

На правах рукописи

ЮДИНА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ ГЕНА *MERLIN* НА МОДЕЛИ
СПЕРМАТОГЕНЕЗА *DROSOPHILA MELANOGASTER***

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2009

Работа выполнена в лаборатории генетики клеточного цикла
Учреждения российской академии наук Институт цитологии и генетики СО
РАН, г. Новосибирск

Научный руководитель: доктор биологических наук
Омельячук Леонид Владимирович
Институт цитологии и генетики
СО РАН, г.Новосибирск

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Высоцкая Людмила Васильевна

доктор биологических наук,
Демаков Сергей Анатольевич

Ведущее учреждение: Петербургский институт ядерной физики РАН,
г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится 24 марта 2009г. на
заседании диссертационного совета Д 003.011.01 в Институте цитологии и
генетики СО РАН в конференц-зале Института по адресу:
проспект акад. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090.
Тел/факс: (383)3331278, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
цитологии и генетики СО РАН.

Автореферат разослан 13 февраля 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



А.Д. Груздев

2009A

2934

Актуальность проблемы

Способность к регуляции пролиферации - важнейшее свойство многоклеточных организмов, необходимое им, чтобы контролировать свой размер и форму, поэтому нарушения в контроле деления клетки могут иметь тяжелые последствия для организма в целом. Ошибочная активация пролиферации часто заканчивается формированием опухоли и развитием рака. Многие гены, как непосредственно контролирурующие пролиферацию, так и косвенно вовлеченные в контроль клеточного цикла, были идентифицированы в качестве онкогенов и опухолю-супрессоров.

Среди известных опухолю-супрессоров интересен открытый в 1993 году ген *Neurofibromatosis 2 (Nf2)*, кодирующий белок мерлин (или шванномин), принадлежащий к суперсемейству p4.1 - большой группе цитоплазматических белков, связанных с мембраной. Наибольшую степень сходства он имеет с белками подсемейства ERM (EZRIN-RADIXIN-MOESIN). Отсюда название MERLIN - MOESIN-EZRIN-RADIXIN-like-protein. Мутация этого гена вызывает у человека заболевание нейрофиброматоз второго типа, характеризующееся формированием билатеральной акустической шванномы, поражающей восьмую пару черепно-мозговых нервов, а также других опухолей, ассоциированных с центральной нервной системой, таких как менингиомы и эпендимомы (Martuza, Eldridge, 1988; Trofatter et al., 1993; Rouleau et al., 1993).

Чтобы исследовать клеточные функции белка мерлин, используют его гомологи у мыши и у дрозофилы. У обоих видов особи, гомозиготные по мутации, не выживают, что свидетельствует о жизненно важных функциях мерлина (McClatchey et al., 1997; Fehon et al., 1997). В отличие от человека у мышей, гетерозиготных по *Nf2* мутации, не образуются шванномы и другие характерные опухоли. У них развиваются злокачественные остеосаркомы и фибросаркомы, причем метастатического характера (McClatchey et al., 1998). Что касается дрозофилы, то она тоже подходит для изучения функций белка мерлин, несмотря на отсутствие шванновских клеток - мишени болезни у человека. Эксперименты с использованием мутаций с потерей функций мерлина и FLP-FRT системы для получения соматических мозаичных клонов мутантных эпителиальных клеток показали, что, как и у млекопитающих, мерлин-дефицитные клетки дрозофилы характеризуются гиперплазией. Таким образом, мерлин выполняет функцию опухолю-супрессора и у дрозофилы (LaJeunesse et al., 1998).

К настоящему времени описаны четыре мутации гена *Merlin* у дрозофилы. Ни один из аллелей не вызывает эмбриональной гибели, три из этих мутаций, *Mer¹*, *Mer²*, *Mer⁴*, вызывают гибель на стадии личинки и куколки. Единственный жизнеспособный аллель - *Mer³*. Мухи, гомозиготные по *Mer³*, доживают до взрослого состояния, но стерильны, их крылья более широкие, для глаз характерна нерегулярность фасеток, а на голове образуются аномальные кутикулярные структуры (Fehon et al., 1997).

Чтобы выяснить, каким образом мутация *Mer³* вызывает стерильность самцов, нами были проведены исследования сперматогенеза *Drosophila melanogaster*. Сперматогенез объединяет в себе два типа клеточных делений: митотическое и мейотическое, а также процессы клеточного роста и дифференцировки. Таким образом, он является удобной экспериментальной

моделью для изучения функций белков на клеточном и молекулярном уровнях. Нами было обнаружено, что мутация *Mer³* влияет на процессы компактизации ядер и поляризации цист, что приводит к серьезным нарушениям сперматогенеза на стадии индивидуализации спермиев, что и вызывает стерильность самцов.

Ранее было показано, что мутация *Mer³* затрагивает особый участок белка - «Blue Box» (¹⁷⁰YQMTREM¹⁷⁷), который идентичен у человеческого и дрозофилиного гомологов белка. Он имеет важное значение для правильного функционирования белка (LaJeunesse, et al., 1998). Для изучения этого района, а также других функциональных доменов мерлина, были созданы конструкции, кодирующие различные мутантные и усеченные копии белка на основе вектора *pUAST*, который позволяет экспрессировать копии генов в соматической ткани в системе GAL4-UAS (LaJeunesse et al., 1998). Спецификой нашей работы является использование модифицированного UAS-вектора - *pUASp*, который позволяет достичь высокого уровня экспрессии белков в генеративных тканях дрозофилы (Rorth, 1998).

Чтобы определить функционально значимые районы белка, необходимые для правильного протекания сперматогенеза дрозофилы, мы создали конструкции на основе вектора *pUASp*, кодирующие различные мутантные формы мерлина. Нами было показано, что белок мерлин, который является опухолю-супрессором в соматических тканях дрозофилы, играет существенную роль в процессах сперматогенеза. В частности, открытая форма белка участвует в агрегации митохондрий на стадии «луковицы», а закрытая влияет на цитокinesis в мейозе. Таким образом, в соматической и генеративной тканях мерлин функционирует по-разному.

Целью данной работы было изучение клеточных функций гена *Merlin* на модели сперматогенеза *Drosophila melanogaster*.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Показать роль белка мерлин в сперматогенезе *D. melanogaster*.
2. Изучить локализацию белка мерлин в клетках зародышевого пути самцов *D. melanogaster*.
3. Получить линии дрозофилы, содержащие встройки последовательностей, кодирующих различные усеченные формы белка мерлин, в векторе *pUASp*, который позволяет экспрессировать целевой трансген в клетках зародышевого пути самцов *D. melanogaster*.
4. Проанализировать эктопическую экспрессию конструкций в составе вектора *pUASp*, содержащем последовательности, кодирующие различные усеченные формы белка мерлин, в клетках зародышевого пути и в соматической ткани самцов *D. melanogaster*.
5. Проанализировать особенности и возможные аномалии сперматогенеза, вызванные эктопической экспрессией трансгенных конструкций в клетках зародышевого пути дрозофилы.
6. Основываясь на результатах анализа сперматогенеза дрозофилы при эктопической экспрессии полноразмерной и усеченных копий белка мерлин, определить роль различных доменов белка в выполнении его функций.

Научная новизна и практическая ценность работы: Впервые, на модели сперматогенеза *Drosophila melanogaster* были изучены клеточные функции белка

мерлин, оказывающие влияние на сперматогенез *Drosophila melanogaster*: влияние на цитокинез, на поляризацию цист и морфогенез митохондрий, изучено взаимодействие белка мерлин и колокализация с клеточными структурами.

Получены линии мух, несущие последовательности, кодирующие различные аллели гена *Merlin* в векторе *pUASp*, позволяющем получить эктопическую экспрессию трансгенных конструкций в клетках зародышего пути.

Изучено влияние эктопической экспрессии полученных конструкций в векторе *pUASp* в различных органах и тканях *Drosophila melanogaster*.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Белок мерлин дрозофилы имеет множественные функции в сперматогенезе, такие как цитокинез, морфогенез митохондрий и поляризация цист.

2. Белок имеет доменную структуру. Была выявлена функциональная значимость отдельных доменов белка. Функции белка в соматической и генеративной ткани различны. Для соматической ткани достаточно первых 350 аминокислот белка, в то время как для правильного протекания всех вышеперечисленных процессов в генеративной ткани необходим только полноразмерный белок. С-концевой домен белка играет ключевую роль в морфогенезе митохондрий.

Апробация работы

Основные результаты исследований были представлены в стендовых докладах на Международной конференции по исследованию дрозофилы JDRCS (июль 2007 г., Япония, Кобе) и на X Международной молодежной Школе-конференции (сентябрь 2006 г., Владивосток), а также устным докладом на I Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» (сентябрь 2008г., Украина, Харьков).

Структура и объем работы

Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 123 страницах, включает 23 рисунка, 3 таблицы, список цитируемой литературы включает 115 ссылок.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 3 статьи – в научных журналах, в которых по требованию ВАК Минобрнауки России должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук по биологическим наукам.

Вклад автора

Основные результаты получены автором самостоятельно. Цитологический анализ нарушений сперматогенеза дрозофилы проводился совместно с к.б.н. Дороговой Н.В., к.б.н. Гусаченко А.М. и д.б.н. Омелянчуком Л.В.. Электронная микроскопия сделана к.б.н. Губановой Н.В.

Благодарности

Выражаю свою глубокую признательность за помощь и огромный вклад в выполнение этой работы, в первую очередь, д.б.н. Омелянчуку Л.В., к.б.н. Дороговой Н.В. и к.б.н. Гусаченко А.М. Также я глубоко признательна коллективу лаборатории генетики клеточного цикла- к.б.н. Федоровой С.А., Нерушевой О.О., Галимовой Ю.А., Дубатовой Т.Д., д.б.н. Лебедевой Л.И., к.б.н. Копылу С.А.,

д.б.н. Груздеву А.Д. за помощь в экспериментальной работе и дружескую поддержку. Я выражаю огромную благодарность коллегам и друзьям, оказавшим на разных этапах моей работы неоценимую помощь: Баричевой Э.М., Карагодину Д.А., Блинову А.Г., Головниной К.А., Демакову С.А., Волковой Е.И. и многим другим.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии *D. melanogaster* были получены из Блумингтонского центра линий дрозофилы (Bloomington Stock Center, USA); а также y^1 , $Df(1)w^{67c23}$; $\Delta 2-3$, $Ki p^p$ - источник эндогенной транспозазы, любезно предоставлена из лаборатории И.Ф. Жимулева; $y\ ct\ v\ f$, $y\ w\ sn$, $M-5$, $B\ sc\ w^p$, $FM7$, $y\ B$, Sb любезно предоставлены из лаборатории И.К. Захарова; трансгенные линии, содержащие кДНК мутантных аллелей Mer^3 , $Mer^{345-635}$, Mer^{ABB} , Mer^{1-379} , Mer^{1-169} , а также нормального аллеля Mer^+ , любезно предоставлены из лаборатории Р.Фехона (США), описаны в работе (LaJeunesse et al. 1998); (74-1) w^{118} ; $P\{w^{+mc} = PTT-GA\}Pdt^{G00198}/TM3$, $Sb^1\ Ser^1$, получена методом GFP-белковой ловушки и любезно предоставлена А. Дебеком (Ипстгугт Жака Моно, Париж); $In(1)Bin\ cn$, $B\ sn\ y^+ w^+ B$, $In(1)sc^{4L}sc^{8R}$, $In(1)S$, $y\ sc^1/ B^1\ Y\ y^+ C(1)DX$, $y\ w\ f/ Y$ любезно предоставлены из лаборатории Чадова Б.Ф.

Получение трансгенных линий дрозофилы: Чтобы определить функционально значимые районы белка, необходимые для правильного протекания сперматогенеза дрозофилы, мы создали конструкции в составе вектора $pUASp$ (Rorth, 1998), кодирующие следующие формы белка мерлин: белок, в котором отсутствует «Blue Box» - Mer^{ABB} (в этом белке удалены аминокислоты с 170 по 177), белок с заменой $Met^{177} \rightarrow He$ в этом районе - Mer^3 , C-концевую часть белка - $Mer^{345-635}$, N-концевые части белка: Mer^{1-379} и Mer^{1-169} и полноразмерную копию нормального белка - Mer^+ . Конструкции (LaJeunesse et al., 1998) были получены путем переклонирования уже существующих конструкций в векторе $pUAST$ (Brand, Perrimon, 1993) в вектор $pUASp$, позволяющий получать эктопическую экспрессию изучаемых генов как в генеративной, так и в соматической тканях. Трансформация зародышевой линии дрозофилы проводилась по методике, описанной в статье (Шилова и др., 2007). Для каждой конструкции получено и проанализировано несколько независимых трансгенных линий дрозофилы.

Иммуноцитохимическое окрашивание органов дрозофилы для детекции на флуоресцентном микроскопе проводилось согласно (Xue, Cooley, 1993), с некоторыми модификациями. Антитела против белка мерлин были любезно предоставлены профессором Р. Фехоном (R. Fehon) и описаны в статье (LaJeunesse et al, 1998), в работе также были использованы антитела против тус-эпитопа (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Окраска семенников MitoTracker Red (Invitrogen) была проведена согласно методике разработанной в лаборатории генетики клеточного цикла.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аномалии сперматогенеза у мутантов по гену *Merlin*

Гемизиготные по мутации Mer^3 самцы жизнеспособны, по стерильны (LaJeunesse et al., 1998). Семенные пузырьки таких самцов по сравнению с

семенными пузырьками мух контрольной группы – несущих балансер *FM6* (линия, содержащая мутацию *Mer³* поддерживалась с балансером *FM6*), более мелкие, спермии в них неподвижные и в небольшом количестве. Окрашивание ацетоорсеином показало, что у мух *Mer³* головки спермиев в пределах одной цисты рассеяны, в то время как в контроле головки спермиев выглядят как единый пучок (Рис. 1). У мутантных самцов также были обнаружены два основных типа нарушений сперматогенеза:

1. У мутантных самцов встречаются сперматиды на стадии «луковицы», содержащие два и более ядер и небенкернов равного размера. Этот тип нарушений, вероятно, связан с нарушениями цитокинеза в мейозе (удобно считать количественно нарушения цитокинеза в мейозе на стадии «луковицы», в норме на этой стадии в клетке содержится одно ядро и один небенкерн).

2. Обнаружены трехполюсные и четырехполюсные веретена деления в сперматоцитах в течение второго деления мейоза, что, вероятно, является результатом неполного цитокинеза в предыдущем мейотическом делении.

Гемизиготные самцы по мутации *Mer⁴* нежизнеспособны, они погибают на стадии личинки и куколки. Но всё же были выделены семенники из единичных куколок и изучены аномалии сперматогенеза у самцов *Mer⁴*. Характер нарушений в сперматогенезе у мутантов *Mer⁴* такой же, как и у мутантов *Mer³*, но количество аномалий больше: тогда как у мутантов *Mer³* встречаются цисты с нормально сформированными головками спермиев, у мутантов *Mer⁴* они практически отсутствуют.

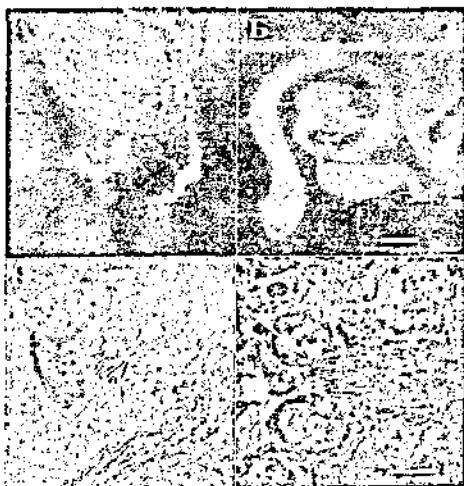


Рис.1. Морфология семенников, выделенных из самцов контрольной группы *FM6* (Б и Г) и семенников мутантов *Mer³* (А и В). Окрашенные DAPI семенники самцов контрольной группы имеют наполненные семенные пузырьки (Б). Семенные пузырьки мутантов *Mer³* пустые (А) (стрелки указывают на семенные пузырьки). Окрашивание ацетоорсеином: семенники самцов контрольной группы содержат строго упорядоченные пучки спермиев (Г), в то время как у мутантов *Mer³* пучки спермиев дезорганизованы (В) (стрелками указаны пучки спермиев). Масштаб 100 мкм.

Локализация белка мерлин в сперматогенезе дрозофилы

Было проведено иммуноцитохимическое окрашивание цист, выделенных из фертильных самцов контрольной группы (*FM6*) и из мутантов *Mer³*, с использованием специфических моноклональных антител против белка мерлин.

В цистах самцов *FM6* наблюдается следующая локализация мерлина на различных этапах сперматогенеза: в сперматоцитах мерлин в основном расположен на клеточной поверхности и в незначительной степени в цитоплазме, так же как и в соматических тканях и на ранних стадиях гаметогенеза (McCartney, Fehon, 1996). Далее в течение прометафазы и метафазы мейоза мерлин перемещается в цитоплазму клеток. Затем мерлин перераспределяется, и окрашивание становится более интенсивным в области, в которой далее в телофазе будет сформировано сократительное кольцо. Наиболее интенсивное окрашивание мерлина в процессе цитокинеза наблюдается вблизи новообразованных клеточных мембран. Сходное распределение паттернов мерлина происходит и в течение второго деления мейоза: на стадии «луковицы» мерлин концентрируется на небенкерпе, специфической структуре, формирующейся в результате объединения митохондрий при дифференцировке сперматид. Это интенсивное связывание мерлина с небенкерном остается и на последующей стадии «кометы» (начало элонгации сперматид), в течение которой небенкерн распадается на две субединицы, хорошо различимые при иммуноцитохимическом окрашивании антителами против белка мерлин. В цистах, содержащих зрелые спермии, мерлин обнаруживается по всей длине удлинённого небенкерена. Также можно наблюдать присутствие мерлина в виде гранул выше передней части головок спермиев. Эта область соответствует расположению акросомы, специализированной клеточной структуры, являющейся производной аппарата Гольджи.

Локализация белка мерлин в норме и у мутантов *Mer³* совпадает.

Миссенс мутация *Mer³* не затрагивает эпитоп, антитела к которому были использованы (LaJeunesse, 1998), поэтому эта мутация никак не мешает распознаванию и окрашиванию антителами мутантного мерлина. Мутация *Mer³* не влияет на локализацию белка в кортикальной области клетки, на митохондриях и акросомах. Митохондрии, как и их дериват небенкерн, равномерно окрашиваются иммуноцитохимически вплоть до окончания сперматогенеза, хотя морфология этих структур значительно нарушается в процессе элонгации. Используя те же антитела, ранее было показано, что мерлин имеет сходную кортикальную локализацию в имагинальных дисках личинок дикого типа и мутантов *Mer³* (LaJeunesse, 1998).

Тот факт, что локализация белка в норме и у мутантов *Mer³* совпадает свидетельствует о том, что у мутантов нарушена линкерная функция белка с другими структурами, нарушение которой и приводит ко всем наблюдаемым нами аномалиям элонгации.

Получение трансгенных линий *D. melanogaster*, несущих различные аллели гена *Merlin* в составе вектора *pUASp*

Для изучения функциональных доменов белка мерлин были созданы различные усеченные копии кДНК гена *Merlin* (LaJeunesse et al., 1998).

Разные аллели гена *Merlin* мы клонировали в вектор *pUASp*. К генам, кодирующим разные мутантные формы белка мерлин, добавлена последовательность, кодирующая тус-эпитоп. Это сделано для того, чтобы

эктопическая экспрессия генетических конструкций легко детектировалась цитологически.

Для каждой конструкции было получено несколько (не менее 4) независимых трансгенных линий мух. С помощью генетического картирования были определены хромосомы, в которые произошла инсерция конструкций, кодирующих разные аллели гена *Merlin*. Все полученные линии были проанализированы на способность экспрессировать мутантные формы белка в соматической и генеративной тканях (в крыловом имагинальном диске под действием специфичного для этой ткани драйвера *1096-GAL4* и в клетках зародышевого пути в семенниках под действием драйвера *nanos-GAL4*). Также все конструкции были проанализированы на способность восстанавливать жизнеспособность летальной мутации *Mer⁴* под действием драйверов с повсеместной экспрессией *da-GAL4* и *Actin-GAL4*. Все линии мух, полученные для отдельно взятой конструкции, одинаково проявляли себя в способности восстанавливать фенотип летальной мутации *Mer⁴*. Уровень нарушений, вызываемых определенной конструкцией при эктопической экспрессии под действием всех использованных в работе драйверов, в разных независимых линиях был одинаковым. Мы полагаем, что все линии, полученные для каждой конкретной конструкции, были равнозначны. Поэтому для более детального исследования было взято по одной линии мух для каждой конструкции.

Линии, использованные в этой работе, содержали встроенные трансгены в следующих хромосомах: конструкция *pUASp-mycMer⁴⁻¹⁶⁹* встроена в первую хромосому *D.melanogaster*, *pUASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* во вторую хромосому, *pUASp-mycMer³⁴⁵⁻⁶³⁵* в третью, *pUASp-mycMer³* во вторую, *pUASp-mycMer^{ΔBB}* во вторую, *pUASp-mycMer⁺* в третью хромосому.

Восстановление сперматогенеза у мутантов *Mer⁴* с помощью экспрессии усеченных копий гена *Merlin*

В случае мутации *Mer⁴* образуется короткий нефункциональный белок длиной 170 аминокислот, не содержащий никаких функционально значимых сайтов для взаимодействия с другими белками клетки. Для спасения летального фенотипа мутации *Mer⁴* были использованы полученные конструкции, активируемые драйвером *da-GAL4*, обеспечивающим повсеместную экспрессию (Таблица 1).

Повсеместная экспрессия полноразмерного белка мерлин приводила к полному восстановлению жизнеспособности мух и восстановлению всех процессов в сперматогенезе мух и, как следствие, к восстановлению фертильности.

Аналогичный эксперимент был проведен с трансгенной конструкцией *UASp-mycMer³*. В этом случае также происходило спасение летального фенотипа, образовывался класс самцов, выживших за счет экспрессии *Mer³*. У этих самцов в сперматогенезе были обнаружены нарушения, характерные для оригинального аллеля *Mer³*, восстановления фертильности не происходило.

В случае эктопической экспрессии *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* на фоне *Mer⁴* жизнеспособность летальных мутантов *Mer⁴* полностью восстанавливалась, но в

сперматогенезе восстановления не происходило, наблюдалась картина, характерная для мутантов *Mer⁴*, фертильность не восстанавливалась.

При эктопической экспрессии *pUASp-mycMer^{ABB}*, *pUASp-mycMer³⁴³⁻⁶³⁵* на фоне мутации *Mer⁴* спасения летального фенотипа мутации *Mer³* не происходит.

Надо заметить, что в экспериментах по спасению фенотипа летальной мутации *Mer⁴* конструкцией *pUASp-mycMer^{ABB}* происходит незначительное восстановление в соматической ткани и в сперматогенезе (из куколок вылетело незначительное количество ослабленных самцов, которые погибли в первые часы жизни). Картина нарушений в сперматогенезе сходна с таковой у мутантов *Mer³*.

Таким образом, результаты по восстановлению фенотипа мутации *Mer⁴* полностью согласуются с результатами, полученными ранее на соматической ткани (LaJeunesse et al., 1998), и подтверждают, что полученные конструкции в составе вектора *pUASp* обеспечивают необходимый уровень экспрессии исследуемых форм белка мерлин в ответ на активацию требуемым драйвером.

Было выявлено влияние отдельных доменов белка мерлин на сперматогенез *D. melanogaster* (Таблица 1). Полное восстановление сперматогенеза и фертильности обеспечивал только полноразмерный белок мерлин. Ни одна из усеченных или мутантных форм мерлина не обеспечивали полного восстановления сперматогенеза. Таким образом, можно заключить, что и N-концевой домен и C-концевой домен важны в этом процессе, а также важен район «Blue Box», который контролирует внутримолекулярные конформационные переходы белка мерлин.

Таблица 1. Восстановление жизнеспособности и сперматогенеза у мутантов *Mer⁴* с помощью различных усеченных форм белка.

Усеченные варианты белка мерлин	Способность спасать летальный фенотип у мутантов <i>Mer⁴</i>	Способность восстанавливать сперматогенез у мутантов <i>Mer⁴</i>
<i>mycMer⁴</i>	+	+
<i>mycMer³</i>	+	- (**)
<i>mycMer^{ABB}</i>	+/- (*)	- (**)
<i>mycMer¹⁻³⁷⁹</i>	+	- (**)
<i>mycMer³⁴³⁻⁶³⁵</i>	•	-

(*)- было обнаружено незначительное количество мух, доживающих до имаго, но с сильно ослабленной жизнеспособностью

(**)- уровень нарушений в сперматогенезе у мутантов *Mer⁴* снижен до уровня *Mer³*

Анализ влияния эктопической экспрессии конструкций UASp-*mycMer*⁺ и UASp-*mycMer*³⁴⁵⁻⁶³⁵ на сперматогенез на фоне нормального белка мерлин

Самцов *uw/Y; +; nanos-GAL4* скрещивали с самками *uw; pUASp-*mycMer*⁺; +* (где * - это гены *Mer*³, *Mer*^{Δ28}, *Mer*¹⁻³⁷⁹), с самками *uw; +; pUASp-*mycMer*^{**}* (где ** - это гены *Mer*⁺ и *Mer*³⁴⁵⁻⁶³⁵) и самками *uw; pUASp-*mycMer*¹⁻¹⁶⁹; +; +*. Также были проведены и реципрокные скрещивания. Среди потомков отбирали особей, содержащих драйвер и трансген по наличию двух копий гена *mini-white*.

Анализ эктопической экспрессии генов *mycMer*⁺ и *mycMer*³⁴⁵⁻⁶³⁵ под контролем драйвера *nanos-GAL4* в клетках зародышевого пути самцов *D.melanogaster* выявил два типа нарушений сперматогенеза: нарушения элонгации цист и нарушения структуры небенкера, начиная со стадии элонгации сперматид.

Нарушения элонгации цист. В нормальной цисте, находящейся в процессе элонгации, ядра всех сперматид находятся на одном конце цисты и в процессе удлинения синхронно перемещаются вместе с базальным концом цисты. В случае эктопической экспрессии генов *mycMer*⁺ и *mycMer*³⁴⁵⁻⁶³⁵ в некоторых цистах происходят изменения, приводящие к нарушению элонгации сперматид, что ведет к асинхронности перемещения ядер к базальному концу цисты. Морфология самих ядер при этом не нарушается, они претерпевают характерные для них изменения: компактизируются и удлиняются. Такое anomальное расположение ядер может повлиять на дальнейший процесс индивидуализации, в ходе которого образуются отдельные спермии. В начале индивидуализации вокруг ядер собираются актиновые конусы, которые затем синхронно движутся вдоль аксонемы по направлению к хвосту сперматид. По мере движения актинового комплекса происходит реорганизация мембран, разделение сперматид, лишняя цитоплазма и мембранный материал в конце индивидуализации отщепляются в виде «мусорной сумки» (Waste bag). Образование индивидуализационного комплекса происходит в одной точке, на одном уровне для всех сперматид внутри цисты, движение происходит синхронно для всех сперматид в пределах одной цисты. Поэтому расположение ядер на разном уровне может нарушить структуру индивидуализационного комплекса, что может мешать образованию зрелых спермиев (рис.2).

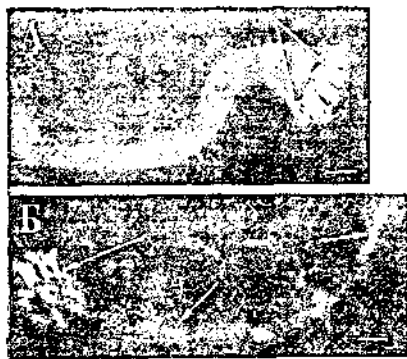


Рис.2. Влияние эктопической экспрессии встроок *mycMer*⁺ и *mycMer*³⁴⁵⁻⁶³⁵ на сперматогенез.

А - нормальная циста в процессе элонгации. Ядра собраны в один пучок на базальном конце цисты (стрелки).

Б - мутантная циста в процессе элонгации. Ядра не собраны в один пучок на базальном конце, они равномерно распределяются по всей длине цисты (стрелки).

Окраска семяников, выявляющая ДНК (DAPI). Масштаб 5 мкм.

Нарушение структуры небенкерна. По мере удлинения цисты небенкерн тоже вытягивается в двураздельную уплощенную структуру, которая тянется вдоль всей сперматиды. Эктопическая экспрессия генов *mysMer⁺* и *mysMer³⁴⁵⁻⁶³⁵* приводит к тому, что в самом начале процесса элонгации сперматид небенкерн лишь немного удлиняется и на этом его вытягивание приостанавливается. На этой стадии неполностью удлиненные небенкерны расположены средней части цисты. На более поздних стадиях элонгации этот единый неудлинившийся агломерат распадается на более мелкие группы митохондрий, которые распределены вдоль всей длины цисты. Специфическое окрашивание митохондриальных дериватов проводили с помощью MitoTracker Red в семенниках мух дикого типа (Рис. 3-А) и при эктопической экспрессии *pUASp-mysMer⁺* (Рис. 3-Б,В) и *pUASp-mysMer³⁴⁵⁻⁶³⁵* (нарушения, вызванные эктопической экспрессией этой конструкции, аналогичны представленным на Рис. 3-Б и 3-В).

Описанные нарушения ярко выражены при эктопической экспрессии конструкций *pUASp-mysMer⁺* и *pUASp-mysMer³⁴⁵⁻⁶³⁵*, но наряду с мутантными цистами оставалось достаточное количество нормальных цист, поэтому возникшие аномалии не сказались на общем уровне фертильности.

Сопоставляя характер распределения белка мерлин с особенностями динамики митохондрий, можно сделать вывод, что белок принимает активное участие в морфогенезе этой структуры, начиная от ранних стадий сперматогенеза, и заканчивая дифференцировкой в зрелые спермии. Несмотря на то, что в ранних сперматоцитах митохондрии распределены по цитоплазме в виде отдельных телец, они прикреплены к эндоплазматическому ретикулуму и, таким образом, формируют единую сеть. Постепенно митохондрии сближаются и ассоциируют на уровне мембран так, что сеть митохондрий трансформируется в более компактный и морфологически выраженный агломерат, который способен динамично менять свою форму и внутриклеточную локализацию в зависимости от этапа сперматогенеза.



Рис.3. Влияние эктопической экспрессии встройки *mysMer⁺* на сперматогенез. Нормальные сперматиды на стадии элонгации (А); сперматиды на стадии элонгации, в которых нарушена структура митохондриальных дериватов под действием эктопической экспрессии *pUASp-mysMer⁺* (Б, В). Окраска митохондриальных дериватов - MitoTracker Red. Масштаб 10 мкм.

Анализ влияния эктопической экспрессии конструкций *UASp-mycMer³*, *UASp-mycMer^{ΔBB}* и *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* на сперматогенез на фоне нормального белка мерлин

Эктопическая экспрессия конструкций *UASp-mycMer³*, *UASp-mycMer^{ΔBB}* и *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* под контролем драйвера *nanos-GAL4* вызывает сходные между собой нарушения, приводящие к блокированию цитокинеза как в митотическом, так и в мейотическом делениях клетки. При этом разделение хромосом и формирование дочерних ядер происходит нормально. В результате аномального цитокинеза образуются многоядерные клетки (от двух до четырех ядер в общей цитоплазме). Из таких клеток образуются многоядерные сперматиды, в которых происходят характерные морфологические преобразования, связанные с дифференцировкой в спермии, такие как: удлинение клеток, компактизация ядра, формирование пеленкерны. Однако, зрелые спермии из этих сперматид не образуются (рис.4).

При эктопической экспрессии конструкций *UASp-mycMer³*, *UASp-mycMer^{ΔBB}* и *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* под контролем драйвера *nanos-GAL4* на фоне нормального белка мерлин процент нарушений цитокинеза на стадии «луковицы» составил: для *UASp-mycMer³* 83%, для *UASp-mycMer^{ΔBB}* 96%, для *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* 75%.

При эктопической экспрессии конструкций *UASp-mycMer³*, *UASp-mycMer^{ΔBB}* и *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* под контролем драйвера *da-GAL4* на фоне нормального белка мерлин процент нарушений цитокинеза на стадии «луковицы» составил: для *UASp-mycMer³* 85%, для *UASp-mycMer^{ΔBB}* 100%, для *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* 75%.

Частоту нарушений цитокинеза на стадии луковицы считали как отношение числа цист с аномалиями цитокинеза на стадии «луковицы» к общему числу цист на данной стадии.

Были проведены исследования сперматогенеза у взрослых самцов *D.melanogaster* с мутацией *Mer³* и у куколок с мутацией *Mer⁴*. В сперматогенезе этих самцов также были выявлены случаи нарушений цитокинеза в мейозе. Подсчет нарушений цитокинеза у мутантов *Mer³* и *Mer⁴* затруднен тем, что до стадии «луковицы» доходят не все сперматоциты второго порядка, к тому же из-за нарушений цитоскелета в клетках затруднен анализ отдельных клеток. Но всё же процент нарушений был ниже чем при эктопической экспрессии конструкций *UASp-mycMer³*, *UASp-mycMer^{ΔBB}* и *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* и составил 40%.

Любопытен тот факт, что на стадии «луковицы» при эктопической экспрессии конструкций *UASp-mycMer³*, *UASp-mycMer^{ΔBB}* и *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹* под контролем драйверов *da-GAL4* и *nanos-GAL4* при образовании многоядерной клетки, сохраняется, как правило, количество небенкернов соответствующее количеству ядер в этой клетке. Ранее были описаны мутации, нарушающие цитокинез на стадии мейоза (Giansanti et al., 2004), нарушения фиксировались на стадии «луковицы» путем подсчета количества ядер и небенкернов в клетке. Но при всех этих мутациях на стадии «луковицы» в многоядерных клетках небенкерны, как правило, сливались в единый большой небенкерн. Возможно, что это связано с тем, что механизмы нарушений цитокинеза разные у мутантов, описанных в работе (Giansanti et al., 2004) и у мутантов по гену *Merlin*.

Цитокинез - это процесс деления цитоплазмы и разделения двух дочерних клеток. В этот процесс вовлечены две зависимые друг от друга системы, которые

функционируют совместно в течение всего процесса: формирование сократительного кольца и формирование центрального веретена деления (Giansanti et al., 2004). У *D. melanogaster* сократительное кольцо включает в себя актин, немышечный миозин II, регуляторную легкую цепь миозина II и анилин. Ранее не было показано, что мерлин участвует в цитокинезе. Тот факт, что мерлин взаимодействует с актином, микротрубочками и тяжелой цепью миозина II, позволяет предположить, что мерлин может быть вовлечен в формирование сократительного кольца, в формирование веретена деления и восстановление мембраны. Как известно, положение средней зоны веретена определяет положение будущей цитокинетической перетяжки (Mittaу, Hunt, 1993), поэтому можно было ожидать, что цитологически наблюдаемые случаи дефекта цитокинеза при эктопической экспрессии некоторых аллелей гена *Merlin* могут быть объяснены искажениями мейотического веретена. Полученные нами данные по расхождению хромосом показали, что дефекты цитокинеза, обнаруживаемые при цитологическом исследовании, не являются вторичным следствием дефектов веретена, а связаны с процессом собственно цитокинеза.



Рис. 4. Влияние эктопической экспрессии встраек *musMer³*, *musMer^{ΔBB}* и *musMer¹⁻³⁷⁹* на сперматогенез.

А - нормальный аполярный сперматоцит первого порядка

Б - двуядерный аполярный сперматоцит первого порядка, образовавшийся в результате отсутствия цитокинеза во время митотического деления гонимальной клетки

В - нормальные клетки на стадии «луковицы», содержат по одному ядру и одному небенкерну (ядра указаны стрелками, небенкерны-треугольниками)

Г - клетка на стадии «луковицы», содержащая четыре ядра и четыре небенкерна. Фазовый контраст.

(ядра указаны стрелками, небенкерны-треугольниками) Масштаб 5 мкм

Роль конформационных внутримолекулярных переходов в белке мерлин для сперматогенеза дрозофилы

Проанализировав нарушения сперматогенеза, которые происходили в результате эктопической экспрессии полученных конструкций в зародышевой линии клеток самцов *D. melanogaster*, мы выявили два различающихся доминантных фенотипа: нарушение цитокинеза в предмейотических митозах и в мейозе при сверх-экспрессии генов *musMer¹⁻³⁷⁹*, *musMer³* и *musMer^{ΔBB}* (при сверх-экспрессии генов *musMer³⁴⁵⁻⁶³⁵* и *musMer⁺* нарушение цитокинеза обнаружено не было) и нарушение структуры митохондриального деривата в процессе элонгации

цист при сверх-экспрессии генов *musMer*³⁴⁵⁻⁶³³ и *musMer*⁺ (в случае эктопической экспрессии других конструкций такого фенотипа мы не наблюдали).

Усеченные формы белка *musMer*³⁴⁵⁻⁶³³ и *musMer*⁺ имеют одну общую структурную особенность, это наличие нормального функционального С-концевого участка белка. Вероятно, этот участок играет важную роль в формировании и правильном функционировании митохондрий на поздних этапах сперматогенеза, а именно, в процессе элонгации цист. Возможно, С-концевой участок белка при эктопической экспрессии в зародышевой линии на фоне нормального белка мерлин в клетке, способен вступать в конкурентные взаимодействия с нормальным мерлином за определенные сайты связывания с другими белками, например, за фосфорилирование РАК и РКА киназами. Однако, *musMer*³ и *musMer*^{ΔBB} также имеют нормальный С-концевой участок. Следовательно, в этих формах белка С-концевой домен должен быть нефункциональным. Это возможно, если конформация этих форм белка закрытая, то есть N- и С- концевые домены белка связаны.

Таким образом, исходя из сходного спектра нарушений, вызванных сверхэкспрессией *musMer*¹⁻³⁷⁹, *musMer*³ и *musMer*^{ΔBB}, мы приходим к выводу, что эти формы белка находятся в закрытой конформации и прочно связаны с мембраной. Закрытая форма мерлина нефосфорилированная по положению 559 (соответствует положению 518 в белке человека), связывается с кортикальным актином и участвует в формировании кортекса (Curto, 2007). Избыток такой формы белка, приводит к тому, что в результате прочного связывания плазматической мембраны клетки и кортикального актинового цитоскелета затрудняется процесс цитокинеза и разделения мембран.

Полученные нами результаты и литературные данные свидетельствуют о том, что разные формы мерлина в разных тканях и процессах функционируют по-разному (схема возможных внутримолекулярных ассоциаций в мерлине представлена на Рис. 5).

У дрозофилиного гомолога белка не было описано альтернативного сплайсинга гена *Merlin* и не было обнаружено существования различных изоформ, как это было показано для белка человека. Но были показаны конформационные переходы и внутримолекулярные взаимодействия внутри молекулы белка (Curto et al., 2007; Muranen et al., 2007). Стабилизация форм осуществляется путем фосфорилирования двух сайтов на N- и на С-концевых доменах. Открытая и фосфорилированная форма белка по положению 559 (518) способна образовывать гетеродимеры с эзрином и давать сигнал к пролиферации клеток. Открытая и нефосфорилированная форма белка участвует в стабилизации и полимеризации микротрубочек путем связывания с ними. В мерлине есть два сайта связывания с микротрубочками на N- и на С- конце белка, которыми мерлин, как линкер, может соединять соседние микротрубочки (Muranen et al., 2007). В такой форме мерлин участвует в агрегации митохондрий и формировании компактной структуры небенкерна на стадии «луковицы» в сперматогенезе дрозофилы. Закрытая и нефосфорилированная по положению 559 (518) форма мерлина участвует в связывании с кортикальным актином и контролирует пролиферацию клеток (Curto et al., 2007). Избыток такой формы мерлина в клетке приводит к нарушениям цитокинеза, как в мейозе, так и в митозе.

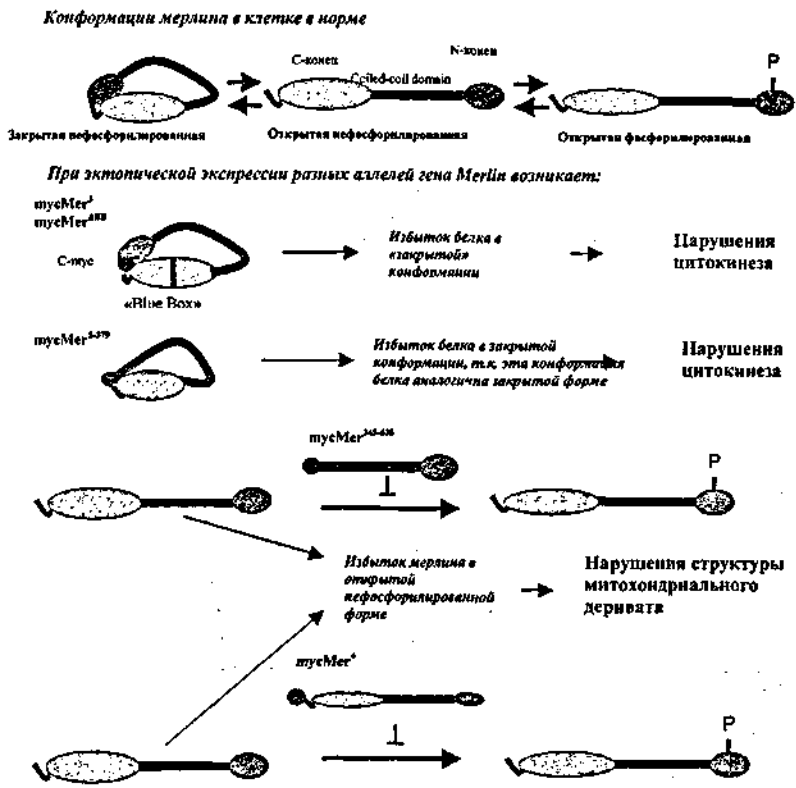


Рис.5. Схема конформационных внутримолекулярных переходов в белке мерлин, иллюстрирующая предлагаемую нами гипотезу.

Заключение

В настоящей работе удалось найти ранее неизвестную функцию белка мерлин, это участие в процессе морфогенеза митохондриального тельца – небенкерна. В связи с этим возникает вопрос, есть ли подобный эффект у млекопитающих? Обнаруженный нами дефект цитокinesis в мейозе самцов возникает как под действием мутаций гена, так и при эктопической экспрессии. Изучение более широкого спектра мутаций, затрагивающих формирование небенкерна, позволит ответить на вопрос - имеется ли причинная связь между эффектом мутаций на формирование митохондриального тельца и на цитокinesis.

Другим важным аспектом функционирования белка мерлин является роль отдельных белковых доменов в выполнении различных функций. Наше

исследование позволило выявить особую роль района «Blue Box» и С-концевого участка белка в сперматогенезе. Исходя из результатов, полученных на клетках млекопитающих, для объяснения роли этих доменов в регуляции активности белка необходимо предполагать наличие конформационных переходов между открытой и закрытой формой белка. Известно, что такие конформационные переходы связаны с фосфорилированием белка мерлин. Потому в дальнейшем мы планируем создать конструкции, кодирующие константно фосфорилированную и константно нефосфорилированную по положению 559 формы белка мерлин и проанализировать влияние их эктопической экспрессии на процесс сперматогенеза и на развитие соматических тканей. Такие эксперименты позволят глубже понять связь функций и конформаций белка мерлин, предложенную в диссертации. Также планируется провести более детальные электронномикроскопические исследования нарушений морфогенеза митохондрий, вызванных эктопической экспрессией С-концевого участка белка и полноразмерного белка мерлин, в генеративной ткани самцов дрозофилы.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что мутации гена *Merlin* приводят к нарушениям цитокинеза в мейозе самцов, поляризации и элонгации сперматид и аномалиям в формировании митохондриального деривата.
2. Изучена локализация белка мерлин в клетках зародышевого пути самцов *D. melanogaster*. Показано, что белок в сперматоцитах имеет кортикальную локализацию, которая в мейозе сменяется на митохондриальную. Такая локализация далее сохраняется и на последующих стадиях сперматогенеза. В зрелых спермиях также обнаруживается локализация белка на акросомах.
3. Получены линии дрозофилы, содержащие встройки последовательностей, кодирующих различные усеченные формы белка мерлин, в векторе *pUASp*, который позволяет экспрессировать целевой трансген в клетках зародышевой линии самцов *D. melanogaster* (*UASp-mycMer⁺*, *UASp-mycMer³⁴⁵⁻⁶³⁵*, *UASp-mycMer³*, *UASp-mycMer^{ΔBB}*, *UASp-mycMer¹⁻³⁷⁹*, *UASp-mycMer¹⁻¹⁶⁹*).
4. Показано, что данные конструкции позволяют эктопически экспрессировать полноразмерную и усеченные копии белка в клетках зародышевого пути самцов и в соматической ткани.
5. Анализ нарушений сперматогенеза, произошедших в результате эктопической экспрессии полученных конструкций в зародышевой линии клеток самцов *D. melanogaster*, выявил два различающихся доминантных фенотипа:
 - 1) сверх-экспрессия генов *mycMer¹⁻³⁷⁹*, *mycMer³* и *mycMer^{ΔBB}*, кодирующих мутантные белки вызывает нарушения цитокинеза в предмейотических митозах и в мейозе. Этот фенотип хорошо согласуется с фенотипом изученных мутаций гена *Merlin*.
 - 2) сверх-экспрессия генов *mycMer³⁴⁵⁻⁶³⁵* и *mycMer⁺* вызывает нарушения элонгации цист и структуры митохондриальных дериватов. Последнее хорошо согласуется с полученными сведениями о локализации белка на митохондриальном деривате.
6. Предложена модель функционирования белка мерлин, основанная на конформационных внутримолекулярных переходах между открытой и закрытой формами, обобщающая полученные нами результаты и ранее известные литературные данные.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Dorogova N.V., Akhmeteyeva E.M., Kopyl S.A., Gubanova N.V., Yudina O.S., Omelyanchuk L.V. and Chang L.S. The Role of *Drosophila Merlin* in Spermatogenesis // *BMC Cell Biology*. 2008. Jan 10;9:1.
2. Юдина О.С., Гусащенко А.М., Ахметьева Е.М., Омелянчук Л.В. Нерасхождение хромосом в линиях дрозофилы, мутантных по опухолевому супрессору *Merlin* // *Генетика*. 2008. Т. 44. №3. С. 357-359.
3. Юдина О.С., Галимова Ю.А. Структурный анализ супрессора опухолей *Merlin* с помощью трансгенных конструкций в сперматогенезе *Drosophila*. // *Информационный Вестник ВОГиС*. 2008а. Том 12. №3. С. 406-411.
4. Юдина О.С., Дорогова Н.В., Галимова Ю.А., Омелянчук Л.В. Различия функций супрессора опухолей *Merlin* в соматической и генеративной тканях самцов дрозофилы // *Сборник научных статей: I Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» Харьков-2008*. С. 131-134.
5. Болоболова Е.У., Дорогова Н.В., Юдина О.С., Омелянчук Л.В., Чанг Л.Ш. Влияние эктопической экспрессии гена-супрессора опухоли *Merlin* на морфогенез митохондрий в сперматогенезе *Drosophila melanogaster* // *Сборник научных статей: I Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» Харьков-2008*. С. 107-119.
6. Yudina O.S., Perceva Y.A., Dorogova N.V., Omelyanchuk L.V., Chang L.S., Fehon R.G. The Role of Tumor-Suppressor Merlin Protein Domains in *Drosophila melanogaster* Spermatogenesis // the 8th Japanese *Drosophila* Research Conference. 2007. P. 124.
7. Юдина О.С., Нерушева О.О., Дорогова Н.В., Омелянчук Л.В. Визуализация динамики мембран ЭПР в спермио- и сперматогенезе с использованием GFP-маркеров на модели *Drosophila melanogaster* // *X Международная молодежная Школа-конференция, сентябрь 2006 г.* С. 53.

Подписано к печати 26.01.2009 г.
Формат бумаги 60 x 90 1/16, печ. л. 1, уч. изд. л. 0,7
Тираж 100. Заказ № 13

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10.

09-02934

2009A
2934