

На правах рукописи

Ахметова Катарина Артемовна

**РОЛЬ БЕЛКА PEANUT И ЕГО ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДОМЕНОВ В
КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССАХ У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

03.02.07 – генетика

Автореферат
Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в лаборатории генетики клеточного цикла, г.Новосибирск.

НАУЧНЫЙ
РУКОВОДИТЕЛЬ

кандидат биологических наук,
Фёдорова Светлана Александровна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ
ОППОНЕНТЫ

Москалев Алексей Александрович, д.б.н., доцент,
зав. лабораторией молекулярной радиобиологии и
геронтологии ФГБУН Институт биологии Коми НЦ
УО РАН

Похолкова Галина Витальевна, д.б.н., снс
лаборатории молекулярной цитогенетики, ФГБУН
Институт молекулярной и клеточной биологии СО
РАН

Ведущее учреждение

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Санкт-Петербургский Государственный
университет", г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится « 17 февраля » 2016 года на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 003.011.01, в ИЦиГ СО РАН, в конференц-зале Института по адресу: проспект Лаврентьева, 10, г. Новосибирск, 630090 Тел (383) 3634906, факс (383) 3331278, email: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru

Автореферат разослан «__» _____ 201 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
Доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Септины представляют собой группу консервативных ГТФ-азных белков, встречающихся у всех эукариот, кроме высших растений. Изначально септины были обнаружены в области перетяжки у почкующихся дрожжей, и была установлена их роль в цитокинезе. Однако, на сегодняшний день показано, что помимо цитокинеза септины участвуют в огромном спектре процессов, таких как установление клеточной полярности, клеточное движение, везикулярный транспорт, экзоцитоз, апоптоз и нейрогенез. Кроме того, в последние годы у млекопитающих была обнаружена связь между септинами и различными типами рака, а также нейродегенеративными заболеваниями (Mostowy, Cossart, 2012). В связи с этим, изучение белков данного семейства является на сегодняшний день актуальной задачей.

Важной характеристикой септинов является их способность взаимодействовать между собой с формированием гетеро-олигомерных комплексов, которые, в свою очередь, могут полимеризоваться в филаменты, что необходимо для выполнения септинами своих клеточных функций. В связи с филаментной организацией, а также на основе их взаимодействия с клеточной мембраной и выполняемыми функциями, септины стали рассматривать как четвертую составляющую цитоскелета, наряду с актином, микротрубочками и промежуточными филаментами. Однако, в отличие от других цитоскелетных компонентов, септины изучены гораздо слабее, что в особенности касается механизма сборки септиновых комплексов и филаментов, а также их роли в различных клеточных процессах.

Характерной особенностью септинов является наличие высококонсервативного ГТФ-связывающего домена. Ряд структурных и функциональных исследований указывают на его роль в регуляции сборки/разборки септиновых комплексов и филаментов, что может быть важно для регуляции динамики сборки септинов в ходе клеточного цикла. Однако в литературе имеются противоречивые данные по этому вопросу, и детальные механизмы этих процессов остаются до конца невыясненными. На С-концевом участке большинства септинов располагается консервативный биспиральный домен, который чаще всего участвует в белок-белковых взаимодействиях, что указывает на возможность регуляции динамики сборки септиновых филаментов белками-партнерами. Изучение взаимодействия септинов с другими белками является критическим шагом для понимания роли септинов, а также механизмов их функционирования в различных клеточных процессах.

У дрозофилы известно 5 представителей семейства септинов, три из которых – Sep1, Sep2 и Pnut (Peanut) образуют гетеромерный комплекс, способный формировать филаменты (Field *et al.*, 1996). Из трех септинов дрозофилы, входящих в состав комплекса, наибольший интерес представляет Pnut, так как он располагается по краям комплекса и участвует как в формировании комплексов, так

и в полимеризации комплексов с образованием филаментов. Кроме того, взаимодействие крайней субъединицы комплекса с белками-партнерами может играть регуляторную роль в динамике сборки септинов. Ранее было показано, что у дрозофилы белок Orc6, участвующий в репликации, взаимодействует с С-концевым доменом Pnut и оказывает стимулирующее действие на полимеризацию септиновых комплексов *in vitro*. Однако механизм такого стимулирующего действия точно не известен.

Для гена *pnut* ранее был получен нуль-аллель, представляющий собой делецию кодирующей части гена. Гомозиготы по нуль-аллелю летальны на стадии ранней предкуколки, и в соматических тканях таких особей обнаруживаются полиплоидные клетки, что согласуется с ролью септинов в цитокинезе. Однако, в отличие от соматических клеток, деления генеративных клеток у дрозофилы характеризуются неполным цитокинезом, в связи с чем важно было выяснить, какую роль играет септин Pnut в данном типе деления.

Так как септины являются высококонсервативными белками и характеризуются схожей доменной структурой у разных видов, все, что мы узнаем о септинах у дрозофилы, будет ценным для нашего понимания функций септинов у других эукариот. Септиновый комплекс дрозофилы гомологичен хорошо изученному комплексу человека, для которого в литературе имеются структурные данные. Четкое понимание того, как септины организованы и регулируются у дрозофилы, поможет выявить механизмы функционирования септинов у млекопитающих.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы было изучение септина Peanut, а также его отдельных функциональных доменов у *Drosophila melanogaster*. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- 1) Сконструировать плазмиду для эктопического подавления экспрессии гена *pnut* при помощи РНК-интерференции. Получить соответствующие трансгенные линии дрозофилы.
- 2) Изучить роль белка Pnut в оогенезе и сперматогенезе дрозофилы при помощи эктопического подавления экспрессии гена *pnut* при РНК-интерференции.
- 3) Проанализировать роль ГТФ-азного домена Pnut в функционировании септинового комплекса дрозофилы *in vitro*.
- 4) Охарактеризовать эффект мутаций в консервативных доменах Pnut *in vivo*.
- 5) Проанализировать эффект белка Orc6, а также ГТФ на формирование септиновых филаментов дрозофилы *in vitro*.

Научная новизна

Была получена уникальная плазида *pUASP-W* для проведения РНК-интерференции у дрозофилы, позволяющая изучать функции генов как в генеративных, так и в соматических клетках.

Впервые было показано, что снижение уровня экспрессии гена *pnut* в генеративных клетках семенников приводит к нарушению подвижности сперматозоидов. На модели оогенеза дрозофилы впервые было показано участие *pnut* в процессах поляризации ооцита.

Впервые как *in vitro*, так и *in vivo* была показана роль отдельных консервативных доменов септина Pnut в функционировании септиновых комплексов и филаментов дрозофилы.

Теоретическая и практическая значимость

Полученная в данной работе плаزمид *pUASP-W* для проведения РНК-интерференции может быть использована для изучения различных генов дрозофилы как в соматических, так и в генеративных клетках.

Результаты, полученные в данной работе, способствуют лучшему пониманию механизмов сборки и функционирования септиновых комплексов и филаментов, что имеет важное значение для дальнейших исследований в области пролиферации соматических и генеративных тканей, а также поддержания фертильности и формирования подвижных спермиев дрозофилы.

Положения, выносимые на защиту

1. Снижение экспрессии гена *pnut* в яичниках и семенниках дрозофилы не затрагивает деление генеративных клеток, но приводит к аномалиям оогенеза и сперматогенеза.
2. Целостность ГТФ-связывающего и С-концевого доменов Pnut критичны для выживания дрозофилы.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях, среди которых: 55th Annual Drosophila Research Conference, San Diego, USA, 2014; II международная конференция "Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии", Одесса, Украина, 2010; XLVIII Международная научная студенческая конференция "Студент и научно-технический прогресс", Новосибирск, Россия, 2010; XII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, Владивосток, Россия, 2009.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из них 4 работы – статьи в отечественной и зарубежной печати (в журналах, входящих в список ВАК).

Личный вклад автора

Основные результаты работы были получены и проанализированы автором самостоятельно. Цитологический анализ нарушений сперматогенеза и оогенеза дрозофилы проводился совместно с к.б.н. Федоровой С.А. и к.б.н. Дороговой Н.В.

Электронная микроскопия гонад сделана к.б.н. Болоболовой Е.У. Электронная микроскопия филаментов проводилась автором самостоятельно.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 115 страниц машинописного текста и состоит из введения, списка использованных сокращений, четырех глав, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Данные проиллюстрированы 12 таблицами и 31 рисунком. Библиографический указатель включает 143 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовался нуль-аллель гена *pnut* – *pnut^{XP}*, описанный ранее (Neufeld and Rubin, 1994). Плазмидная конструкция *pUASP-W-pnut_RNAi* для проведения РНК-интерференции гена *pnut* была получена переносом функциональной части вектора *pWIZ* (Lee and Carthew, 2003) в плазмиду *pUASP* с последующей встройкой фрагментов гена *pnut*. Трансформация в зародышевую линию дрозофилы проводилась согласно описанной ранее методике (Шилова и Омелянчук, 2007). Конструкции для трансформации, содержащие *pnut^{WT}* дикого типа, делеционный мутант *pnut(1-427)*, а также ГТФазные мутанты *pnut(G4)* и *pnut(G1,G3,G4)* были любезно предоставлены лабораторией д-ра Чеснокова (Бирмингем, США). Данные плазмиды содержат кДНК гена *pnut* (дикого типа или мутантную) под предполагаемым промотором (1.7 килобаз 5' UTR *pnut*). Все конструкции также содержат на 5' конце от кДНК *pnut* последовательность, кодирующую FLAG полипептид. Для мутанта *pnut(1-460)* получение конструкции проводилось автором самостоятельно. Трансформация проводилась в *w¹¹¹⁸* эмбрионов дрозофилы (Model System Genomics, Duke University, США). Цитологический анализ проводился по описанным ранее методикам (Лебедева и др., 2000; Dorogova *et al.*, 2008). Микроскопический анализ проводился на микроскопах Olympus BX61, Axioscope 2 plus и LSM 510 Meta. Рекомбинантные белки Pnut были экспрессированы в системе *E.coli*. Септиновые комплексы экспрессировали с использованием бакуловирусной системы, при этом субъединица Pnut содержала His-тэг на С-конце для упрощения очистки. Конструкты для экспрессии были любезно предоставлены лабораторией д-ра Чеснокова (Бирмингем, США). Очистка белков и комплексов, анализ ГТФ-азной активности полученных белков, а также электронная микроскопия проводились по методикам, описанным в (Huijbregts *et al.*, 2009). Электронно-микроскопический анализ проводился 2-х типов: на микроскопе FEI Tecnai F20 для изучения филаментообразования комплексов *in vitro*, и на ТЭМ микроскопе Libra 120 для ультраструктурного анализа спермиогенеза *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние продукта гена *pnut* на деления соматических и генеративных клеток.

В работе использовался нуль-аллель гена *pnut* - мутация *pnut*^{XP}, вызывающая гибель мух на стадии ранней предкуколки. Ранее было показано, что ткани гомозигот по нуль-аллелю содержат полиплоидные клетки (Neufeld and Rubin, 1994). Для выявления роли гена *pnut* в делении соматических клеток, мы провели более тщательный цитологический анализ митозов в клетках нервных ганглиев

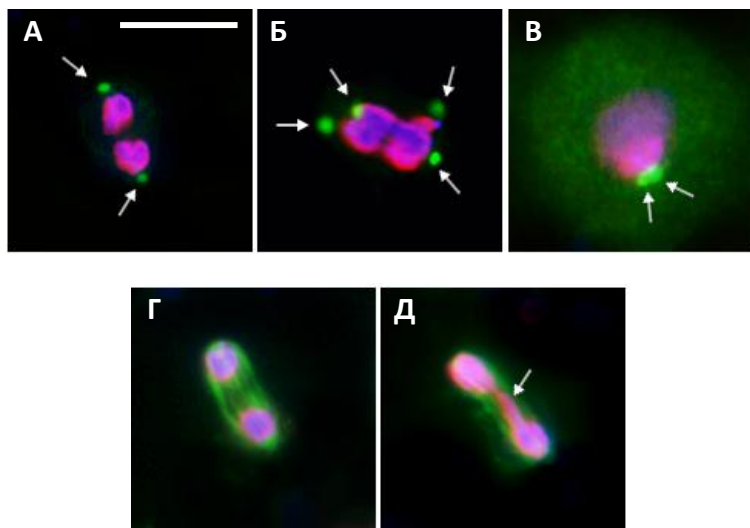


Рис. 1. Аномалии митоза в клетках нервных ганглиев личинок *pnut*^{XP}/*pnut*^{XP}. (А), (Г) нормальная анафаза, (Б) мультиполярная анафаза, (В) монополярная анафаза как следствие нерасхождения centrosом, (Д) анафаза с хромосомным мостом. А, Б, В: окраска на γ -тубулин (зеленый) и рН3 гистон (красный). Г, Д: окраска на α -тубулин (зеленый) и рН3 гистон (красный).

личинки, гомозиготных по *pnut*^{XP}. У мутантов наблюдались нарушения цитокинеза, что было ожидаемо согласно литературным данным. Однако, помимо нарушений цитокинеза, мы обнаружили аномалии прикрепления хромосом к веретену, нерасхождение centrosом, а также хромосомные мосты, что ранее показано не было (Рис. 1). Полученные данные указывают на участие продукта гена *pnut* в делении соматических клеток, при этом его роль не ограничивается цитокинезом, что свидетельствует о плеiotропности действия гена.

Мы полагаем, что белки семейства септинов у животных, в частности у дрозофилы, не так важны для цитокинеза, как у дрожжей. У дрожжей, делеция любого из септинов, входящих в состав септинового комплекса, приводила к дефектам цитокинеза (Hartwell, 1971). Мы показали, что у дрозофилы частота полиплоидных клеток в нервных ганглиях нуль-аллельных по *pnut* личинок составляла около 20%. В более ранней работе, авторы обнаружили всего 10% полиплоидных клеток (Somma *et al.*, 2002). РНК-интерференция *pnut* в культуре клеток дрозофилы S2 также не приводила к сильному блокированию цитокинеза (Somma *et al.*, 2002). Вместе, эти данные указывают на то, что большинство клеток были способны успешно совершить цитокинез. У почкующихся дрожжей септины формируют организованное кольцо филаментов в перешейке почки задолго до начала цитокинеза, таким образом устанавливая сайт деления, привлекая и закрепляя большинство белков, вовлеченных в цитокинез, включая миозин II и актин (Dobbelaere, Barral, 2004). В животных же клетках септины находятся в нисходящих отделах сигнального пути цитокинеза. Кроме того, не так давно для некоторых типов клеток млекопитающих

было показано наличие альтернативных септин-независимых путей цитокинеза (Menon, Gaestel, 2015).

Так как гомозиготы по нуль-аллелю гена *pnut* не доживают до стадии имаго, то для того чтобы изучить роль данного гена в делении генеративных клеток, был использован метод РНК-интерференции. На основе существующего вектора для создания РНК-интерференционных линий дрозофилы *pWIZ* (Lee and Carthew, 2003) мы сконструировали плазмиду *pUASP-W*. Данная плазмидная конструкция позволяет запускать РНК-интерференцию как в соматических, так и в генеративных клетках, в отличие от *pWIZ*, обеспечивающей экспрессию только в соматических клетках. Для проведения РНК-интерференции гена *pnut* далее была создана конструкция *pUASP-W-pnut_RNAi*, для которой были получены соответствующие трансгенные линии дрозофилы. Для запуска РНК-интерференции гена *pnut* линию, несущую инсерцию конструкции, скрещивали с разными ткане- или стадио-специфическими энхансерами (*GAL4*-драйверами). Функциональность конструктора была проверена при помощи Вестерн-блоттинга с использованием антител на Pnut.

Был проведен цитологический и морфологический анализ сперматогенеза и оогенеза у мух с РНК-интерференцией гена *pnut*, запущенной при помощи драйвера *nanos-GAL4*, специфического к генеративным клеткам. Нарушения деления сперматоцитов у таких самцов встречались крайне редко (примерно на уровне дикого типа). У самок, чтобы оценить предмейотические деления генеративных клеток яичников, мы проводили анализ количества питающих клеток в яйцевых камерах. Большинство яйцевых камер содержали 15 питающих клеток и один ооцит, как в норме (проанализировано по 180 яйцевых камер).

Таким образом, продукт гена *pnut* принимает участие в делении соматических клеток, однако не является критичным для деления генеративных клеток как семенников, так и яичников дрозофилы. Полученные данные согласуются с ранней работой на мозаичных клонах, в которой авторы показали отсутствие дефектов в делении генеративных клеток яичников при снижении количества продукта гена *pnut* в зародышевой линии (Adam *et al.*, 2000). Мы предполагаем, что наблюдаемый эффект объясняется разными механизмами цитокинеза в соматических и генеративных клетках. В частности, для генеративных клеток характерен неполный цитокинез, при котором клетки не разделяются полностью и остаются в синцитии.

Анализ нарушений оогенеза при эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut*.

Нормальное развитие будущего яйца закладывается в ходе оогенеза в яйцевой камере, соматическая составляющая которой – фолликулярные клетки – не менее важна, чем генеративная. В частности, сигналы, происходящие из фолликулярных клеток, необходимы для правильной поляризации (установлении передне-задней оси) яйцевой камеры. Самки, несущие одновременно конструкцию *pUASP-W-pnut_RNAi* и повсеместный драйвер *Actin5c-GAL4*, работающий как в генеративных,

так и в соматических клетках, доживали до стадии имаго и были фертильны. Как и при использовании драйвера *nanos-GAL4*, нарушений делений генеративных клеток обнаружено не было. Однако анализ оогенеза выявил следующие аномалии (Рис. 2): нарушение поляризации яйцевых камер, отсутствие интерфолликулярных клеток между некоторыми яйцевыми камерами, нарушение цитокинеза в клетках хориона, нарушение структуры хроматина в фолликулярных клетках. Для более детального анализа было проведено эктопическое подавление экспрессии на отдельных стадиях оогенеза с использованием специфических драйверов. Практически все комбинации подтвердили фенотип, наблюдаемый при запуске повсеместного драйвера.

Нарушения цитокинеза и структуры хроматина были ожидаемы, так как известно, что Pnut участвует в цитокинезе, и что он взаимодействует с белком Orc6, участвующем в репликации (Chesnokov *et al.*, 2003). В поляризации яйцевой камеры важную роль играет реорганизация цитоскелета, тесно связанная с сигналами, поступающими из специализированных полярных фолликулярных клеток. Поскольку для септинов показано участие в регуляции как актинового, так и микротрубочкового цитоскелетов (Mostowy, Cossart, 2012), мы полагаем, что Pnut таким образом участвует в поляризации в оогенезе. Отсутствие интерфолликулярных клеток при подавлении экспрессии гена *pnut* сигнализирует о нарушении работы полярных клеток, играющих важную роль в поляризации ооцита.

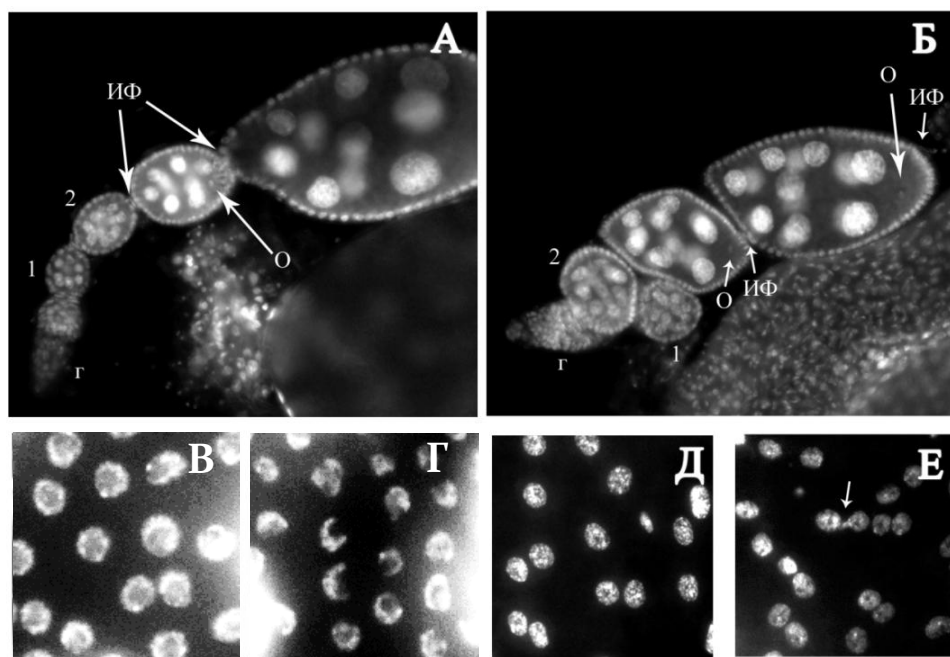


Рис. 2. Аномалии оогенеза при РНК-интерференции гена *pnut* в яичниках дрозофилы. (А)

Овариола дикого типа. Яйцевые камеры отделены друг от друга интерфолликулярными клетками (ИФ) и располагаются «в ряд». (Б) Нарушение поляризации яйцевых камер при РНК-интерференции гена

pnut. ИФ либо отсутствуют, либо смещены относительно передне-задней оси яйцевой камеры. (В) Нормальная конденсация хроматина в фолликулярных клетках. (Г) Нарушение конденсации при РНК-интерференции *pnut*. (Д) Нормальные ядра хориона. (Е) Гантелеобразные ядра хориона (стрелка) как результат нарушения цитокинеза при РНК-интерференции *pnut*. О – ооцит, Г- гермарий, 1,2 – яйцевые камеры на первой, второй стадиях развития соответственно. Окраска DAPI.

Анализ нарушений сперматогенеза при эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut*.

При подавлении экспрессии гена *pnut* драйверами *Actin5c-GAL4*, *tubulin-GAL4* и *nanos-GAL4*, экспрессирующимися на всех стадиях сперматогенеза, включая самые ранние, наблюдался идентичный эффект: примерно в 60% семенных пузырьков сперматозоиды были неподвижны. Подавление экспрессии на более поздних стадиях (на стадии предмейотических сперматоцитов, драйверы *bam-GAL4*, *chif-GAL4*) не приводило к нарушению подвижности спермиев. Таким образом, чувствительными к РНК-интерференции гена *pnut* являются генеративные клетки на самых ранних этапах сперматогенеза, однако эффект снижения экспрессии *pnut* проявляется на поздних стадиях, в ходе спермиогенеза, выражаясь в неподвижности спермиев.

Так как мы показали, что продукт гена *pnut* не критичен для делений генеративных клеток, то нарушения данного процесса не могли быть причиной стерильности спермиев. Чтобы выяснить причины неподвижности спермиев при РНК-интерференции *pnut*, был проведен электронно-микроскопический (ЭМ) анализ семенников, выделенных из стерильных самцов. В целом, аналогичные исследования проводились на млекопитающих. Было показано, что у млекопитающих SEPT4 и SEPT7 (гомолог Pnut) необходимы для формирования особой кольцеподобной мембранной структуры – аннулуса, которая разделяет хвост сперматозоида на различающиеся компартменты. У нокаутных по SEPT4 мышей наблюдалось нарушение или отсутствие аннулуса, нарушение ультраструктурной организации митохондрий, приводящие к неподвижности спермиев и стерильности (Kissel *et al.*, 2005; Lhuillier *et al.*, 2009). Однако в сперматозоидах дрозофилы структуры, подобной аннулусу, не наблюдается. Более того, при подавлении экспрессии *pnut* у дрозофилы, ультраструктурных изменений митохондрий и аксонем (основных компонент, отвечающих за подвижность спермиев) мы не наблюдали.

Помимо митохондрий и аксонемы, в обеспечении подвижности сперматозоида принимает участие базальное тело, представляющее собой модифицированную центриоль, которая располагается в основании аксонемы и необходима для ее сборки. В ходе элонгации сперматиды вокруг базального тела в виде воротничка формируется электронно-плотная структура, называемая центриолярный придаток (centriolar adjunct). Центриолярный придаток напоминает перицентриолярный материал центросом, однако функции этой структуры до сих пор не выяснены. Мы обнаружили, что центриолярный придаток в семенниках самцов с РНК-интерференцией гена *pnut* имеет дефекты в морфологии, кроме того, запаздывает его реструктуризация к более поздним стадиям (**Рис. 3**).

Как дефекты в этой структуре связаны с неподвижностью спермы, пока не ясно. Возможно, что наблюдаемые нами дефекты в центриолярном придатке на самом деле отражают аномалии базального тела, которое непосредственно принимает участие в обеспечении подвижности сперматозоида. Мы ожидаем, что

более тщательный электронно-микроскопический и иммунофлуоресцентный анализ морфологии и структуры базального тела и центриолярного придатка в будущем помогут выяснить точные причины стерильности самцов при РНК-интерференции *pnut*.

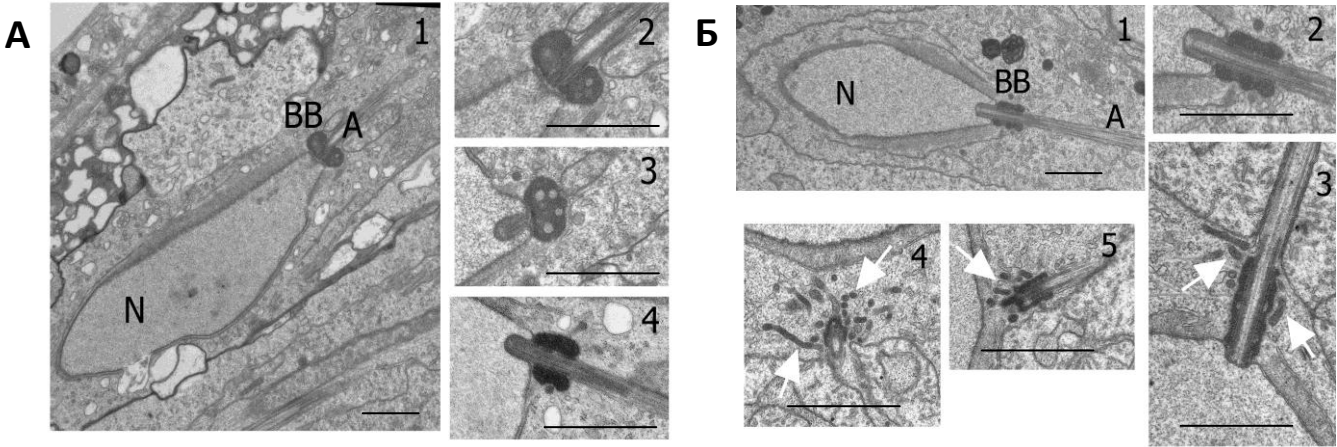


Рис. 3. Электронно-микроскопический анализ базального тела сперматид. (А) ЭМ фотографии срезов сперматид дикого типа. N – ядро сперматиды, BB – базальное тельце (basal body), A – аксонема. 1,2 – срез почти продольный ядру, слегка по касательной к аксонеме (2 – увеличение 1), 3 – срез сильно по касательной к аксонеме, 4 – продольный аксонеме срез, стадия сперматиды чуть более ранняя, чем на 1-3. Структура центриолярного придатка, окружающего базальное тельце, округлая, внутри видны вакуоли. Чем более продвинутая стадия сперматиды, тем более округлым выглядит центриолярный придаток. (Б) ЭМ фотографии срезов сперматид *pnos-GAL4/pnut-RNAi*. 1-3 – продольные аксонеме срезы (2 – увеличение 1), 4 – срез перпендикулярно аксонеме, 5 – срез по касательной к аксонеме. Центриолярный придаток выглядит сильно вытянутым, неровной формы, вокруг него множество включений (стрелки). Масштаб 1 мкм.

Влияние мутаций в функциональных доменах *Pnut in vitro*.

Белок *Pnut* имеет характерный для всех септинов ГТФ-азный домен, содержащий три консервативных мотива G1, G3 и G4, необходимых для связывания ГТФ. На С-концевом участке белка располагается биспиральный домен,

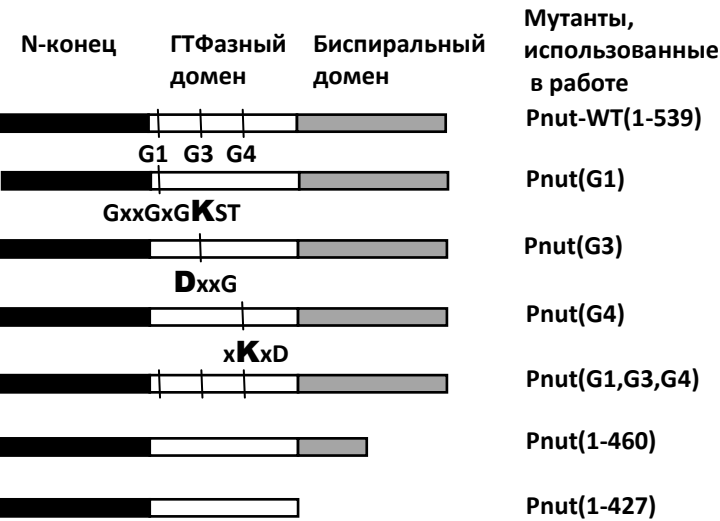


Рис. 4. Доменная структура белка *Pnut*.

ответственный за белок-белковые взаимодействия (Рис. 4). В настоящей В настоящей работе были использованы одиночные мутации в консервативных мотивах ГТФазного домена белка *Pnut* - (G1), (G3), (G4), а также тройная мутация (G1,G3,G4). Кроме того, в работе использовались делеционные формы белка *Pnut* с нарушенным С-концевым доменом - *Pnut* (1-427) и *Pnut* (1-460). Индивидуальные белки дикого

типа, а также мутантные, были экспрессированы в системе *E.coli*, очищены и проанализированы на ГТФ-азную активность. Белок Pnut дикого типа гидролизовал, а также включал ГТФ с низкой скоростью, что согласуется с литературными данными, известными для человеческого гомолога Pnut – SEPT7 (Zent *et al.*, 2013). Мутации консервативных мотивов ГТФ-азного домена Pnut, использованные нами в работе, нарушали как гидролиз, так и обмен нуклеотида, что подтверждает важность мутированных аминокислот для ГТФазной активности белка. Укороченные формы Pnut с делецией С-концевого домена имели повышенную ГТФазную активность по сравнению с белком дикого типа. Мы полагаем, что этот фрагмент играет регуляторную роль, соединяясь с белками-партнерами (примером является белок Orc6, см. ниже).

Септины взаимодействуют друг с другом с формированием линейных комплексов. Хорошо охарактеризован септиновый комплекс человека, представляющий собой неполярный гексамер SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 (Sirajuddin *et al.*, 2007). На основании гомологии последовательностей между септинами человека и дрозофилы (Pan *et al.*, 2007) было предположено, что септиновый комплекс дрозофилы представляет собой гексамер Pnut-Sep2-Sep1-

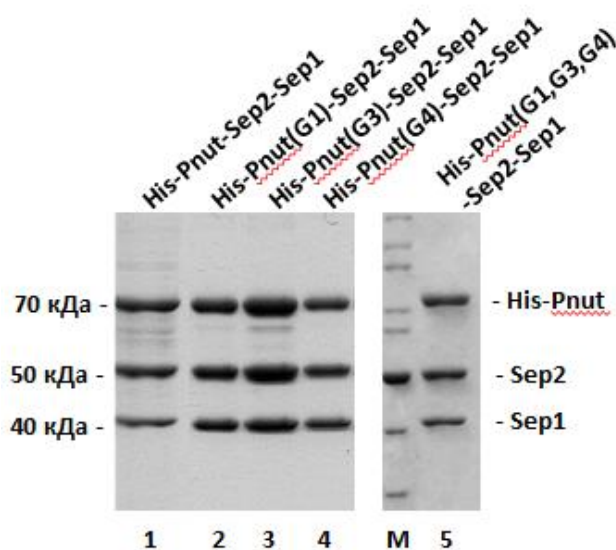


Рис. 5. Очистка рекомбинантных септиновых комплексов. На ПААГ геле, окрашенном кумасси, отображены очищенные из бакуловирусной системы экспрессии рекомбинантные комплексы, содержащие His-Pnut (мутантный или дикого типа), Sep1 и Sep2 дикого типа.

Sep1-Sep2-Pnut (Huijbregts *et al.*, 2009).

Из литературных данных известно, что делеция С-концевого домена Pnut предотвращает сборку септинового комплекса (Huijbregts *et al.*, 2009). Чтобы определить роль мотивов ГТФазного домена для формирования комплекса, мы экспрессировали септиновые белки Pnut (мутантные или дикого типа) одновременно с Sep1 и Sep2 дикого типа с использованием бакуловирусной системы экспрессии с целью получения септинового комплекса. Мутации в ГТФазном домене Pnut не нарушали способность белка входить в состав комплекса с Sep1 и Sep2 *in vitro* (Рис. 5). Полученный результат согласуется со структурными данными, согласно которым конформация субъединицы SEPT7

(гомолог Pnut у человека) такова, что ее ГТФ-азный домен не принимает участия во взаимодействии с другими септиновыми субъединицами, входящими в состав комплекса (Sirajuddin *et al.*, 2007).

Влияние мутаций в консервативных доменах Pnut *in vivo*.

Чтобы исследовать влияние мутаций в ГТФ-азном домене, а также делеций С-концевого участка белка Pnut *in vivo*, были использованы трансгенные линии мух, содержащие соответствующие мутантные формы *pnut* под нативным промотором этого гена. Экспрессия трансгена дикого типа *pnut*^{WT}(1-539) приводила к восстановлению жизнеспособности *pnut*^{XP} летального нуль-аллеля. Ни одна из усеченных или мутантных форм Pnut (трансгены *pnut*(1-427), *pnut*(1-460), *pnut*(G4) и *pnut*(G1,G3,G4)) не обеспечивала полного восстановления жизнеспособности. Был проведен цитологический анализ органов личинок, экспрессирующих мутантные трансгены на фоне нуль-аллеля. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами на Pnut показало, что делеция С-концевого домена приводила к формированию агрегатов данного септина в клетках (Рис. 6Б, Д). Подобные агрегаты наблюдали и ранее, при экспрессии белка Pnut с делетированным С-концом в L2 культуре клеток дрозофилы (Huijbregts *et al.*, 2009). Мутации в ГТФазном домене белка также приводили к отсутствию характерной локализации Pnut в органах и тканях, вместо этого обнаруживалась диффузная окраска в области плазматической мембраны, а также по всей клетке (Рис. 6В, Е).

Нарушения цитокинеза в соматических тканях личинок (на модели клеток нервных ганглиев) были обнаружены только для ГТФазного мутанта, у которого были мутированы все три консервативных мотива - *pnut*(G1,G3,G4). В данном случае, фенотип мутанта практически не отличался от нуль-аллеля – отсутствовали

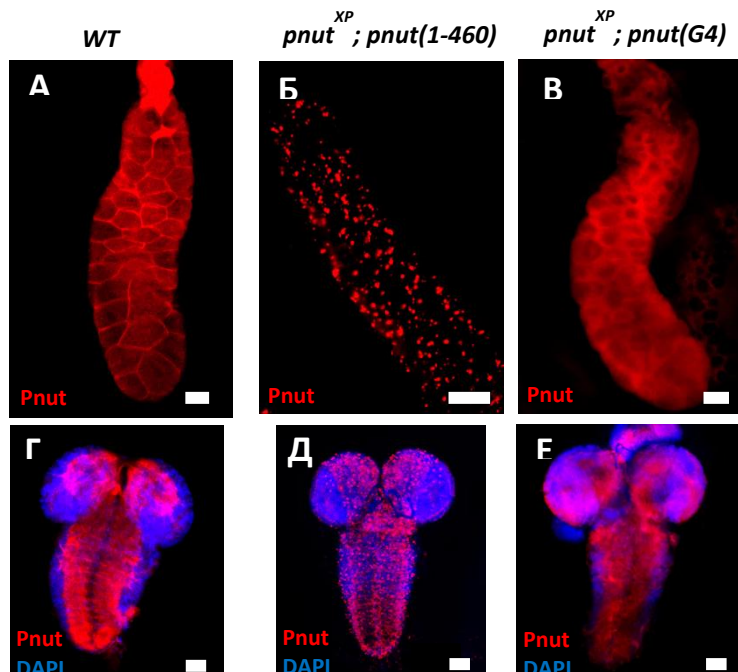


Рис. 6. Нарушения локализации мутантных белков Pnut *in vivo*. (А-В) Слюнные железы личинок третьего возраста. Окрашка на Pnut (красный). (Г-Е) Нервные ганглии личинок третьего возраста. Окрашка на Pnut (красный) и DAPI (синий). Масштаб 50 мкм. WT - линия дикого типа *Canton S*.

имагинальные диски, нервные ганглии содержали полиплодные клетки. У остальных проанализированных мутантов *pnut*(G4), *pnut*(1-460) и *pnut*(1-427), экспрессированных на фоне нуль-аллеля, имажинальные диски формировались, и полиплоидии в нервных ганглиях обнаружено не было. Мы полагаем, что эти мутации спасают цитокинетические дефекты нуль-аллеля *pnut*^{XP}, однако не спасают другие процессы, в которых задействованы септины. Например, некоторые из септинов млекопитающих являются специфичными для нейронов (Dolat *et al.*, 2014). Высокий уровень экспрессии *pnut* в нервной системе дрозофилы, а

также наличие специфичного паттерна экспрессии (**Рис. 6Г**), несомненно, указывают на продукта данного гена в функционировании этой системы. Стоит также отметить, что ген *pnut* изначально был открыт как ген, участвующий в развитии фоторецепторов, и уже потом были показаны его локализация в борозде деления и участие в цитокинезе (Neufeld and Rubin, 1994). Поскольку Pnut является гомологом повсеместно экспрессирующегося септина млекопитающих SEPT7, логично ожидать, что цитокинетическая функция представляет собой лишь одну из большого спектра клеточных функций, в которых участвует данный септин.

Влияние ГТФ и Orc6 на формирование септиновых филаментов.

Линейные септиновые комплексы обладают способностью полимеризоваться с формированием длинных филаментов. Принято считать, что септины выполняют свои функции в клетке именно в форме филаментов. На основании гомологии с септиновым комплексом происходит за счет взаимодействия между субъединицами Pnut, находящимися по краям соседних комплексов (Huijbregts *et al.*, 2009) (**Рис. 7**). В данной работе филаментообразование наблюдали с помощью электронной

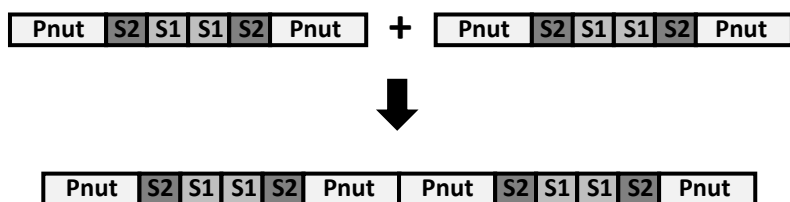


Рис. 7. Схема формирования септиновых филаментов дрожзифы.

микроскопии (ЭМ), используя негативное окрашивание. При низких концентрациях комплекса (10-20 нг/мкл), наблюдались мономеры и димеры (**Рис. 8А**). При больших концентрациях (100 нг/мкл и более) (**Рис. 8Б**), а

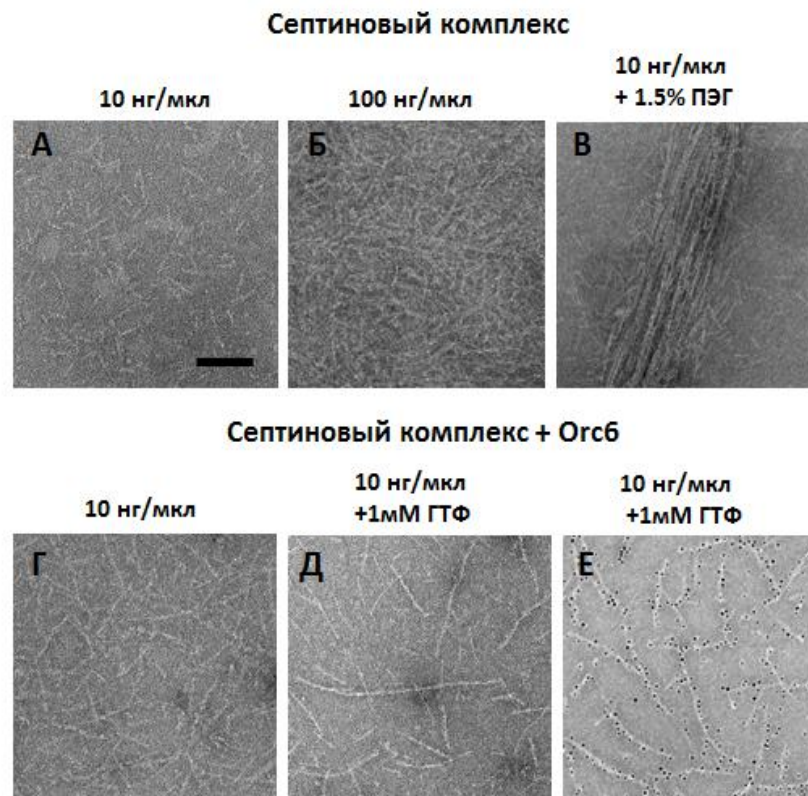
также при добавлении полиэтиленгликоля (ПЭГ) (**Рис. 8В**), комплексы самополимеризуются с формированием филаментов, а также пучков филаментов. Такая зависимость формирования филаментов от концентрации комплекса, а также эффект ПЭГ были описаны и ранее другими авторами (Field *et al.*, 1996), (Huijbregts *et al.*, 2009).

Вопрос регуляции формирования филаментов является крайне важным для изучения септинов. Сборка септиновых филаментов, по-видимому, является обратимым процессом *in vivo*, что подразумевает существование системы регуляции динамики септинов внутри клетки. Белок Orc6 представляет собой малую субъединицу ORC комплекса, необходимого для инициации репликации. Не так давно было показано, что Orc6 взаимодействует с С-концом Pnut *in vitro*, а также способствует формированию септиновых филаментов (Huijbregts *et al.*, 2009). В настоящей работе мы провели более подробный ЭМ анализ Orc6-зависимой полимеризации.

При низких концентрациях септинового комплекса, недостаточных для самополимеризации, добавление Orc6 стимулирует формирование септиновых филаментов (**Рис. 8Г**). Чтобы выявить механизм наблюдаемого полимеризующего эффекта Orc6, мы визуализировали данный белок в реакции формирования

Рис. 8. ЭМ анализ формирования септиновых филаментов.

Рекомбинантный септиновый комплекс дикого типа (**А**) при низкой концентрации, (**Б**) при высокой концентрации, а также (**В**) при добавлении ПЭГ. (**Г,Д,Е**) Добавление Orc6, а также ГТФ стимулирует формирование септиновых филаментов. На (**Е**) показана окраска при помощи модифицированного иммуно-золота, выявляющая локализацию Orc6 на септиновых филаментах. Масштаб 100 нм.



септиновых филаментов

при помощи модифицированного иммунозолота. Как показано на (**Рис. 8Е**), молекулы Orc6 специфически локализовались вдоль септиновых филаментов, и оставались связанными с ними после полимеризации. Кроме того, мы показали, что Orc6 стехиометрически связывался с комплексом в соотношении ~2 молекулы Orc6 на один гексамер, что согласуется с наличием двух молекул Pnut в мономере. Таким образом, Orc6 участвует в полимеризации септинов за счет белок-белковых взаимодействий, а не как уплотняющий агент наподобие ПЭГ.

Ряд исследований указывают на роль ГТФ в функционировании септинов. Согласно структурным данным, ГТФ-азный домен SEPT7 (человеческий гомолог Pnut) принимает непосредственное участие в формировании филаментов (Sirajuddin *et al.*, 2007). В данной работе мы проанализировали влияние ГТФ в Orc6-зависимом формировании септиновых филаментов. Добавление высоких концентраций ГТФ (вплоть до 1 mM) приводило к построению статистически более длинных филаментов в присутствии Orc6 (**Рис. 8Д**). Мы полагаем, что гидролиз ГТФ в ГДФ в активном сайте Pnut приводит к более тесному контакту между двумя Pnut субъединицами соседних комплексов, стабилизируя формирующиеся филаменты и препятствуя их разборке. Известно, что SEPT7 формировал более плотные димеры в ГДФ-связанном состоянии по сравнению с ГТФ-связанным состоянием (Wittinghofer and Zent, 2013).

Септиновые комплексы, содержащие Pnut с мутациями в ГТФ-азном домене, обнаруживали сниженную способность формировать филаменты как при самополимеризации при высоких концентрациях, так и в присутствии Orc6 при низких концентрациях комплекса. Наиболее сильный эффект имела мутация в мотиве G4, а также тройная мутация во всех трех мотивах G1,G3,G4. Сделанные нами замены аминокислот нарушали ГТФазную активность и связывание ГТФ Pnut,

и, по всей видимости, структуру ГТФазного домена. Такие мутантные белки не были способны ассоциировать друг с другом, таким образом препятствуя полимеризации септиновых гексамеров, которая должна происходить за счет взаимодействия ГТФ-азных доменов белков Pnut из соседних комплексов.

Таким образом, полученные нами данные, а также известные в литературе, указывают на структурную, а не регуляторную роль связывания и гидролиза ГТФ в функционировании септинового комплекса, в частности, в формировании филаментов.

На основании полученных данных нами была предложена модель Orc6-зависимого формирования септиновых филаментов, представленная на **Рис. 9**. Orc6

связывается с субъединицами Pnut, располагающимися по краям септинового комплекса. Связывание с Orc6 стимулирует гидролиз ГТФ Pnut, в результате чего субъединицы Pnut формируют более плотные контакты между собой, таким образом, стабилизируя сформировавшиеся филаменты.

Наблюдаемый эффект Orc6 на динамику септинов указывает на возможность связи

между сигнальными путями репликации и цитокинеза. Возможно, взаимодействие Orc6 с септиновыми комплексами играет роль в переходе от завершения репликации к делению клетки и сборке септинового кольца в будущем сайте цитокинеза.

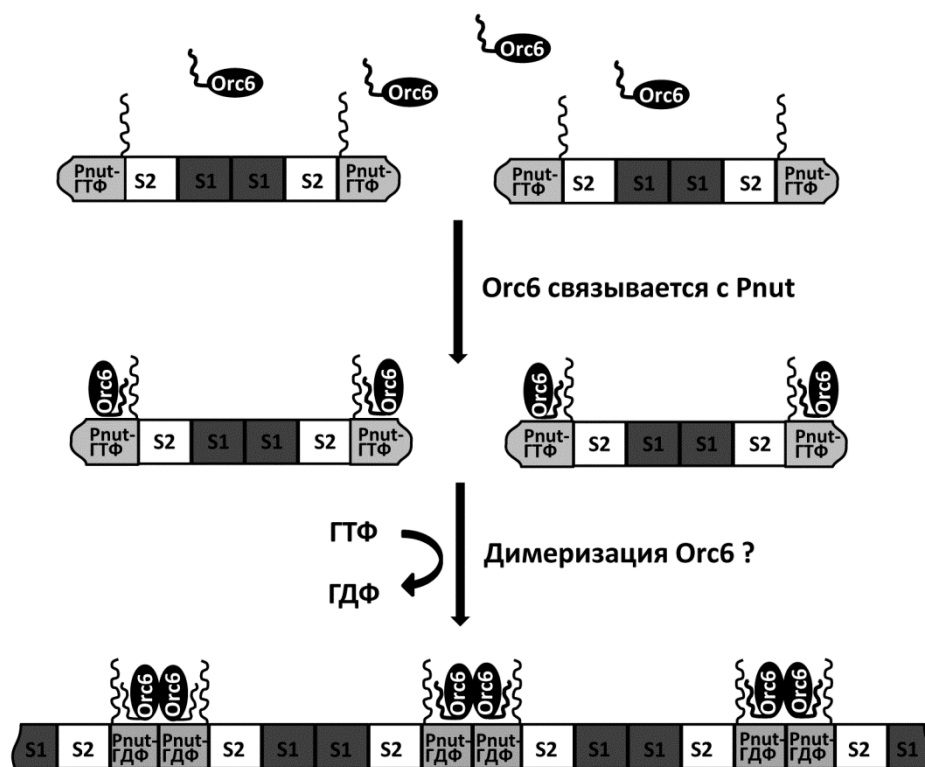


Рис. 9. Модель стимулирующего влияния Orc6 и ГТФ на формирование септиновых филаментов дрозофилы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Септины изначально были открыты как белки, участвующие в цитокинезе. В данной работе мы показали, что в соматических клетках мутации в гене *pnut* приводят не только к нарушениям цитокинеза, но также к аномалиям сегрегации хромосом. При помощи метода РНК-интерференции нам удалось выявить влияние снижения экспрессии *pnut* на процессы оогенеза и сперматогенеза. Мы показали, что продукт гена *pnut* не критичен для делений генеративных клеток как семенников, так и яичников дрозофилы. Однако, снижение экспрессии *pnut* у

самцов приводило к высокому проценту неподвижных спермиев и стерильности, что по предварительным данным, вызвано дефектами базального тела спермия. Самки с РНК-интерференцией *pnut* были фертильны, однако у них обнаруживались нарушения поляризации яйцевых камер. Аномалии делений соматических клеток, а также многообразие дефектов оогенеза и сперматогенеза при снижении экспрессии *pnut* в гонадах указывают на плеiotропность действия гена *pnut*, его вовлеченность во множество других клеточных функций, не ограниченных цитокинезом. Дальнейшие исследования необходимы, чтобы выяснить спектр сигнальных путей и процессов, в которых задействованы септины.

В данной работе мы также показали, что как ГТФазный, так и С-концевой консервативные домены септина Pnut дрозофилы важны для выживания до стадии имаго. Мутации в данных функциональных доменах нарушали либо формирование септинового комплекса (делеции С-конца, Huijbregts et al., 2009), либо филаментообразование (ГТФ-азные мутанты, настоящая работа) *in vitro*. *In vivo*, ни один из мутантов не спасал нуль-аллель гена *pnut*, кроме того, для обоих типов мутантов была обнаружена неправильная локализация мутантного белка в органах и тканях дрозофилы. Следовательно, в согласии с литературными данными, комплексы и филаменты являются функциональной формой септинов в клетках.

В данной работе нами было продемонстрировано, что репликационный белок Orc6 стехиометрически связывается с септиновыми комплексами и стимулирует их полимеризацию, при этом добавление ГТФ в реакцию приводит к построению более длинных филаментов. Полученные результаты указывают на пути регуляции динамики септиновых филаментов, в частности, на возможную связь между сигнальными путями репликации и цитокинеза.

ВЫВОДЫ

- 1) Была сконструирована плазмида *pUASP-W-pnut_RNAi* для эктопического подавления экспрессии гена *pnut* при помощи РНК-интерференции, и получены соответствующие трансгенные линии дрозофилы.
- 2) Показано, что продукт гена *pnut* не является критичным для делений генеративных клеток как в семенниках, так и в яичниках дрозофилы.
- 3) Снижение уровня экспрессии гена *pnut* в семенниках дрозофилы приводит к стерильности самцов, причиной которой является неподвижность спермиев.
- 4) Снижение уровня экспрессии гена *pnut* в яичниках дрозофилы приводит к следующим аномалиям оогенеза: нарушение поляризации яйцевых камер, нарушение цитокинеза в клетках хориона и нарушение структуры хроматина в фолликулярных клетках. Обнаруженные дефекты указывают на роль продукта гена *pnut* в соматических клетках, входящих в состав яичников.
- 5) Показано, что мутации в ГТФ-азном домене Pnut не влияют на формирование септинового комплекса Pnut-Sep2-Sep1-Sep1-Sep2-Pnut, однако препятствуют полимеризации комплексов при формировании септиновых филаментов.

- 6) Мутантные белки с делетированным С-концевым доменом - Pnut(1-460 а/к) и Pnut(1-427 а/к), а также с мутациями в ГТФ-азном домене белка - Pnut(G4) и Pnut(G1,G3,G4) - имеют нарушенную клеточную локализацию и не восстанавливают жизнеспособность летального нуля-аллеля *pnut*.
- 7) При помощи электронной микроскопии показано, что Orc6 способствует формированию септиновых филаментов, непосредственно связываясь с септиновым комплексом в соотношении 2 молекулы Orc6 на один комплекс. Добавление высоких концентраций ГТФ приводит к формированию более длинных филаментов в присутствии Orc6.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Akhmetova K**, Balasov M, Huijbregts RP, Chesnokov I. Functional insight into Orc6 role in septin complex filament formation in *Drosophila* // Mol Biol Cell. – 2015. – Vol. 26. – P. 15-28.
2. **Ахметова К.А.**, Дорогова Н.В., Чесноков И.Н., Федорова С.А. Анализ фенотипического проявления подавления экспрессии гена *peanut* с помощью RNAi в оогенезе дрозофилы // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 9. – С. 991-999.
3. **Ахметова К.А.**, Дорогова Н.В., Болоболова Е.У., Чесноков И.Н., Федорова С.А. Роль белка Peanut и его функциональных доменов в сперматогенезе *Drosophila melanogaster* // Вавил. Журн. Генетики и селекции. – 2016. – № 3. Принято в печать.
4. **Akhmetova K**, Balasov M, Huijbregts RP, Chesnokov I. The role of Orc6 in septin complex functions in *Drosophila* // Regular abstracts. 55th Annual *Drosophila* Research Conference. – 2014. – P. 60.
5. **Ахметова К.А.**, Федорова С.А. Влияние мутаций в гене *pnut* на деление соматических и генеративных клеток *Drosophila melanogaster* // Вавил. Журн. Генетики и селекции. – 2011. – Т.15. – № 4. – С. 653-660.
6. **Ахметова К.А.**, Болоболова Е.У., Федорова С.А. Влияние мутаций в гене *pnut* на деление соматических и генеративных клеток *Drosophila melanogaster* // Сборник трудов II Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии». – 2010. – С. 72-74.
7. **Ахметова К.А.** Влияние мутаций в гене *pnut* на цитокinesis в генеративных и соматических клетках *Drosophila melanogaster* // Материалы XLVIII Международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс". – 2010. – С. 214.
8. **Ахметова К.А.**, Федорова С.А. Мутация в гене *peanut* вызывает нарушение сегрегации хромосом в клетках нервных ганглиев личинок *Drosophila melanogaster* // Сборник научных трудов I Международной конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии». – 2008. – С. 105-106.