.-M., Edgar L. 1990. The cell biology of diatom valve formation. In: Round F.E., Chapman D.J. (Eds) *Progress in phycological research*, Vol. 7. Bristol
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. 1990. *The Diatoms*. Bristol: Cambridge University Press
- Tesson B., Hildebrand M. 2010. Extensive and intimate association of the cytoskeleton with forming silica in diatoms: Control overpatterning on the meso- and micro-scale. *PLoS ONE*, 5: e14300
- Theriot E.C., Ashworth M., Ruck E. et al. 2010. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution* 143(3): 278-296. DOI: [10.5091/plecevo.2010.418](https://doi.org/10.5091/plecevo.2010.418)
- Van de Meene A., Pickett-Heaps J. 2002. Valve morphogenesis in the centric diatom *Proboscia alata* Sundström. *Journal of Phycology* 38: 351-363. DOI: [10.1046/j.1529-8817.2002.01124.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01124.x)
- Van de Meene A., Pickett-Heaps J. 2004. Valve morphogenesis in the centric diatom *Rhizosolenia setigera* (Bacillariophyceae, Centrales) and its taxonomic implications. *European Journal of Phycology* 39: 93-104. DOI: [10.1080/09670260310001646522](https://doi.org/10.1080/09670260310001646522)
- Zakharova Yu.R., Bedoshvili Ye.D., Petrova D.P. et al. 2020. Morphological description and molecular phylogeny of two diatom clones from the genus *Ulnaria* (Kützing) Compère isolated from an ultraoligotrophic lake at the Pole of Cold in the Northern Hemisphere, Republic of Sakha (Yakutia), Russia. *Cryptogamie Algologie* 41(6): 37-45. DOI: [10.5252/cryptogamie-algologie2020v41a6](https://doi.org/10.5252/cryptogamie-algologie2020v41a6)
- Zheng Y., Wong M.L., Alberts B. et al. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578-83. DOI: [10.1038/378578a0](https://doi.org/10.1038/378578a0)

# Изменения в морфогенез створки *Aulacoseira islandica* под влиянием ингибитора $\gamma$ -тубулина гатастатина

Бедошвили Е.Д.\* , Байрамова Э.М., Захарова Ю.Р.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Морфогенез створок диатомовых водорослей происходит под контролем микротрубочек. Известно, что  $\gamma$ -тубулин важный компонент микротрубочкового центра, контролирующего полимеризацию микротрубочек и обеспечивающего их нуклеацию в клетке. В настоящей работе на примере *Aulacoseira islandica* был визуализирован  $\alpha$ -тубулин при морфогенезе створки и во время интерфазы. Было показано, что ингибирование  $\gamma$ -тубулина в клетках *A. islandica* приводит к формированию створок с измененной структурой и увеличивает гибель клеток в культуре при концентрации гатастатина 3 и 10 мкМ, при этом количество делящихся клеток уменьшается в три раза. Малое количество створок, сформированных под влиянием гатастатина, позволяет предположить, что активность  $\gamma$ -тубулина требуется как для нуклеации микротрубочек в клетке, так и для начала морфогенеза створки. Полученные результаты способствуют пониманию роли микротрубочкового центра в морфогенезе створок диатомовых водорослей.

**Ключевые слова:** цитоскелет, морфогенез створки, гатастатин,  $\gamma$ -тубулин

## 1. Введение

Диатомовые водоросли – одноклеточные эукариоты, принадлежащие к царству Chromista (Cavalier-Smith, 2018); морфология их кремнеземных панцирей очень разнообразна (Round et al., 1990). Систематика диатомей основана на морфологии панцирей и филогении маркерных генов, таких как *18S rRNA* и *rbcL* (Medlin and Kaczmarska, 2004; Theriot et al., 2010). Их кремнеземные панцири состоят из двух створок и системы взаимно перекрывающихся кольцевых поясковых ободков (Pickett-Heaps et al., 1990). Детали панциря синтезируются последовательно в течение клеточного цикла; после митоза происходит морфогенез створки, а поясковые ободки формируются на протяжении интерфазы.

Усилия многих исследователей направлены на поиск генетических и клеточных механизмов, обеспечивающих видовые различия симметрии и строения панцирей диатомей. Известно, что морфогенез створок находится под контролем цитоскелета и роль микротрубочек наиболее изучена (Tesson and Hildebrand, 2010; Bedoshvili and Likhoshway, 2021). Правильное функционирование микротрубочек основано на динамической полимеризации/деполимеризации  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина (Mitchison and Kirschner, 1984; Caudron et al., 2005). Показано, что обработ-

ка клеток диатомей ингибиторами микротрубочек приводит к различным аномалиям их створок (Oey and Schnepf, 1970; Cohn et al., 1989; Van de Meene and Pickett-Heaps, 2002; Van de Meene and Pickett-Heaps, 2004; Kharitonenko et al., 2015; Bedoshvili et al., 2018). Колхицин способен остановить деление клетки, однако, для некоторых видов было показано, что морфогенез створки все равно происходит. Так под влиянием колхицина клетки центрических диатомей *Cyclotella cryptica* и *Aulacoseira islandica* (Oey and Schnepf, 1970; Bedoshvili et al., 2018) формируют «латеральные» створки, морфология которых сходна с нормальной, однако их лицевая часть прижата к зрелым поясковым ободкам. Предполагалось, что такая морфология становится возможной при нарушении работы микротрубочек под влиянием колхицина в начале митоза (Bedoshvili et al., 2018). После обработки колхицином в клетках происходят нарушения в кариокинезе и цитокинезе, что приводит к формированию латеральной створки в клетке с единственным ядром неправильной формы.

Формирование микротрубочек (и их нуклеация) происходят в клетке не случайным образом, а под контролем специализированного сайта в клетке – микротрубочкового организующего центра (МТОЦ). Диатомовые водоросли имеют специфический ацентриольный МТОЦ с атипичными осо-

\*Corresponding author.

E-mail address: [bedoshvilied@list.ru](mailto:bedoshvilied@list.ru) (Е.Д. Бедошвили)

**Поступила:** 27 ноября 2023; **Принята:** 11 декабря 2023;  
**Опубликована online:** 13 декабря 2023

© Автор(ы) 2023. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



бенностями (De Martino et al., 2009). Морфология МТОЦ может быть разнообразной, однако, в основе его структуры лежит  $\gamma$ -тубулин, формирующий крупные комплексы с другими белками (Zheng et al., 1995; Oegema et al., 1999). Эти комплексы не включают в себя  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулин, а присутствие в них  $\gamma$ -тубулина является обязательным условием для нуклеации микротрубочек. Ранее было показано, что геном диатомей содержит гены  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -тубулинов (De Martino et al., 2009; Aumeier, 2012; Findeisen et al., 2014). Более детальный анализ позволил идентифицировать структурные особенности предсказанных аминокислотных последовательностей  $\gamma$ -тубулина диатомовых водорослей (Khabudaev et al., 2022), но его значение для морфогенеза кремнеземных створок не было показано.

Гатастатин – недавно синтезированный антиопухолевый препарат, способный связываться с  $\gamma$ -тубулином и блокировать нуклеацию микротрубочек, не оказывая существенного влияния на  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулин (Hayakawa et al., 2012). Использование гатастатина позволяет показать роль  $\gamma$ -тубулина в морфогенезе створки диатомовых водорослей. Пресноводная диатомея *Aulacoseira islandica* оказалась удобной моделью для исследования нарушений морфологии створок благодаря высокому загибу створки и крупным поясковым ободкам. Основной целью настоящей работы было исследование роли  $\gamma$ -тубулина в морфогенезе створки *A. islandica*.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Культивирование

Штамм *Aulacoseira islandica* Mr553 был выделен из природной популяции оз. Байкал и культивировался в среде DM (Thompson et al., 1988) при 4°C, естественном освещении и циклами день-ночь. Процедуру выделения и культивирования проводили согласно опубликованной ранее методике (Zakharova et al., 2020).

### 2.2. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Панцири обрабатывали согласно протоколу, описанному ранее (Kharitonenko et al., 2015). Суспензию очищенных панцирей наносили на покровное стекло, высушивали и размещали на столике для СЭМ с помощью двустороннего углеродного скотча (SPI Supplies, West Chester, USA). Анализ морфологии проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа QUANTA 200 (FEI Company, Hillsboro, USA).

### 2.3. Обработка гатастатином

Культуру *A. islandica* инкубировали в присутствии гатастатина в течение 48 часов. Концентрации гатастатина выбирали согласно опубликованным данным литературы и рекомендациям

производителя (10, 3, 0.3 и 0.03 мкМ). Клетки инкубировали в присутствии PDMPO (Thermo Fisher Scientific, USA) для визуализации формирующихся кремнеземных панцирей. Все эксперименты проводили в трех повторностях. По окончании эксперимента клетки фиксировали параформальдегидом (конечная концентрация в среде – 4 %) в течение 2 часов, после этого отмывали фосфатным буфером (0,1 М, pH 7) и монтировали на предметном стекле в среде Mowiol® 40-88 (Sigma-Aldrich, Germany) для флуоресцентной и лазерной сканирующей микроскопии.

Клетки, формирующие детали панциря (створки сразу после деления или поясковые ободки в течение интерфазы) считали среди 100 случайно встреченных клеток. Клетки без внутреннего содержимого и флуоресценции хлоропластов или PDMPO считали в качестве погибших. Подсчет проводили на оптическом микроскопе Axiovert 200, оснащенный синим фильтром для света с длиной волны 546 нм.

### 2.4. Иммуноокрашивание и сканирующая лазерная микроскопия (ЛСМ)

Для локализации  $\alpha$ -тубулина использовали протокол, предложенный ранее, с модификациями (Pasternak et al., 2015). Клетки в культуре фиксировали 2 % раствором параформальдегида с добавлением 0,1% Triton X-100 в буфере, стабилизирующем микротрубочки (МТСБ – PIPES 0,1М, EGTA 0,01М, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0,01М, КОН 0,1М, pH 7) в течение 20 мин, отмывали тем же буфером и пермеабилizировали в растворе 1% Triton X-100 и 10% DMSO в течение 20 мин при 37 °С. Блокирование проводили в 2% растворе БСА на МТСБ. Для локализации  $\alpha$ -тубулина использовали моноклональные антитела к фрагменту  $\alpha$ -тубулина цыпленка 426-450 а.о., конъюгированные с Alexa488 (Alexa Fluor® 488 Anti-alpha Tubulin antibody [DM1A] (ab195887), Abcam). Клетки инкубировали с антителами в разведении 1:200 в течение 2 ч при 37°C, после чего отмывали буфером, дополнительно окрашивали DAPI (10 мкг/мл в течение 10 мин) и монтировали на предметные стекла в среде Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich, Germany).

Препараты исследовали на лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 (Zeiss) с иммерсионным объективом Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DIC M27 (Zeiss). Автофлуоресценцию хлоропластов возбуждали лазером с длиной волны 561 нм; эмиссию регистрировали в диапазоне 650-723 нм. Флуоресценцию Alexa488 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм; эмиссию регистрировали в диапазоне 496-647 нм. Флуоресценцию DAPI возбуждали лазером с длиной волны 405 нм; эмиссию регистрировали в диапазоне 410-492 нм. Трехмерные реконструкции были получены из 100 оптических срезов (толщина по оси z 15-30 мкм). Флуоресценцию PDMPO возбуждали лазером с длиной волны 405 нм, эмиссию ре-

гистрировали в диапазоне 441-587 нм. Трехмерные реконструкции были получены из 100 оптических срезов (толщина по оси z 15-70 мкм).

### 3. Результаты

На Рисунке 1 представлена электронная микроскопия панцирей штамма *A. islandica* 3Mr553. Для исследованного штамма характерно формирование створок с разной высотой загиба у сестринских клеток (Рис. 1А). Все створки имели лопастевидные соединительные шипы и упорядоченные ряды ареол (Рис. 1Б). Поясковые ободки покрывающие створки от начала формирования до следующего деления в некоторых случаях были упакованы настолько плотно, что оставались на створках даже после многостадийной химической (Рис. 1В).

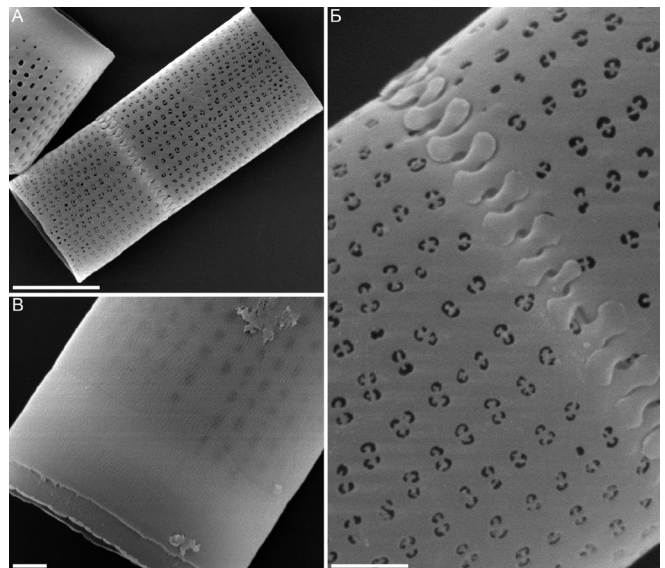
В клетках исследованного штамма  $\alpha$ -тубулин был локализован в интерфазе и на ранней стадии формирования створки (Рис. 2). Для клеток в интерфазе было характерно звездообразное распределение микротрубочек, их крупные пучки расходились от центра, прижатого к ядру, и косвенно указывали на расположение микротрубочкового центра (Рис. 2А). Тяжи микротрубочек у *A. islandica* локализовались в тонком слое цитоплазмы и часто для их визуализации было достаточно одного оптического слоя. На ранних стадиях морфогенеза створки упаковка микротрубочек не была настолько плотной, чтобы быть видимой, и крупные тяжи микротрубочек не были обнаружены (Рис. 2Б).

Трехмерные реконструкции створок и поясковых ободков *A. islandica*, сформированных во время эксперимента и окрашенных PDMPO, представлены на Рисунке 3. За время эксперимента клетки были способны синтезировать от одного до трех поясковых ободков. Среди створок, сформированных в присутствии гатастатина, наблюдались нарушения морфологии. На Рисунке 3 представлены основные зарегистрированные аномалии строения: изменения в строении соединительных шипов (или их отсутствие) и в редких случаях нарушение стрииции (неупорядоченные ряды ареол).

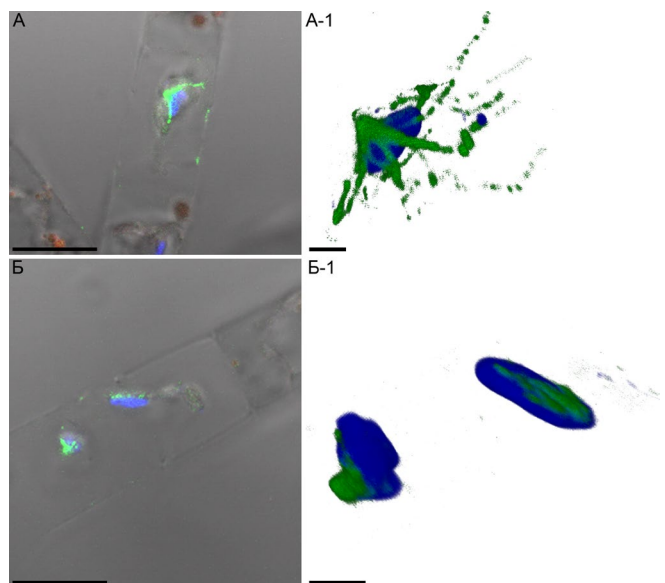
Для исследованного штамма было характерно присутствие в культуре не менее 30 % погибших клеток (Рис. 4). Большинство клеток активно формировали створки и поясковые ободки. При всех концентрациях гатастатина количество мертвых клеток было выше, чем в контроле. Наиболее низким было количество сформированных створок при концентрациях гатастатина 3 и 10 мкМ, тогда как при концентрации от 0,03 до 3 мкМ количество поясковых ободков оставалось ниже, чем в контроле, но было почти одинаковым (Рис. 4). При концентрациях 3 и 10 мкМ, все сформированные створки имели изменения в морфологии.

### 4. Обсуждение

Ранее было показано, что  $\gamma$ -тубулин у диатомей представлен в их микротрубочковом центре (*Craticula cuspidata* – Aumeier, 2012). Однако даже



**Рис.1.** Тонкая структура створок и поясковых ободков *A. islandica* штамм 3Mr553 (СЭМ). Масштаб: А – 5 мкм; Б, В – 1 мкм.



**Рис.2.** Визуализация  $\alpha$ -тубулина на ранней стадии формирования створки и в интерфазе на оптических срезах (А, Б) и трехмерных реконструкциях (А-1, Б-1) в клетках *A. islandica* (ЛСМ). Зеленый – флуоресценция Alexa-488 после окрашивания  $\alpha$ -тубулина, синий – флуоресценция DAPI, красный – автофлуоресценция хлорофилла. Масштаб: А, Б – 10 мкм; А-1, Б-1 – 2 мкм.

в крупных клетках некоторых диатомей визуализация  $\gamma$ -тубулина затруднена небольшими размерами микротрубочкового центра. Из всех тубулинов диатомовых водорослей  $\gamma$ -тубулин наименее консервативен (Khabudaev et al., 2022), по этой причине его сложно визуализировать с помощью антител к  $\gamma$ -тубулину других организмов. Несмотря на то, что главная часть МТОЦ представлена  $\gamma$ -тубулином и белками комплекса  $\gamma$ -тубулина, локализация  $\alpha$ -тубулина позволяет косвенно определить расположение МТОЦ в клетках *A. islandica* и показать степень полимеризации микротрубочек. Для крупных клеток диатомовых водорослей, в том числе для *Coscinodiscus granii* (Tesson and Hildebrand, 2010), тяжи микротрубочек были описаны ранее для кле-



ток, проходящих морфогенез створки, а не для находящихся в интерфазе. Вероятно, это отличие обусловлено небольшим объемом цитоплазмы клеток *A. islandica* в сравнении с *C. granii*.

Как уже упоминалось, тубулины высоко консервативные белки, и фрагмент последовательности  $\alpha$ -тубулина (426-450 а.о.) идентичен гомологичной последовательности  $\alpha$ -тубулина цыпленка, к которому были получены антитела (Khabudaev et al., 2022). Таким образом несмотря на то, что последовательность  $\alpha$ -тубулина *A. islandica* получена не была, нет сомнений в идентификации локализованного белка (Рис. 2).

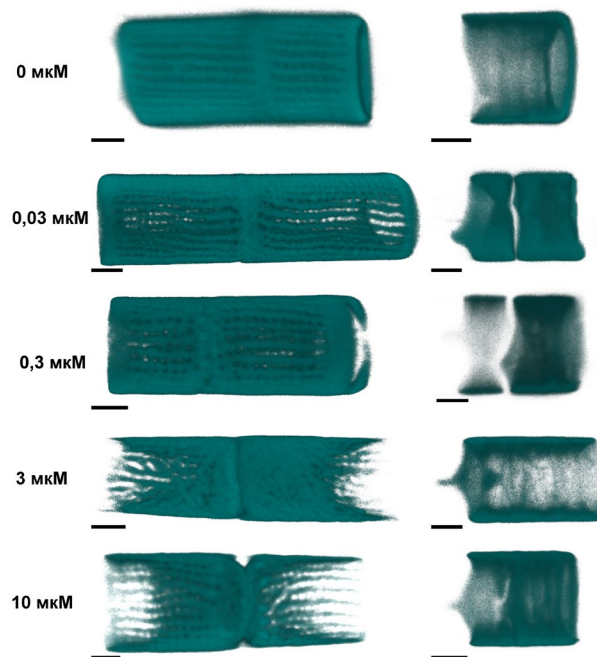
Электронная микроскопия позволяет описать структуру зрелых створок, однако, различные стадии морфогенеза створки остаются в основном недоступными для исследования, даже несмотря на очистку панцирей от органического вещества, так как формирующиеся створки закрыты поясковыми ободками на протяжении морфогенеза и всего клеточного цикла. Из-за краткого времени экспозиции с гатастатином (48 ч) большинство створок сформированных под его влиянием остаются скрытыми для исследования с помощью СЭМ. Использование прижизненных красителей и лазерной сканирующей микроскопии позволяет наблюдать развивающиеся створки в виде трехмерной реконструкции. Этот метод сделал возможным точно определить створки, формирующиеся именно в текущем эксперименте.

Ранее было показано, что под влиянием колхицина клетки *A. islandica* формируют створки с единственным центром симметрии в результате нарушенного цитокинеза. В этом случае происходит морфогенез створки, которая располагается как гигантский поясковый ободок (Bedoshvili et al., 2018). Колхицин не вызывал высокую смертность в культуре при высоких концентрациях (20 и 40 мкг/мл) в отличие от гатастатина. Результаты настоящего исследования показали, что эффект гатастатина является причиной не столько формирования створок с аномальной морфологией, сколько останавливает деление, при этом блокируя морфогенез створки. Также под действием гатастатина не происходит формирование латеральных створок, что может указывать на невозможность морфогенеза створки без участия микротрубочкового центра у *A. islandica*.

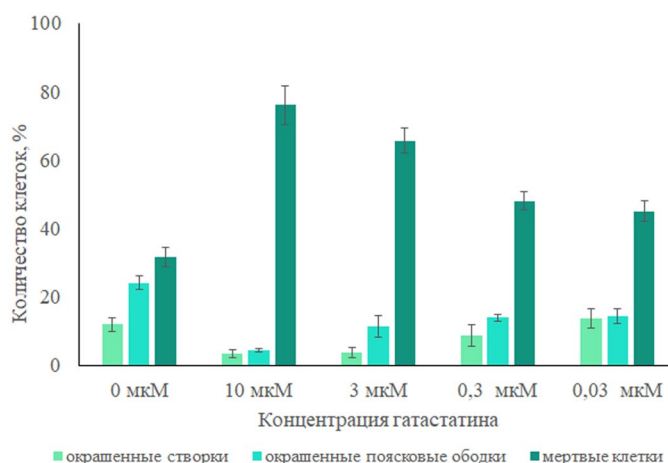
Известно, что гатастатин способен связываться не только с  $\gamma$ -тубулином, но также с  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулином, однако, константа диссоциации с последними выше более, чем в 10 раз (Chinen et al., 2015). Вероятно, аномалии морфологии створок связаны главным образом с этим, а так как формирование соединительных шипов у *A. islandica* происходит на протяжении всего морфогенеза (Bedoshvili et al., 2018), то эти структуры являются наиболее чувствительными к различным воздействиям.

## 5. Заключение

Специфическое окрашивание позволило локализовать  $\alpha$ -тубулин в клетках *A. islandica* в время морфогенеза створки и в интерфазе. Центр нукле-



**Рис.3.** Створки (слева) и поясковые ободки (справа) *A. islandica*, сформированные под влиянием гатастатина в разных концентрациях (указаны слева) (ЛСМ, трехмерная реконструкция). Масштаб – 2 мкм.



**Рис.4.** Морфогенез створок и поясковых ободков *A. islandica* под влиянием гатастатина.

ации микротрубочек был визуализирован рядом с ядром. Ингибирование  $\gamma$ -тубулина с помощью гатастатина вызывало снижение количества клеток, формирующих створки, что предполагает необходимость функционирующего микротрубочкового центра для начала морфогенеза. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что микротрубочковый центр важная структура не только в клеточном делении, но и для инициации морфогенеза створки.

## Благодарности

Исследование было поддержано Российским научным фондом, проект № 22-24-00080. Микроскопия проводилась в центре коллективного пользования «Ультрамикроанализ» ЛИН СО РАН, <https://www.lin.irk.ru/copp/>.

**Список литературы**

Aumeier C. 2012. The cytoskeleton of diatoms structural and genomic analysis. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Germany (Doctoral dissertation)

Bedoshvili Ye.D., Gneusheva K.V., Popova M.S. et al. 2018. Frustule morphogenesis of raphid pennate diatom *Encyonema ventricosum* (Agardh) Grunow. *Protoplasma* 255: 911-921 DOI: [10.1007/s00709-017-1199-4](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1199-4)

Bedoshvili Ye.D., Likhoshway Ye.V. 2021. The effects of cytoskeletal inhibitors in diatom valve morphogenesis. In: Annenkov V.V., Seckbach J., Gordon R. (Eds.) *Diatom Morphogenesis*, Beverly, MA, USA, pp. 349-364. DOI: [10.1002/9781119488170.ch14](https://doi.org/10.1002/9781119488170.ch14)

Caudron M., Bunt G., Bastiaens P. et al. 2005. Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science* 309(5739): 1373-1376. DOI: [10.1126/science.1115964](https://doi.org/10.1126/science.1115964)

Cavalier-Smith T. 2018. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. *Protoplasma* 255(1): 297-357. DOI: [10.1007/s00709-017-1147-3](https://doi.org/10.1007/s00709-017-1147-3)

Cohn S., Nash J., Pickett-Heaps J. 1989. The effects of drugs on diatom valve morphogenesis. *Protoplasma* 149: 130-143

De Martino A., Amato A., Bowler C. 2009. Mitosis in diatoms: rediscovering an old model for cell division. *Bioessays* 31(8): 874-884. DOI: [10.1002/bies.200900007](https://doi.org/10.1002/bies.200900007)

Findeisen P., Mühlhausen S., Dempewolf S. et al. 2014. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biology and Evolution* 6(9): 2274-88. DOI: [10.1093/gbe/evu187](https://doi.org/10.1093/gbe/evu187)

Hayakawa I., Ikeda A., Chinen T. et al. 2012. Design, synthesis, and biological evaluation of the analogues of glaziovianin A, a potent antitumor isoflavone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20(19): 5745-56. DOI: [10.1016/j.bmc.2012.08.005](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.08.005)

Khabudaev K.V., Petrova D.P., Bedoshvili Ye.D. et al. 2022. Molecular evolution of tubulins in diatoms. *International Journal of Molecular Sciences* 23(2): 618. DOI: [10.3390/ijms23020618](https://doi.org/10.3390/ijms23020618)

Kharitonenko K.V., Bedoshvili Ye.D., Likhoshway Ye.V. 2015. Changes in the micro- and nanostructure of siliceous valves in the diatom *Synedra acus* under the effect of colchicine treatment at different stages of the cell cycle. *Journal of Structural Biology* 190(1): 73-80. DOI: [10.1016/j.jsb.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.12.004)

Medlin L., Kaczmarska I. 2004. Evolution in diatoms. V. Morphological and cytological support of the major clades and taxonomic revision. *Phycologia* 43: 245-273. DOI: [10.2216/i0031-8884-43-3-245.1](https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-3-245.1)

Mitchison T., Kirschner M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312(5991): 237

Oegema K., Wiese C., Martin O.C. et al. 1999. Characterization of two related Drosophila gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *Journal of Cell Biology* 144: 721-33. DOI: [10.1083/jcb.144.4.721](https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.721)

Oey J.L., Schnepf E. 1970. Über die Auslösung der Valvenbildung bei der Diatomee *Cyclotella cryptica*. *Archives of Microbiology* 71: 199-213

Pasternak T., Tietz O., Rapp K. et al. 2015. Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods* 11: 50. DOI: [10.1186/s13007-015-0094-2](https://doi.org/10.1186/s13007-015-0094-2)

Pickett-Heaps J., Schmid A.-M., Edgar L. 1990. The cell biology of diatom valve formation. In: Round F.E., Chapman D.J. (Eds) *Progress in phycological research*, Vol. 7. Bristol

Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. 1990. *The Diatoms*. Bristol: Cambridge University Press

Tesson B., Hildebrand M. 2010. Extensive and intimate association of the cytoskeleton with forming silica in diatoms: Control overpatterning on the meso- and micro-scale. *PLoS ONE*, 5: e14300

Theriot E.C., Ashworth M., Ruck E. et al. 2010. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution* 143(3): 278-296. DOI: [10.5091/plevevo.2010.418](https://doi.org/10.5091/plevevo.2010.418)

Van de Meene A., Pickett-Heaps J. 2002. Valve morphogenesis in the centric diatom *Proboscia alata* Sundström. *Journal of Phycology* 38: 351-363. DOI: [10.1046/j.1529-8817.2002.01124.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01124.x)

Van de Meene A., Pickett-Heaps J. 2004. Valve morphogenesis in the centric diatom *Rhizosolenia setigera* (Bacillariophyceae, Centrales) and its taxonomic implications. *European Journal of Phycology* 39: 93-104. DOI: [10.1080/09670260310001646522](https://doi.org/10.1080/09670260310001646522)

Zakharova Yu.R., Bedoshvili Ye.D., Petrova D.P. et al. 2020. Morphological description and molecular phylogeny of two diatom clones from the genus *Ulnaria* (Kützinger) Compère isolated from an ultraoligotrophic lake at the Pole of Cold in the Northern Hemisphere, Republic of Sakha (Yakutia), Russia. *Cryptogamie Algologie* 41(6): 37-45. DOI: [10.5252/cryptogamie-algologie2020v41a6](https://doi.org/10.5252/cryptogamie-algologie2020v41a6)

Zheng Y., Wong M.L., Alberts B. et al. 1995. Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578-83. DOI: [10.1038/378578a0](https://doi.org/10.1038/378578a0)