

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

на правах рукописи

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

03.02.07 – генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Федорова Светлана Александровна

Новосибирск - 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Цитокинез в животных клетках.....	11
1.1.1. Общие принципы цитокинеза.....	11
1.1.2. Особенности делений в генеративных клетках дрозофилы.....	12
1.2. Общая характеристика семейства септинов.....	13
1.2.1. Эволюционная консервативность септинов.....	14
1.2.2. Физические свойства септинов.....	16
1.2.3. Септиновые филаменты.....	19
1.2.4. Регуляция сборки септиновых филаментов.....	20
1.3. Молекулярные функции септинов.....	22
1.3.1. Септины как скаффолд.....	23
1.3.2. Септины как диффузные барьеры.....	24
1.3.3. Взаимодействие с актином и микротрубочками.....	27
1.4. Ассоциация с различными заболеваниями человека.....	29
1.5. Септины дрозофилы.....	31
1.5.1. Характеристика септинов дрозофилы.....	32
1.5.2. Септиновый комплекс дрозофилы.....	33
1.5.3. Роль септинов в цитокинезе дрозофилы.....	34
1.5.4. Роль септинов в целлюляризации.....	35
1.5.5. Взаимодействие септинов дрозофилы с другими белками.....	36
Заключение по обзору литературы.....	38
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
2.1. Линии дрозофилы, использованные в работе, и работа с ними.....	39
2.2. Детекция β -галактозидазы в различных органах дрозофилы.....	40
2.3. Препараты митозов нервных ганглиев.....	40
2.4. Получение плазмидной конструкции для проведения РНК-интерференции гена <i>pnut</i>	40
2.5. Получение трансгенных линий дрозофилы.....	41
2.6. Иммунохимическое окрашивание органов дрозофилы.....	41

2.6.1. Приготовление давленных препаратов семенников и нервных ганглиев личинок.....	41
2.6.2. Иммунохимическое окрашивание целых органов дрозофилы.....	42
2.6.3. Приготовление препаратов яичников и семенников дрозофилы, окрашенных по DAPI.....	43
2.7. Определение стадии гибели эмбрионов.....	43
2.8. Экспрессия индивидуальных септиновых белков дрозофилы.....	43
2.9. ГТФазный анализ индивидуальных септинов.....	44
2.10. Очистка септинового комплекса дрозофилы из клеток, инфицированных бакуловирусом.....	45
2.11. Анализ связывания ГТФ рекомбинантными септиновыми комплексами.....	46
2.12. Анализ гидролиза ГТФ рекомбинантными септиновыми комплексами.....	46
2.13. Методы детекции белков.....	47
2.13.1. Электрофорез белков в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли.....	47
2.13.2. Окраска белкового геля с помощью Кумасси.....	47
2.13.3. Вестерн-блоттинг.....	47
2.14. Экспрессия рекомбинантного Orc6.....	48
2.15. Электронная микроскопия.....	49
2.15.1. Электронная микроскопия септиновых комплексов и филаментов.....	49
2.15.2. Статистический анализ длин филаментов.....	49
2.15.3. Локализация Orc6 на септиновых филаментах.....	49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	51
3.1. Анализ экспрессии гена <i>pnut</i>	51
3.2. Влияние продукта гена <i>pnut</i> на деления соматических клеток.....	52
3.3. Изучение функций септина Pnut в гонадогенезе при помощи РНК-интерференции.....	54
3.3.1. Получение плазмидной конструкции для проведения РНК-интерференции гена <i>pnut</i>	54
3.3.2. Влияние продукта гена <i>pnut</i> на деление генеративных клеток.....	56
3.3.3. Анализ нарушений сперматогенеза при эктопическом подавлении экспрессии гена <i>pnut</i>	58

3.3.4. Анализ нарушений оогенеза при эктопическом подавлении экспрессии гена <i>pnut</i> в соматических клетках яичников.....	60
3.4. Изучение роли функциональных доменов Pnut.....	63
3.4.1. Мутации гена <i>pnut</i> , использованные в работе.....	63
3.4.2. ГТФазная активность индивидуальных септинов дрозофилы.....	64
3.4.3. Анализ септиновых комплексов с использованием мутантов Pnut по ГТФазному домену.....	65
3.4.4. Влияние мутаций в консервативных доменах <i>pnut</i> на соматические ткани дрозофилы <i>in vivo</i>	67
3.4.5. Влияние мутаций различных доменов Pnut на оогенез дрозофилы.....	75
3.4.6. Влияние мутаций различных доменов Pnut на сперматогенез дрозофилы.....	78
3.5. Изучение филаментообразования септиновых комплексов <i>in vitro</i>	79
3.5.1. Влияние ГТФ и Orc6 на формирование септиновых филаментов.....	79
3.5.2. Механизм Orc6-зависимого формирования септиновых филаментов.....	82
3.5.3. Формирование филаментов септиновыми комплексами, содержащими Pnut с мутациями в ГТФазном домене.....	84
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	85
4.1. Роль Pnut в делении соматических и генеративных клеток.....	85
4.2. ГТФазная активность индивидуальных септинов.....	87
4.3. Формирование септинового комплекса.....	88
4.4. Формирование септиновых филаментов.....	90
4.5. Роль консервативных доменов Pnut в соматических тканях дрозофилы.....	92
4.6. Участие Pnut в оогенезе дрозофилы.....	94
4.7. Участие Pnut в сперматогенезе дрозофилы.....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
ВЫВОДЫ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

а/к – аминокислота

ГДФ – гуанозин 5'-дифосфат

ГТФ – гуанозин 5'-трифосфат

ГТФ γ S – гуанозин 5'-О-(3-тиотрифосфат)

ДТТ – дитиотреитол

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

МТ – микротрубочки

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭГТА – этиленгликольтетрауксусная кислота

ЭМ – электронная микроскопия

BSA – bovine serum albumin (бычий сывороточный альбумин)

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол

GFP – green fluorescent protein, зеленый флуоресцирующий белок

GST – Glutathione S-transferase, глутатион-S-трансфераза

HEPES – 4-(2-оксиэтил)1-пиперазинэтансульфоновая кислота

ORC – origin recognition complex

PBS – phosphate buffered saline (натрий-фосфатный буфер)

SDS – додецил-сульфат натрия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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 септинов. Ранее было показано, что у дрозофилы белок Ogs6, 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 клеточного 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, какова их роль в различных клеточных процессах, 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 и ценность работы

Была получена уникальная плазида *pUASP-W* для проведения РНК-интерференции у дрозофилы, позволяющая изучать функции разных 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.

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

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. 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 цитокинез 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.

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 объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 115 страницах 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.

Благодарности

Автор выражает благодарность коллективу сектора генетики клеточного цикла ИЦИГ СО РАН. Отдельную благодарность хочется выразить Федоровой С.А. и Дороговой Н.В. за помощь на всех этапах выполнения данной работы. Автор также благодарит Болоболову Е.У. за проведение экспериментов по ультраструктурному анализу. Автор признателен Чеснокову И.Н., на базе лаборатории которого были выполнены биохимические эксперименты, а также Баласову М.Л. за помощь в освоении методов работы с белками. Также хочется высказать отдельную благодарность друзьям и родным за поддержку и ободрение.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Цитокинез в животных клетках

1.1.1. Общие принципы цитокинеза

Цитокинез – это последнее событие клеточного цикла, в ходе которого одна материнская клетка разделяется на две дочерние. И хотя у разных организмов цитокинез идет по-разному, основные его этапы универсальны. В клетках животных сначала определяется место, где будет происходить деление, и затем в области деления образуется борозда деления. В борозде деления находятся актин, миозин и другие белки, организованные в сократительное кольцо, называемое актомиозиновым, которое образуется в экваториальной плоскости перпендикулярно веретену деления. Во время телофазы кольцо сокращается, образуя мембранный барьер между цитоплазматическим содержимым клеток. При этом компоненты веретена сжимаются и образуют структуру, называемую телофазным телом у млекопитающих или срединным телом (midbody) у насекомых. На последнем этапе цитокинеза, называемом абсциссия, борозда деления полностью разделяет две клетки (Glotzer, 1997; Guertin *et al.*, 2002). Рассмотрим эти этапы более подробно.

Первым шагом цитокинеза является определение плоскости, по которой будет происходить разделение клеток. Существует много свидетельств того, что в животных клетках положение борозды деления определяется позицией митотического веретена в поздней анафазе и ранней телофазе клеточного цикла (Riparbelli *et al.*, 2002). Когда место, где будет происходить деление, определено, в животных клетках следующим шагом является сборка актомиозинового кольца в кортикальной области клетки. Как уже упоминалось выше, основными компонентами сократительного кольца являются актин и миозин. Также в борозде деления обнаруживаются белки септины, однако роль их еще до конца не выяснена. Следует отметить важную роль анилина в функционировании борозды деления. Данный белок имеет много доменов, позволяющих ему связывать актиновые филаменты и септины, а также взаимодействовать с компонентами микротрубочко-связывающего комплекса. В целом, анилин действует как каркас (скаффолд – от англ. scaffold) для правильной сборки актомиозинового кольца (D'Avino, 2009).

После того как актомиозиновое кольцо собралось, оно начинает сокращаться, что приводит к ингрессии мембраны. Интересно, что параллельно с сокращением, актомиозиновое кольцо постепенно разбирается. Образование новой мембраны, возможно,

происходит за счет слияния везикул из аппарата Гольджи, которые направляются в борозду посредством микротрубочко-зависимого транспорта с помощью кинезиноподобных белков (Giansanti *et al.*, 2004).

После того как хромосомы сегрегировали, веретено животной клетки реорганизуется и принимает форму центрального веретена, плотной сети антипараллельных микротрубочек с их плюс концами, направленными в центр клетки, и с минус концами, заканчивающимися не на центросомах, а около отделенных наборов хромосом. Когда борозда деления достигает этих пучков микротрубочек, они сжимаются в структуру, называемую срединной зоной центрального веретена (midbody) (Giansanti *et al.*, 2004; Glotzer, 1997). Во всех животных клетках, проанализированных на сегодняшний день, целостность центрального веретена необходима для цитокинеза. Кроме того, исследования, проведенные на дрозофиле, показали, что сократительное кольцо и центральное веретено - взаимозависимые структуры. Мутации в белках, которых много в средней зоне центрального веретена, нарушают как образование центрального веретена, так и сборку сократительного кольца. И наоборот, мутации в генах, которые кодируют белки, вовлеченные в образование актиномиозинового кольца и его функционирование, также нарушают сборку обеих структур. В целом, эти результаты означают кооперативное взаимодействие между микротрубочками центрального веретена и элементами актомиозинового кольца (Giansanti *et al.*, 2004).

После того как ингрессия борозды завершилась, дочерние клетки в течение нескольких часов остаются соединены цитоплазматическим мостиком. Разделение этого мостика и окончательное разъединение дочерних клеток называется абсциссией.

1.1.2. Особенности делений в генеративных клетках дрозофилы

У самцов и самок дрозофилы гаметы развиваются в синцитии. Гониобласты (у самцов) или цистобласты (у самок) образуются в результате ассиметричного деления генеративных стволовых клеток. Гониобласт (цистобласт) проходит через четыре раунда митоза, в результате чего образуется циста из 16 генеративных клеток. В ходе этих предмейотических делений цитокинез неполный, поэтому 16 сперматоцитов (у самцов) или 15 питающих клеток и ооцит (у самок) остаются соединены кольцевыми каналами (Hime *et al.*, 1996).

Каждое деление клеток цисты сопровождается ростом и разветвлением фузома (fusome), специфической мембрано-цитоскелетной органеллы (Lin *et al.*, 1994). Фузома протягивается через кольцевые каналы в делящейся цисте, формируя разветвленную структуру, связывающую между собой все клетки цисты. У самок с помощью фузома

осуществляется первичная поляризация цисты и определяется, какая из 16 клеток станет ооцитом, также фузома обеспечивает селективный транспорт различных веществ из питающих клеток в ооцит (Cuevas de, Spradling, 1998; Lin *et al.*, 1994). Деграция фузома начинается практически сразу после завершения делений цистобласта, после чего транспорт осуществляется с помощью сети микротрубочек.

У самцов фузома формирует разветвленную структуру, схожую с таковой у самок. Также как и у самок, она необходима для четырех раундов предмейотических митозов, однако после них фузома не разбирается, а персистирует вплоть до индивидуализации сперматид. Т.к. в цисте семенника все сперматоциты имеют одинаковую судьбу, роль фузома после митотических делений не ясна (Lighthouse *et al.*, 2008).

Таким образом, при митотическом делении генеративных клеток можно выделить 2 особенности: наличие специфической органеллы – фузома, необходимой для нормальных предмейотических делений, а также неполный цитокинез между клетками цисты, что приводит к наличию кольцевых каналов, обеспечивающих в оогенезе транспорт питательных веществ, а в сперматогенезе – синхронность вступления клеток в соответствующие стадии деления.

1.2. Общая характеристика семейства септинов

Септины были впервые открыты у почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в 1971 в ходе скрининга в поисках генов, необходимых для клеточного деления (Hartwell, 1971). В данном исследовании были обнаружены четыре CDC (cell division cycle) гена – *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* и *cdc12* – мутации в которых приводили к нарушениям цитокинеза. Примерно в это же время электронно-микроскопический анализ почкующихся дрожжей выявил филаменты толщиной в 10 нм, которые окружали перешеек между материнской клеткой и почкой (Byers, Goetsch, 1976). Использование иммунофлуоресцентной микроскопии, а также мутационный анализ позволили показать, что продукты генов *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* и *cdc12* локализуются в перешейке почки и являются структурными компонентами обнаруженных ранее 10 нм филаментов (Ford, Pringle, 1991; Haarer, Pringle, 1987; Kim *et al.*, 1991).

На сегодняшний день септины найдены у всех эукариот, за исключением высших растений, у которых принцип цитокинеза отличается от такового у животных и грибов (Cao *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007). Белки семейства септинов являются ГТФ-азами и входят в большой суперкласс Р-петлевых ГТФ-аз (Leipe *et al.*, 2002). Характерной особенностью 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. Хотя септины были идентифицированы у мутантов по клеточному циклу с нарушением цитокинеза, сейчас точно известно, что эти белки участвуют, помимо цитокинеза, во множестве других клеточных процессов, таких как клеточная полярность и клеточное движение, функционирование микротрубочкового и актинового цитоскелета, везикулярный трафик, экзоцитоз, апоптоз (Mostowu, Cossart, 2012; Saarikangas, Barral, 2011). Была показана связь между мутациями и делециями септинов позвоночных и мужской стерильностью, нейромышечными заболеваниями и болезнями крови. Помимо этого, различные аномалии септинов млекопитающих сопровождают многие типы рака, болезни Альцгеймера и Паркинсона, шизофрению, а также патогенные инфекции (Connolly *et al.*, 2011; Dolat *et al.*, 2014; Mostowu, Cossart, 2011). Ряд структурных и функциональных исследований последних лет выявили роль связывания и гидролиза ГТФ в септин-септиновых взаимодействиях (Sirajuddin *et al.*, 2007; Sirajuddin *et al.*, 2009; Vrabioiu *et al.*, 2004; Zent *et al.*, 2011; Zent, Wittinghofer, 2014). В частности, многие исследования свидетельствуют в пользу того, что различные степени связывания и гидролиза гуанозинфосфатов могут регулировать сборку/разборку комплексов и филаментов, что может быть важно для регуляции динамики септинов в ходе клеточного цикла.

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 филаментов.

1.2.1. Эволюционная консервативность септинов

Филогенетический анализ показал наличие септинов у животных и грибов, но не у растений (Pan *et al.*, 2007). Количество септиновых генов сильно варьирует в зависимости от организма (**Табл. 1**): у дрожжей *S.cerevisiae* их 7 (*cdc10*, *cdc3*, *cdc11*, *cdc12*, *shs1*, *spr3* и *spr28*), у человека 13 (*SEPT1-SEPT12* и *SEPT14*), у дрозофилы 5 (*pnut*, *sep1*, *sep2*, *sep4* и *sep5*), у *C.elegans* всего 2 (*unc-59* и *unc-61*). Интересно, что даже у бактерий обнаружены похожие на септины белки – парасептины. У дрожжей *S.cerevisiae* септины *cdc10*, *cdc3*, *cdc11*, *cdc12* и *shs1* экспрессируются во время вегетативного роста, тогда как два других - *spr3* и *spr28* –

специфичны для споруляции. У млекопитающих для септинов характерна тканеспецифичность экспрессии.

Таблица 1. Количество генов септинов у разных организмов.

Организм	Количество генов септинов
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (почкующиеся дрожжи)	7
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (делящиеся дрожжи)	7
<i>Caenorhabditis elegans</i> (нематода)	2
<i>Drosophila melanogaster</i> (плодовая мушка)	5
<i>Danio rerio</i> (зебрафиш)	17
<i>Xenopus laevis</i> (шпорцевая лягушка)	9
<i>Gallus gallus</i> (курица)	10
<i>Mus musculus</i> (мышь)	13
<i>Homo sapiens</i> (человек)	13
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (морской еж)	4
<i>Ciona intestinalis</i> (асцидия)	4

Количество септинов у млекопитающих также увеличено за счет существования различных изоформ, экспрессирующихся от альтернативных промоторов, а также за счет транскрипции сплайсированных вариантов. Экстремальным примером служит SEPT9, для которого известно 18 мРНК и 15 полипептидов. Роль каждой из изоформ еще не выяснена, однако уже сейчас ясно, что некоторые из них выполняют различные функции в клетке. Например, белок ARTS представляет собой сплайсированную изоформу септина SEPT4. В отличие от характерной для септинов локализации на мембране, ARTS обнаруживается в митохондриях и связывается с ингибитором апоптоза XIAP1, участвуя, таким образом, в регуляции апоптоза (Gottfried *et al.*, 2004).

На основании анализа последовательностей септины млекопитающих были подразделены на 4 группы: группа септина 2, состоящая из SEPT 1,2,4 и 5; группа септина 3 (SEPT 3,9 и 12); группа септина 6, (SEPT 6,8,10 и 11) и группа септина 7, состоящая из одного септина SEPT7 (Kinoshita, 2003; Pan *et al.*, 2007). Гомологи всех четырех групп септинов представлены у вторичноротого иглокожего морского ежа (*S. purpuratus*) и у беспозвоночного хордового *Ciona intestinalis* (см. Табл. 1). Это показывает, что появление четырех групп септинов должно было произойти до разделения позвоночных и беспозвоночных, и что увеличение количества генов септинов у позвоночных происходило

главным образом за счет дупликаций ранее существовавших генов, а не за счет появления новых групп септинов (Cao *et al.*, 2007).

1.2.2. Физические свойства септинов

Типичная структура септина показана на **Рис. 1**. Большинство септинов имеют консервативный ГТФ-связывающий домен и входят в большой класс Р-петлевых ГТФаз, куда относятся, например, кинезин, миозин и Ras-подобные ГТФазы. Для Р-петлевых ГТФаз характерно присутствие нескольких консервативных мотивов (обозначаемых как G1-G5) в ГТФ-связывающем домене (Leire *et al.*, 2002). Для септинов показано, что они имеют мотивы G1, G3 и G4. Мотив G1 (состоящий из аминокислот GxxxxGK) формирует гибкую петлю, которая взаимодействует с α - и β - фосфатными группами ГТФ. Это так называемая Р-петля (phosphate-binding loop), обнаруженная у большинства нуклеотид-связывающих белков, присутствие которой отражено в названии суперкласса. G3 мотив (DxxG) участвует в связывании Mg^{2+} и γ -фосфата ГТФ. Мотив G4 (xKxD) важен для специфического распознавания гуанинового кольца.

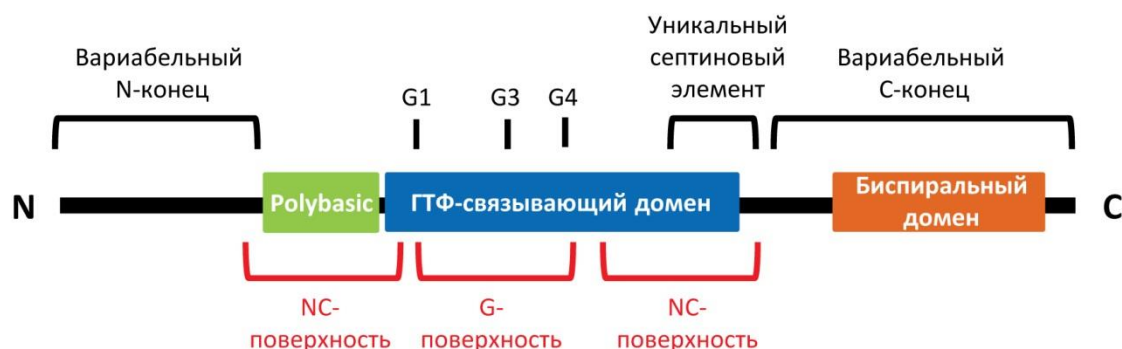


Рис. 1. Характерная структура септина. Септины содержат ГТФ-связывающий домен с тремя мотивами – G1, G3 и G4. На N-конце от ГТФ-азного домена находится высококонсервативный «многоосновный» (polybasic) участок, необходимый для взаимодействия с мембранами. На C-конце белка часто располагается биспиральный домен, ответственный за белок-белковые взаимодействия. Кроме того, септины содержат уникальную последовательность из 53 аминокислот (Septin Unique Element), функции которой неизвестны. NC- и G-поверхности, участвующие в септин-септиновых взаимодействиях, обозначены красным цветом.

N- и C- концевые участки характеризуются варибельностью между разными септинами. Для большинства представителей этого белкового семейства характерно наличие консервативного «многоосновного» (polybasic) участка в ~ 20 а/к, связывающегося с фосфолипидами мембран (Casamayor, Snyder, 2003; Zhang *et al.*, 1999), а также уникальной

последовательности из 53 аминокислот (septin unique element), отличающей септины от других ГТФаз, функции которой неизвестны (Versele, Thorner, 2004). Кроме того, у многих септинов есть С-концевой биспиральный (coiled-coil) домен, отвечающий за белок-белковые взаимодействия (Pan *et al.*, 2007).

Характерной особенностью септинов является их способность формировать гетеромерные комплексы. Когда человеческий септин SEPT2 с делетированным С-концом экспрессировали в *E.coli*, очистили и кристаллизовали в присутствии ГДФ, он формировал гомодимеры (Sirajuddin *et al.*, 2007). Оверэкспрессия в культуре клеток млекопитающих также показала, что SEPT2 может существовать в форме гомодимера, в отличие, например, от SEPT6 и SEPT7, которые существовали только в мономерной форме. Несмотря на это, эндогенные нативные септины, по-видимому, существуют только в форме комплексов с другими септинами, и для септиновых гомодимеров не было показано никакой биологической функции (Sellin *et al.*, 2011). Тем не менее, структура SEPT2 гомодимеров сыграла большую роль в нашем понимании септин-септиновых взаимодействий. На основе данной структуры было предположено, что септины взаимодействуют друг с другом за счет ГТФазного домена, при помощи двух поверхностей взаимодействия (**Рис. 1**). Первая включает в себя сайт связывания нуклеотида (G-поверхность), вторая состоит из участков, прилегающих к сайту связывания нуклеотида с обеих сторон (NC-поверхность). Позже, гипотеза была подтверждена в структурных исследованиях септин-септиновых взаимодействий у дрожжей и человека (Bertin *et al.*, 2008; Sirajuddin *et al.*, 2007; Zent *et al.*, 2011).

Септиновые комплексы обычно состоят из двух (*C.elegans*, (John *et al.*, 2007)), трех (человек, (Sirajuddin *et al.*, 2007), дрозофила, (Field *et al.*, 1996)) или четырех (*S.cerevisiae*, (Bertin *et al.*, 2008)) различных септинов, каждый из которых представлен в двух копиях. При помощи структурных исследований было выяснено как белки выстроены внутри комплекса. В частности, была получена структура человеческого септинового комплекса, содержащего SEPT2, SEPT6 и SEPT7, с разрешением в 4 ангстрем (Sirajuddin *et al.*, 2007). Комплекс представлял собой линейный неполярный гексамер, ~25 нм длиной и ~5 нм в диаметре, вида SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 (**Рис. 2А**). Важно отметить, что в комплексе чередовались NC- и G-поверхности взаимодействия – то есть SEPT2 формирует NC-поверхность с соседним SEPT2 и G-поверхность с SEPT6, а SEPT6, в свою очередь, формирует G-поверхность с SEPT2 и NC-поверхность с SEPT7.

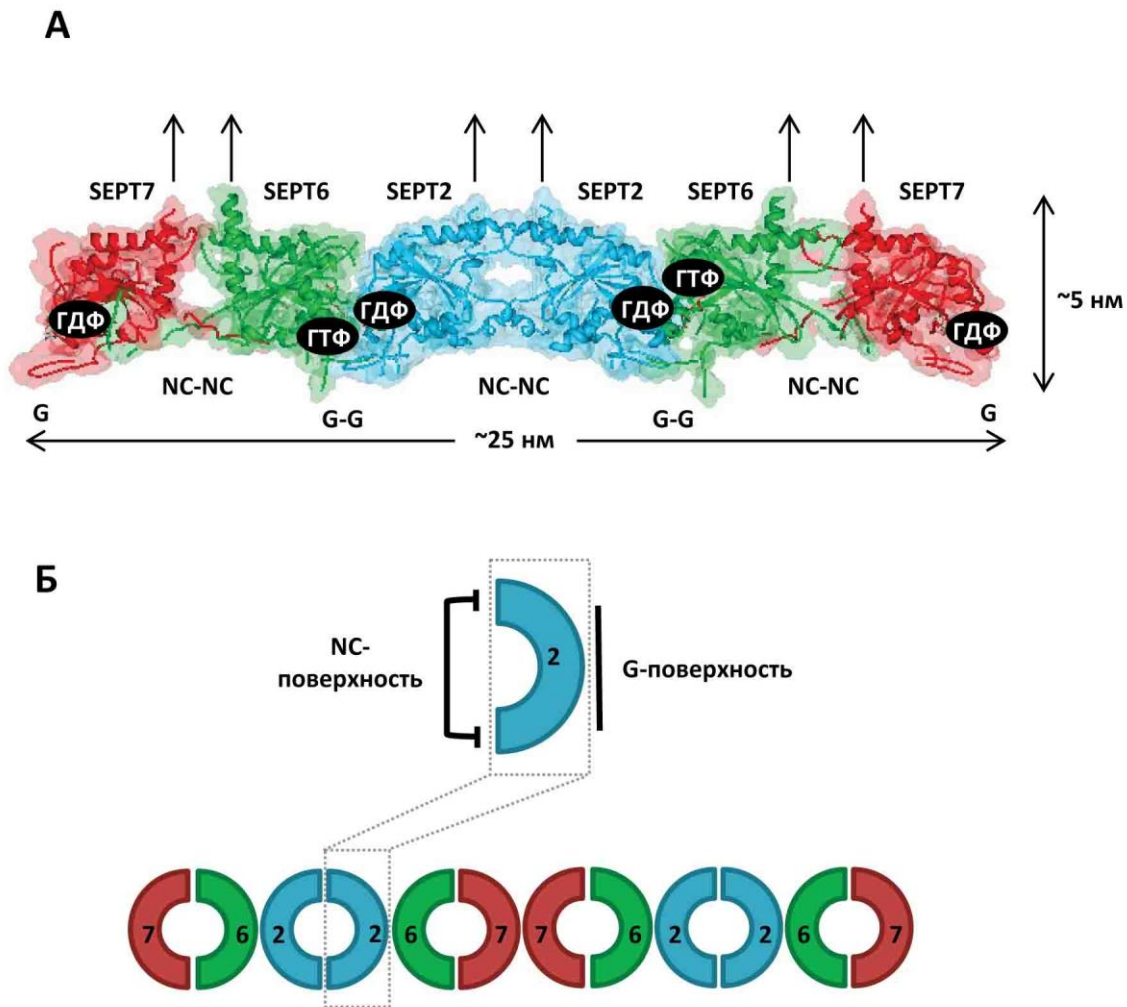


Рис. 2. Сборка септиновых комплексов и филаментов. А. Третичная структура септинового гексамера человека, полученная при помощи рентгеноструктурного анализа. Порядок субъединиц и природа связанного нуклеотида обозначены. Внизу указаны поверхности взаимодействия между септиновыми субъединицами. Предполагаемая ориентация С-концов отображена стрелками. Изображение взято из базы данных Protein Data Bank, структура номер 2QAG (Sirajuddin et al., 2007). Б. Схема септинового филамента. Отдельный полукруг представляет собой септиновую субъединицу. За счет взаимодействия между G-поверхностями SEPT7 субъединиц из соседних комплексов формируются неполярные филаменты.

Другим хорошо изученным комплексом является комплекс дрожжей *S.cerevisiae*, в котором два идентичных тетрамера также расположены симметрично (Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11) (Bertin *et al.*, 2008). Наподобие человеческого комплекса, октамерный комплекс дрожжей неполярен. Учитывая, что существует 4 группы септинов, заманчиво предположить, что человеческие септины могут также формировать октамер. Действительно, в недавней работе было показано, что SEPT9 может присоединяться по краям гексамерного комплекса, описанного выше, таким образом формируя октамер (Kim *et al.*,

2011). В целом, септиновые комплексы у разных организмов обычно содержат по одному из членов групп септинов 2, 6 и 7, при этом было показано, что белки из одной группы в некоторых случаях могут замещать друг друга (Kinoshita, 2003; Pan *et al.*, 2007; Sandrock *et al.*, 2011). Учитывая большое разнообразие септинов у млекопитающих, возможно формирование большого числа комплексов разного состава, и как следствие, участие септинов в большом репертуаре клеточных процессов, как будет показано ниже.

1.2.3. Септиновые филаменты

Свидетельства о том, что септины формируют филаменты *in vivo*, были получены в основном при помощи электронной микроскопии. Самые первые исследования на дрожжах показали наличие филаментов вокруг перешейка между материнской клеткой и почкой (Byers, Goetsch, 1976). Позже, было показано наличие септинового кольца, а также сетчатых структур у сферопластов дрожжей (Rodal *et al.*, 2005). Кроме того, септиновые филаменты наблюдали у близкого дрожжам гриба *A.gossypii* после обработки фторхлорфенуроном, регулятором роста растений, который, как было показано, стабилизирует септиновые филаменты (DeMay *et al.*, 2011).

Филаментообразование можно также индуцировать *in vitro*. Нативные или рекомбинантные септиновые комплексы дрожжей (Frazier *et al.*, 1998), дрозофилы (Akhmetova *et al.*, 2015; Field *et al.*, 1996; Huijbregts *et al.*, 2009) и млекопитающих (Sirajuddin *et al.*, 2007) полимеризуются с формированием филаментов в низко-солевом буфере. Схема формирования филаментов изображена на **Рис. 2Б**, полимеризация происходит за счет взаимодействия крайних субъединиц из соседних комплексов (в случае человеческого комплекса – SEPT7). Поскольку субъединицы внутри комплекса располагаются симметрично, септиновые филаменты неполярны, наподобие промежуточных филаментов. Такая характеристика отличает их от актиновых микрофиламентов и микротрубочек, которые полярны, то есть обладают плюс и минус концами сборки и разборки соответственно. Филаменты могут латерально контактировать друг с другом за счет С-концевых биспиральных доменов септиновых субъединиц, расположенных перпендикулярно продольной оси филамента (**Рис. 2А**). Таким образом могут формироваться парные филаменты или пучки филаментов (Vertin *et al.*, 2008). Пучки в свою очередь могут организовываться в более высокоорганизованные кольцевые и сетчатые структуры (Garcia *et al.*, 2011). Однако, эти данные были получены только для септинов дрожжей *in vitro*, и пока еще отсутствуют свидетельства *in vivo*. Кроме того, неясно, возможны ли такие латеральные

контакты септиновых филаментов у млекопитающих, поскольку было показано, что С-концевые домены их септинов участвуют только в сборке и стабилизации продольных филаментов (Almeida Marques de *et al.*, 2012).

У млекопитающих септины часто колокализуются с актином и микротрубочками (Kinoshita *et al.*, 1997; Nagata *et al.*, 2003; Surka *et al.*, 2002), в связи с чем не всегда можно определить, формируют ли они филаменты сами, или же находятся в виде комплексов, выглядящих как филаменты за счет ассоциации с цитоскелетом. В фибробластах, септины теряли филаментообразный вид, когда организация актина была нарушена обработкой цитохалазином Д или лантрикулином Б (Kinoshita *et al.*, 2002). Однако эта обработка индуцировала появление септиновых колец, в которых отсутствовал актин, указывая на то, что септиновые филаменты, вероятно, выпрямлялись при ассоциации с актином, но сворачивались в кольца при его отсутствии.

Комплексы и филаменты представляют собой функциональные формы септинов. При индивидуальной экспрессии, многие септины слабо растворимы и имеют тенденцию агрегировать (García *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2006; Versele, Thorner, 2004). Кроме того, для дрожжей было показано, что способность формировать филаменты необходима для правильного функционирования септинов в клетке, так как септиновые мутации, нарушающие филаментообразование, приводили к гибели клетки (McMurray *et al.*, 2011).

Самосборка септивных филаментов *in vivo* представляет собой обратимый процесс (Kinoshita *et al.*, 2002), следовательно, должна существовать система регуляции филаментообразования.

1.2.4 Регуляция сборки септиновых филаментов

Септины являются ГТФазами, и большинство из них способны обменивать и гидролизовать ГТФ в ГДФ (Weirich *et al.*, 2008), однако роль этих процессов в функционировании септинов еще до конца не выяснена. Для других компонентов цитоскелета, а именно актиновых филаментов и микротрубочек, показана роль циклирования нуклеотида (АТФ в случае актина и ГТФ в случае тубулина) в регуляции сборки и разборки филаментов. Актин и тубулин собираются в филаменты из мономеров, содержащих АТФ или ГТФ соответственно. Гидролиз нуклеотида приводит к дестабилизации контактов между мономерами, что способствует разборке филаментов (Bowne-Anderson *et al.*, 2013; Kudryashov, Reisler, 2013). Этот механизм является основой полярности филаментов, то есть наличия плюс и минус концов, и обеспечивает быструю реорганизацию таких цитоскелетных

структур. Иначе дело обстоит с септинами. Наиболее изучен в этом плане септиновый комплекс человека SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7. Формирование филаментов здесь происходит за счет взаимодействия G-поверхностей SEPT7 из соседних комплексов (Sirajuddin *et al.*, 2007) (**Рис. 2Б**). Показано, что контакт более стабилен, когда в ГТФ-азном домене находится связанный ГДФ (Zent, Wittinghofer, 2014). Таким образом, цикл нуклеотида ГТФ-ГДФ может участвовать в регуляции септинов, однако, в отличие от актинового и микротрубочкового цитоскелетов, септиновые филаменты более стабильны в ГДФ – связанной форме.

Для септинов характерны достаточно медленные скорости гидролиза и обмена нуклеотида, что дает возможность существованию двух относительно стабильных состояний – ГТФ-связанного и ГДФ-связанного. Это может служить причиной медленной динамики и большей стабильности септинового цитоскелета по сравнению с актиновым и тубулиновым (Hagiwara *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2008).

Септины также отличаются от классических малых ГТФаз, которые циклируют между активным ГТФ-связанным состоянием и неактивным ГДФ-связанным, и таким образом контролируют сложные клеточные процессы. Важно отметить, что у септинов, принадлежащих к группе SEPT6, отсутствует ключевая каталитическая аминокислота треонин, ответственная за гидролиз ГТФ. Как результат, эти септины конститутивно связаны с ГТФ, и их G- и NC- поверхности взаимодействия не могут регулироваться гидролизом ГТФ. Принято считать, что неспособность SEPT6 к гидролизу ГТФ стабилизирует G-G поверхность взаимодействия между SEPT6 и SEPT2, и, таким образом, играет важную роль в формировании септиновых комплексов и филаментов.

Сборка и разборка септиновых филаментов *in vivo* может также регулироваться различными посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование, сумоилирование, ацетилирование и убиквитинилирование (Hernández-Rodríguez, Momany, 2012). Большинство модификаций показано для септинов дрожжей. Единственная модификация, а именно, убиквитинилирование, которая была показана для человеческого SEPT5 (Zhang *et al.*, 2000), его ортолога у дрозофилы Sep4 (Muñoz-Soriano *et al.*, 2012), а также Pnut и Sep1 дрозофилы (Bae *et al.*, 2007), интересна тем, что модификацию осуществляет убиквитин-лигаза Parkin, мутации в которой приводят к аутосомно-рецессивной болезни Паркинсона (Kitada *et al.*, 1998). Вполне вероятно, что убиквитинилирование септинов необходимо для их деградации, а нейрональная дисфункция при паркинсонизме может являться следствием накопления недеградированных септинов.

Динамика септиновых филаментов может также регулироваться взаимодействием с другими белками. Например, TRiC/CCT шапероны, ответственные за фолдинг ряда белков, в том числе компонентов актинового и микротрубочкового цитоскелетов, также вовлечены в формирование септинового кольца у дрожжей (Dekker *et al.*, 2008); Cdc42-связывающий белок Borg3 взаимодействует с септинами млекопитающих, и оверэкспрессия Borg3 нарушает распределение септиновых филаментов в клетке (Joberty *et al.*, 2001); Orc6 субъединица ORC комплекса, необходимая для репликации ДНК, стимулирует формирование филаментов у дрозофилы (Akhmetova *et al.*, 2015; Huijbregts *et al.*, 2009).

Ассоциация септинов с мембранами и цитоскелетными элементами, такими как актин и микротрубочки, также влияет на полимеризацию филаментов, что будет рассмотрено ниже. Таким образом, динамика септинов зависит не только от их биохимических свойств и посттрансляционных модификаций, но и от их взаимодействия с другими белками и внутриклеточными структурами и органеллами.

1.3. Молекулярные функции септинов

Одна из сложностей изучения септинов, особенно септинов млекопитающих, состоит в большом комбинаторном разнообразии. Например, в геноме человека закодировано 13 септинов, каждый из которых имеет несколько изоформ и сплайсированных вариантов. Как результат, возможно формирование разнообразных комплексов, функционирующих в специализированных клеточных процессах, в отдельных типах клеток или же на определенной стадии клеточного цикла. По всей видимости, именно с этим связан огромный спектр процессов, в которых участвуют септины: начиная от деления клетки и заканчивая апоптозом.

Биологические функции септинов зависят от их способности ассоциировать друг с другом с формированием филаментов. Филаменты могут далее формировать так называемые скаффолды (от англ. scaffold) внутри клетки – каркасы для привлечения и закрепления белков в определенных участках клетки. Кроме того, за счет взаимодействия с фосфолипидами, септиновые филаменты могут формировать диффузные барьеры, которые компартментализируют мембраны. Следует также отметить, что функции скаффолда и диффузного барьера не являются взаимоисключающими.

Ниже будут рассмотрены подробнее оба этих режима работы септинов, а также взаимоотношения септинового цитоскелета с другими цитоскелетными элементами – актином и микротрубочками.

1.3.1. Септины как скаффолд

Септиновые структуры внутри клетки часто служат скаффолдом для локализации других белков. Этот аспект функционирования септинов наиболее изучен у почкующихся дрожжей, где септиновые филаменты в перешейке почки участвуют в цитокинезе, заякоривая белки и обеспечивая их правильное расположение. В отсутствие септинового кольца, нужные белки не аккумулируются в сайте деления, и цитокинез не проходит (Douglas *et al.*, 2005; Gladfelter *et al.*, 2001). Септины сохранили свою функцию скаффолда в цитокинезе у млекопитающих, где они также взаимодействуют с различными сигнальными эффекторами и другими белками (Joo *et al.*, 2005; Kinoshita, Noda, 2001). Если септиновое кольцо является абсолютно необходимым для завершения цитокинеза у дрожжей, то у млекопитающих – не обязательно. Например, в фибробластах септины также критичны для деления, однако в некоторых миелоидных и лимфоидных клетках деплеция основного повсеместного SEPT7 не приводила к нарушениям митоза (Tooley *et al.*, 2009), что скорее всего связано с существованием как септин-зависимого, так и септин-независимого путей завершения цитокинеза (Menon *et al.*, 2014).

В отличие от септинов дрожжей, локализующихся в перешейке почки при делении, септины млекопитающих могут локализоваться по всей плазматической мембране, а также в цитоплазме. Однако, по сравнению с актином и микротрубочками, которые как правило формируют более или менее непрерывную сеть, септиновую цитоскелетную систему можно определить как систему дискретных скаффолдов (Kinoshita, 2006). Большое разнообразие сплайсированных вариантов и изоформ септинов у млекопитающих хорошо согласуется со всерастущим количеством разнообразных процессов, в которых принимают участие септины. Показательным примером является роль септинового скаффолда, локализованного около средней зоны веретена, в правильной локализации центромер-связывающего белка E (CENP-E) - микротрубочкового моторного белка, необходимого для стабильного прикрепления кинетохоров к минус концу микротрубочек веретена (МТВ). В *HeLa* and *MDCK* клетках с недостатком SEPT7 хромосомы не только неправильно выстраиваются, но также не сегрегируют из-за отсутствия элонгации МТВ во время анафазы (Zhu *et al.*, 2008).

Находясь на мембране, септины могут взаимодействовать также с элементами цитоскелета и другими белками, таким образом внося вклад в ригидность клетки (Dolat *et al.*, 2014). Деплеция SEPT2 или SEPT11 уменьшали жесткость и кортикальную эластичность клеток (Mostowy, Cossart, 2011). Такая септин-опосредованная ригидность плазматической

мембраны оказалась важной для регуляции формы и движения клетки (Gilden *et al.*, 2012). У *Xenopus laevis*, нокдаун септинов приводил к дефектам коллективного движения клеток при эмбриогенезе (Kim *et al.*, 2010). Отсутствие септинов у *C. elegans* нарушало правильное аксональное наведение у моторных и сенсорных нейронов (Finger *et al.*, 2003), а у мышей – миграцию кортикальных нейронов (Shinoda *et al.*, 2010). Подобным образом, деплеция SEPT7 нарушала морфологию и движение Т-клеток (Tooley *et al.*, 2009).

Септины могут функционировать как скаффолд также в ходе экзоцитоза. Показано, что септиновые филаменты локализуются в сайтах экзоцитоза, где они взаимодействуют с экзоцитозным комплексом и SNARE белками, которые направляют докинг и слияние везикул с плазматической мембраной. Оверэкспрессия SEPT5 ингибировала секрецию, тогда как при мутации SEPT5 секреция усиливалась (Beites *et al.*, 1999). По-видимому, септины направляют экзоцитозный комплекс в правильное местоположение на мембране, а также регулируют слияние везикулы с мембраной.

1.3.2. Септины как диффузные барьеры

Взаимодействие септинов с различными участками мембраны имеет важное функциональное значение в разделении мембраны на отдельные компартменты. Существование септиновых диффузных барьеров было впервые показано на почкующихся дрожжах. FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) эксперименты показали, что в перешейке почки септиновое кольцо может действовать как физический барьер, ограничивающий диффузию белков внутренней мембраны, таких как например Ist2. Показано, что Ist2p в норме может быстро диффундировать по плазматической мембране, однако при почковании он обнаруживается в мембране только дочерней клетки. При разрушении септинового кольца, Ist2p обнаруживался еще и в материнской клетке (Takizawa *et al.*, 2000). Другим примером может служить ограничение септиновым кольцом диффузии фактора Lte1. У мутантов по септинам Lte1 диффундирует в материнскую клетку (где в норме его не должно быть) и активирует Tem1, что приводит к преждевременному выходу из митоза до того, как прошла сегрегация хромосом (Douglas *et al.*, 2005). Помимо диффузного барьера в перешейке почки, у дрожжей было показано наличие подобных барьеров в эндоплазматическом ретикулуме, а также в ядерной оболочке.

У млекопитающих, септины по всей вероятности также формируют мембранный диффузный барьер в сайте цитокинеза при делении, однако формальных доказательств еще не было получено.

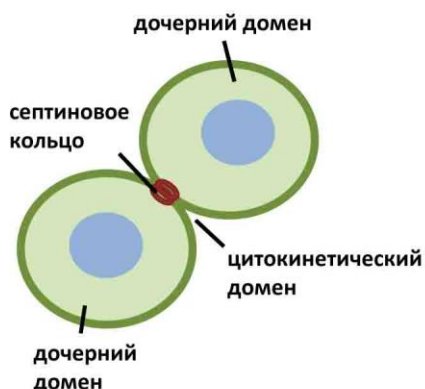
Интересно, что септиновые диффузные барьеры были обнаружены в ряде неделящихся клеток. Например, в сперматозоидах млекопитающих есть особая кольцевая мембранная структура – аннулус (annulus), находящаяся между двумя мембранными доменами хвоста сперматозоида, которая обеспечивает компартиментализацию различных мембранных белков, а также правильную архитектуру хвоста. Септины являются основным компонентом аннулуса, и в сперматозоидах *SEPT4*-нокаутных мышей аннулус отсутствует, а сами мыши стерильны из-за того, что в спермиях нарушены морфология и подвижность жгутика (Kissel *et al.*, 2005). Также, аннулус был дефективен у некоторых людей с астенозооспермией (сниженная подвижность сперматозоидов). (Lhuillier *et al.*, 2009). То, что септины действительно формируют диффузный барьер в аннулусе, было обнаружено позже, когда в сперматозоидах *SEPT4*-нокаутных мышей была показана диффузия трансмембранного гликопротеина базидина по всей мембране, а не в пределах определенного домена (Kwitny *et al.*, 2010).

Другим интересным примером являются клеточные реснички (цилии, от лат. *cilium*) – органеллы, которые участвуют в движении, а также реагируют на внеклеточные сигналы, такие как морфогены, запахи, свет и механическое воздействие, посредством мембранных белковых рецепторов, передавая сигнал в клетку (Verbari *et al.*, 2009). Хотя мембрана цилии является продолжением клеточной мембраны, она все же отделена от нее, потому что по результатам FRAP экспериментов мембранные белки могли свободно диффундировать в пределах мембраны цилии, но не переходили за ее пределы. Было показано, что септины формируют кольцо в основании подвижных цилий в эмбрионах лягушки (Kim *et al.*, 2010), а также в первичных (неподвижных) цилиях клеток млекопитающих (Hu *et al.*, 2010). В обоих случаях, снижение экспрессии септинов приводило к уменьшению количества цилий и их длины, а также к дефектам в цилио-зависимом *sonic hedgehog* сигналинге. FRAP эксперименты показали, что при этом резко усиливалась диффузия мембранных белков между цилией и остальной мембраной клетки, что свидетельствует в пользу формирования септинами диффузного барьера в основании цилии.

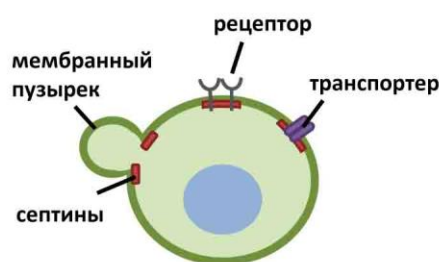
Схожим образом, было показано, что у крысы септины формируют стабильные структуры в точках ветвления дендритов, а также в основании дендритных шипиков – небольших мембранных выростов на дендритах, участвующих в процессировании и хранении синаптических сигналов (Tada *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2007). Несмотря на то, что на одном дендрите может находиться от сотен до тысяч дендритных шипиков, каждый из них функционирует независимо от остальных. Нокдаун *SEPT7* или *SEPT11* уменьшал ветвление

дендритов и плотность шипиков, тогда как оверэкспрессия *SEPT7* имела противоположный эффект (Cho *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009). В недавней работе исследователи показали, что *SEPT7*, для которого была показана локализация в основании шипиков, компартиментализует мембрану дендрита, наподобие мембраны ресничек, ограничивая диффузию мембранных белков дендрита (Ewers *et al.*, 2014).

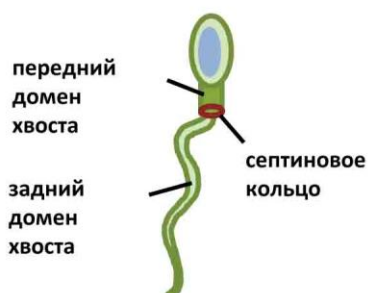
А. Борозда деления



Б. Плазматическая мембрана



В. Аннулюс сперматозоида



Г. Клеточные реснички (цилии)

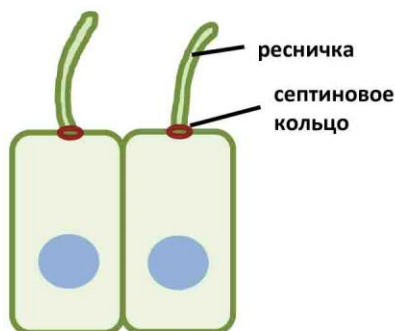


Рис. 3. Септины в различных биологических процессах. Септины могут функционировать как скаффолды или диффузные барьеры в различных клеточных процессах **А.** Во время цитокинеза клетки имеют два дочерних домена и цитокинетический домен в плоскости борозды деления. Септиновые кольца могут формировать диффузный барьер в борозде деления, а также действовать как скаффолд для цитокинетических белков. Достаточно хорошо изучена роль септинов в цитокинезе дрожжей, однако для клеток млекопитающих наличие септинового кольца еще не доказано. **Б.** В неделящихся клетках септины образуют структуры на плазматической мембране, которые обеспечивают ригидность клетки, например при появлении мембранных выпячиваний, а также действуют как скаффолд, закрепляя мембран-связывающие белки, включая рецепторы и транспортеры. **В.** В сперматозоидах млекопитающих аннулюс отделяет передний и задний домены хвоста сперматозоида. Септиновое кольцо формирует диффузный барьер в аннулусе, необходимый для механической и структурной целостности. **Г.** Для разделения мембраны реснички (цилии) от оставшейся плазматической мембраны клетки, септиновое кольцо формирует диффузный барьер в основании цилии, что критично при цилиогенезе. За основу был взят Рис. 3 из (Mostoway, Cossart, 2012).

На **Рис. 3** показаны области локализации септинов внутри клетки, а также пояснены выполняемые ими функции скаффолда и диффузного барьера. Вместе, эти данные указывают на эволюционно консервативную функцию септинового кольца в отдельных субклеточных структурах. Как в перешейке почки у дрожжей, так и в ресничках и в дендритах, функции септинов, по всей видимости, не ограничены формированием барьера, но скорее всего также включают в себя модулирование организации актина и микротрубочек. Например, миозин II, взаимодействующий с септинами, также необходим для правильного морфогенеза дендритных шипиков (Ryu *et al.*, 2006), кроме того шипики обогащены актином, и в некоторых из них также были обнаружены микротрубочки (Dent *et al.*, 2011). Взаимодействие этих трех цитоскелетных систем будет описано ниже.

1.3.3. Взаимодействие с актином и микротрубочками

Взаимодействие септинов с актином эволюционно консервативно. У млекопитающих, разные септины колокализуются с различными популяциями актиновых филаментов, однако, в целом, большинство септинов находятся в участках, обогащенных актином, таких как сократительное кольцо, филоподии и ламеллоподии движущихся клеток, а также стресс-фибриллы и кортикальные пучки актина (Schmidt, Nichols, 2004). Септиновый и актиновый цитоскелеты взаимозависимы. Деполимеризация F-актина приводила к потере септин-актиновой колокализации и к появлению септиновых колец и аркоподобных структур в цитозоле, и наоборот, нарушение септиновых филаментов при помощи РНК-интерференции приводило к исчезновению актиновых стресс-фибрилл (Kinoshita *et al.*, 2002; Schmidt, Nichols, 2004). На сегодняшний день еще не было продемонстрировано, что септины и актин непосредственно взаимодействуют друг с другом *in vivo*, однако было показано, что септиновый комплекс дрозофилы стимулирует формирование актиновых пучков, а также их изгибание *in vitro* (Mavrakakis *et al.*, 2014). *In vivo*, для взаимодействия актина с септинами необходим какой-либо адаптерный белок. Анилин, актин-связывающий белок, компонент сократительного кольца в митозе, взаимодействует также и с септинами, направляя их в область цитокинеза при клеточном делении (Field *et al.*, 2005; Kinoshita *et al.*, 2002; Oegema *et al.*, 2000). Однако большую часть клеточного цикла анилин находится в ядре, что указывает на наличие другого адаптерного белка между септинами и актином в интерфазе. Одним из кандидатов является немышечный миозин II - моторный белок, ответственный за кросслинкирование актиновых стресс-фибрилл. Для SEPT2 было показано, что он выполняет

роль скаффолда для фосфорилирования легкой цепи миозина Rho- и цитрон-киназами, и, таким образом, участвует в ингрессии сократительного кольца в цитокинезе (Joo *et al.*, 2007).

Белки, вовлеченные в регуляцию динамики актина, также влияют на организацию септинов. Было показано, что малая ГТФаза Cdc42 требуется для сборки септинового кольца у дрожжей, и в клетках млекопитающих Cdc42 эффектор, известный как Borg3, взаимодействует с SEPT6/SEPT7 гетеродимером. Оверэкспрессия Borg3 приводила к агрегации септиновых филаментов и разборке актиновых филаментов (Joberty *et al.*, 2001).

Помимо актинового цитоскелета, септины могут напрямую, без адапторного белка, взаимодействовать с микротрубочками. Частичная колокализация септинов человека SEPT2, 6, 7 и 9 с микротрубочками была показана для различных типов клеток, степень колокализации зависела от изоформы септина, клеточной линии и фазы клеточного цикла (Spiliotis, 2010). Несколько исследований показали, что микротрубочко-ассоциированные септиновые филаменты разбираются при обработке клеток нокодазолом, ингибитором полимеризации МТ. Обработка клеток таксолем, ингибитором разборки МТ, приводила к увеличению числа септиновых филаментов и стабилизации септиновых колец. Эти данные указывают на организующую роль МТ цитоскелета по отношению к септиновому. Однако, септины также играют роль в регуляции МТ, в частности, за счет взаимодействия с МТ-ассоциированным белком MAP4. При ассоциации с микротрубочками MAP4 стабилизирует их, однако, связанный с септинами, MAP4 не может выполнять свою функцию. Деpletion септинов таким образом увеличивала стабильность МТ и приводила к митотическим дефектам (Kremer *et al.*, 2005).

Тот факт, что септины участвуют в регуляции как актинового, так и микротрубочкового цитоскелетов поднимает вопрос о возможной роли септинов во взаимосвязи этих двух систем. Было показано, что различные изоформы септинов предпочтительно взаимодействуют либо с актином, либо с тубулином. Например, в *HeLa* клетках, SEPT9_i1 изоформа обнаруживала четкую колокализацию с микротрубочками, тогда как остальные изоформы SEPT9, а также человеческий септиновый комплекс SEPT7-SEPT6-SEPT2 в основном колокализовались с актином (Nagata *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2004; Surka *et al.*, 2002). Кроме того, деполимеризация МТ приводила к перераспределению SEPT9_i1 изоформы с МТ на актиновые стресс-фибриллы. Возможно, что септины участвуют в петле обратной связи, соединяющей актин и МТ за счет реагирования на различные клеточные сигналы, а также изменения цитоскелетной динамики. В частности, актиновый и МТ цитоскелеты оба регулируются разными ветвями Cdc42 сигнального пути (Cau, Hall, 2005;

Gomes *et al.*, 2005), и для септинов также было показано взаимодействие с Cdc42 эффектором Borg3 (Joberty *et al.*, 2001).

1.4. Ассоциация с различными заболеваниями человека

Учитывая большой ранг процессов, в которых задействованы септины, не удивительно, что некоторые из них вовлечены в развитие различных заболеваний. Известные на сегодняшний день данные по функциям септинов, а также ассоциации с различными заболеваниями человека, суммированы в **Табл. 2**. Ниже будут описаны несколько примеров.

Табл. 2 Ассоциация септинов человека с различными заболеваниями. В скобках указана группа, к которой принадлежит данный септин. МТ-микротрубочки, ЦНС-центральная нервная система. За основу была взята таблица из (Mostowy, Cossart, 2012).

Септин (группа)	Экспрессия	Функции	Взаимосвязь с заболеваниями
SEPT1 (SEPT2)	Лимфоциты и клетки ЦНС	Нет данных	Болезнь Альцгеймера, рак (ротовой полости, толстой кишки, лейкемия, лимфома)
SEPT2 (SEPT2)	Повсемест.	Динамика актина, бактериальная аутофагия, поддержание формы клетки, сегрегация хромосом, цилиогенез, цитокинез, репарация ДНК, мембранный траффик, регуляция МТ, выделение нейротрансмиттеров	Болезнь Альцгеймера, рак (мозга, печени, почки, лейкемия, лимфома), инфекции (бактериальные и вирусные), волчанка, синдром Гиппеля-Линдау
SEPT3 (SEPT3)	Клетки ЦНС	Нет данных	Болезнь Альцгеймера, рак (мозга), синдром Дауна, височная эпилепсия
SEPT4 (SEPT2)	Лимфоциты, клетки ЦНС, глаза, семенники	Апоптоз, диффузный барьер в сперматозоидах, мембранный траффик в сперматозоидах, функционирование митохондрий, нейротоксичность	Болезнь Альцгеймера, рак (толстой кишки, кожи, урогенитальный, лейкемия), инфекции (вирусные), мужская стерильность, паркинсонизм, шизофрения
SEPT5 (SEPT2)	Повсемест.	Рост аксонов, функционирование тромбоцитов, доставка везикул и экзоцитоз	Биполярное расстройство, рак (поджелудочной железы, лейкемия, лимфома), паркинсонизм, шизофрения
SEPT6 (SEPT6)	Повсемест.	Динамика актина, поддержание формы клетки, регуляция МТ	Биполярное расстройство, рак (кожи, лейкемия, лимфома), синдром

			Дауна, инфекции (бактериальные и вирусные), шизофрения
SEPT7 (SEPT7)	Повсемест.	Динамика актина, рост аксонов, поддержание формы клетки, сегрегация хромосом, цитокинез, формирование дендритов, репарация ДНК, мембранный траффик, регуляция МТ, подвижность Т-клеток	Болезнь Альцгеймера, рак (нервной системы), синдром Дауна, мужская стерильность
SEPT8 (SEPT6)	Лимфоциты, клетки ЦНС, глаза, кишечный тракт, плацента	Выделение нейротрансмиттеров	Дегенерация сетчатки
SEPT9 (SEPT3)	Повсемест.	Динамика актина, ангиогенез, бактериальная аутофагия, подвижность клеток, пролиферация клеток, поддержание формы клетки, цитокинез, регуляция МТ, доставка везикул и экзоцитоз	Рак (груди, толстой кишки, яичников, шеи, лейкемия, лимфома), синдром Дауна, наследственная невралгическая амиотрофия, инфекции (бактериальные)
SEPT10 (SEPT6)	Повсемест.	Нет данных	Нет данных
SEPT11 (SEPT6)	Повсемест.	Динамика актина, поддержание формы клетки, цитокинез, формирование дендритов, ригидность мембраны, мембранный траффик, активность синапсов	Биполярное расстройство, рак (почки, лейкемия, лимфома), шизофрения
SEPT12 (SEPT3)	Лимфоциты, клетки семенников	Механическая стабильность аннулуса в сперматозоидах	Мужская стерильность
SEPT14 (SEPT6)	Клетки ЦНС, семенники	Нет данных	Рак (семенников)

У группы пациентов, стерильных по причине сниженной подвижности спермы (атеноспремия), была обнаружена дезорганизация аннулуса (специфической структуры, разделяющей компартменты хвоста сперматозоида) (Lhuillier *et al.*, 2009). Как было описано выше, септины формируют кольцо в аннулусе, таким образом участвуя в поддержании его

правильной структуры, действуя как диффузный барьер. *SEPT4*-нокаутные мыши были стерильны, и снижение экспрессии *SEPT4* было также обнаружено у стерильных пациентов. Кроме *SEPT4*, связь с мужской стерильностью была также показана для *SEPT12*, так как у таких пациентов был снижен уровень данного септина (Lin *et al.*, 2009). Из данного исследования были получены выводы о том, что уровень экспрессии *SEPT12* крайне важен для развития спермы человека. Дополнительные исследования показали связь между *SEPT12* и случаями синдрома дель Кастильо, когда у пациентов не образуется сперма. Кариотипирование этих пациентов выявило 8 однонуклеотидных полиморфизмов в локусе *SEPT12*, однако их функциональное значение еще не ясно (Miyakawa *et al.*, 2012). Другая группа обнаружила две миссенс-мутации, локализованные в участке, соответствующем ГТФ-азному домену *SEPT12* (Kuo *et al.*, 2012). Интересно, что такие мутантные белки дозозависимо блокировали способность белка *SEPT12* дикого типа формировать филаменты. T89M мутант обнаруживал сниженую ГТФазную активность *in vitro*, а сперматозоиды пациентов с данной мутацией имели аномальную морфологию и сниженную подвижность.

Изменение в уровне экспрессии септинов было также обнаружено в различных типах рака (Connolly *et al.*, 2011). Существует несколько путей, через которые септины могут вносить вклад в развитие рака. Наиболее очевидная связь состоит в том, что нарушения сегрегации хромосом или цитокинеза, в которых, как было описано выше, участвуют септины, может приводить к анеуплоидии, которая является характерным признаком прогрессии рака. Участие септинов в движении и миграции клеток указывает на возможную роль септинов в метастазировании (Shankar *et al.*, 2010). Другим возможным механизмом может быть участие септинов в апоптозе, запрограммированной клеточной смерти, которая происходит при накоплении клеточных аномалий. *SEPT4_i2*, известный также как ARTS, был охарактеризован как потенциальный тумор-супрессор. Было показано его участие в апоптозном сигнальном пути за счет взаимодействия с ингибитором апоптозных белков XIAP1 (Gottfried *et al.*, 2004).

1.5. Септины дрозофилы

На сегодняшний день септины такого объекта как дрозофила изучены мало. Наиболее подробно представители данного семейства изучены у дрожжей, т.к. на них эти белки были открыты и накоплен большой материал, а также у млекопитающих, т.к. в последнее время септины стали связывать с распространенными болезнями человека. Данные по септинам дрозофилы большей частью носят описательный характер, до сих пор не выяснены

механизмы их действия и взаимодействия, что свидетельствует о слабой изученности этой области.

1.5.1. Характеристика септинов дрозофилы

Всего у дрозофилы известно 5 генов, кодирующих септины: *peanut*, *Sep1*, *Sep2*, *Sep4* и *Sep5*. Данные по локализации генов и их характеристики представлены в **Таблице 3**.

Таблица 3. Гены, кодирующие септины у *Drosophila melanogaster*.

Ген	Локализация	Длина гена, п.о.	Транскрипты, н.	Полипептиды, а/к	Вес белка, кДа	Число аллелей
<i>peanut</i>	44C2	3027	2445 3027	539 539	~68 ~68	21
<i>Septin 2</i> (<i>Sep2</i>)	92F2	2228	1562 1688	360 419	~42 ~50	11
<i>Septin 1</i> (<i>Sep1</i>)	19F5	3403	2026	361	~ 42	10
<i>Septin 4</i> (<i>Sep4</i>)	15A1-A2	10958	2444 2582 2896 2919 2915 2750 2433	427 427 427 427 427 427 375	~50 ~50 ~50 ~50 ~50 ~50 ~44	15
<i>Septin 5</i> (<i>Sep5</i>)	43F8	1789	1704 1729	422 422	~50 ~50	13

Первый септиновый ген дрозофилы - *peanut* - был обнаружен в ходе генетического скрининга мутаций, нарушающих развитие фоторецепторов в сложном глазе дрозофилы (Neufeld, Rubin, 1994). В норме, в ответ на индуктивный сигнал от клеток, соседних с развивающимся глазом, презумптивный R7 фоторецептор принимает судьбу нейрона. Для этой индукции необходим продукт гена *seven in absentia (sina)*: презумптивные R7 клетки, в которых отсутствует *sina*, не отвечают на индуктивный сигнал и не способны развиться в фоторецепторные нейроны. Гипоморфные аллели *sina*, которые отражают частичную потерю активности этого гена, приводят к редуцированному количеству R7 фоторецепторных клеток

в глазу имаго. Среди 9 независимых мутаций, усиливавших действие слабого аллеля *sina*, был один из аллелей гена *peanut* (*pnut*). Т.о. *pnut* является энхансером *sina*.

В клеточной культуре дрозофилы *S2* иммуногистохимическими методами было показано, что в интерфазе белок Pnut находится на плазматической мембране по всей клетке. В поздней анафазе он концентрируется кортикально в области борозды деления. После митоза Pnut остается в межклеточных мостиках, соединяющих дочерние клетки. Во время целлюляризации эмбриона, этот белок обнаруживается в области растущей мембраны. Кроме того, Pnut локализуется на клеточных поверхностях центральной нервной системы эмбриона и на апикальных мембранах развивающихся фоторецепторных клеток в глазных имагинальных дисках. В небольших количествах белок обнаруживается в цитоплазме клеток глазных дисков и ЦНС личинки (Neufeld, Rubin, 1994).

На основе гомологии с септинами дрожжей были идентифицированы два других септина дрозофилы - Sep1 и Sep2 (Fares *et al.*, 1995). С помощью Sep1-специфичных антител была охарактеризована его локализация. Этот белок, как и Pnut, концентрируется в переднем крае (leading edge) борозды деления делящихся клеток и во время целлюляризации эмбриона (см.ниже). Кроме того, Sep1 претерпевает регулярные, координированные с клеточным циклом, перемещения в кортексе синцитиальной бластодермы эмбриона и в клетках эмбриона после гастрюляции. Sep1 также концентрируется в переднем крае эпителия во время dorsal closure эмбриона, в нейронах нервной системы эмбриона, и на базолатеральной поверхности фолликулярных клеток в яичниках. Распределение Sep1 во многих случаях перекрывается с распределением актина (Fares *et al.*, 1995).

Sep2, за некоторыми исключениями, колокализуется с Pnut и Sep1 (Adam *et al.*, 2000). Sep4 и Sep5 практически не изучены. Локализация Sep5 еще не охарактеризована, однако известно, что ген *Sep5* появился за счет ретротранспозиции *Sep2*, белки имеют 70% гомологии между собой. Для Sep4 показано, что он локализуется в основном в центральной нервной системе дрозофилы, и его оверэкспрессия приводит к снижению числа дофаминэргических нейронов (Muñoz-Soriano, Paricio, 2007).

1.5.2. Септиновый комплекс дрозофилы

Из эмбрионального экстракта дрозофилы при помощи антител к Pnut был изолирован комплекс, содержащий три септиновых полипептида Pnut, Sep1 и Sep2 со стехиометрией 1:1:1, дальнейший гель-фильтрационный анализ, а также центрифугирование в градиенте плотности Cs показало, что комплекс имеет молекулярную массу ~340 кДа, и было

предположено, что комплекс содержит по две копии каждого септина (Field *et al.*, 1996). Для выделенного комплекса была показана ГТФ-связывающая активность, при этом на 1 моль септинового полипептида приходилось 1.1 моль гуанинового нуклеотида со средним соотношением ГДФ/ГТФ равным 2.6. Эти данные свидетельствуют о том, что каждый септин в комплексе связывает одну молекулу гуанинового нуклеотида, причем достаточно прочно. Также была измерена способность к обмену и гидролизу ГТФ комплексом, и оказалось, что септиновый комплекс является слабой ГТФазой, причем гидролиз идет относительно быстро по сравнению с обменом нуклеотида (Field *et al.*, 1996). Эти данные совпадают с результатами, полученными на септиновом комплексе человека и дрожжей (Farkasovsky *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Zent, Wittinghofer, 2014). В этой же работе было показано, что септиновые комплексы способны формировать филаменты, причем длина филаментов была всегда кратна 26 нм. Позднее была получена ЭМ реконструкция септинового комплекса дрозофилы, где было показано, что он представляет собой септиновые мономеры, выстроенные линейно, формируя мономер 4 нм толщиной и 24 нм длиной, что согласуется со структурными и биохимическими работами по септинам (Bertin *et al.*, 2008; Field *et al.*, 1996; Sirajuddin *et al.*, 2007; Mavrakakis *et al.*, 2014).

1.5.3. Роль септинов в цитокинезе дрозофилы

Все септины дрозофилы имеют большое сходство по последовательности с продуктами генов *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* и *cdc12* почкующихся дрожжей. Эти гены отвечают за цитокинез и кодируют компоненты кольца из 10 нм филаментов, локализованного в перешейке почки (Douglas *et al.*, 2005).

За счет эксцизии Р-элемента был получен нуль-аллель *pnut*^{XP}, в котором отсутствует почти вся кодирующая часть гена *pnut* (Neufeld, Rubin, 1994). Гомозиготы по мутации *pnut*^{XP} не доживают до взрослого состояния, гибнут вскоре после образования куколки. Личинки имеют сильно редуцированные или у них совсем нет имагинальных дисков (эпителиальных структур, дающих начало тканям и органам имаго). Нервные ганглии таких мутантов содержат полиплоидные и двуядерные клетки (Neufeld, Rubin, 1994).

Похожие дефекты были найдены в фолликулярных клетках яичников мутантов. Мухи *pnut*⁻, несущие Р-элементную конструкцию с нормальным геном *pnut* под контролем *hsp70* промотора, могут доживать до взрослого состояния, если экспрессия *pnut* вызывалась тепловым шоком в течение онтогенеза. Взрослые трансформанты, помещенные в неиндуцирующую температуру (22°C), были стерильны, и яичники таких самок прогрессивно

дегенерировали и содержали фолликулярные клетки с множеством больших ядер (Neufeld, Rubin, 1994). Вышеописанный набор дефектов митоза и паттерн экспрессии сходны с таковыми ранее описанных мутаций дрозофилы, нарушающих цитокинез, и свидетельствуют о роли *pnut* в этом процессе.

В большинстве, если не во всех бороздах деления в ходе цитокинеза, Pnut колокализуется с Sep1 и Sep2, что логично, поскольку для этих септинов было показано формирование комплекса (Fares *et al.*, 1995; Hime *et al.*, 1996; Neufeld, Rubin, 1994). С помощью иммунного окрашивания также было показано, что Pnut, Sep1 и Sep2 колокализуются в кольцевых каналах, соединяющих гаплоидные сперматиды у самцов (Hime *et al.*, 1996). Эти данные по локализации, а также генетические и данные из экспериментов по РНК интерференции указывают на то, что септины играют роль в цитокинезе, как и септины дрожжей.

1.5.4. Роль септинов в целлюляризации

Помимо обычного цитокинеза, в развитии дрозофилы есть особый тип цитокинеза – целлюляризация. Раннее развитие происходит в синцитии, в котором в ходе 13 раундов делений в кортексе эмбриона образуется примерно 6000 тесно расположенных ядер. Затем, во время целлюляризации в интерфазе после 13-ого деления каждое ядро обособляется и образует клетку. В начале под плазматической мембраной образуется шестиугольная цитоскелетная сеть, очерчивающая ядра. Эта сеть состоит из множества белков, включая актин, миозин, актин-связывающий белок анилин, Pnut, Sep1 и Sep2. Затем эта сеть вместе с мембраной инвагинируют между всеми ядрами одновременно (говорят о т.н. целлюляризационном фронте) в ходе «медленной фазы» целлюляризации. В течение «быстрой фазы» цитоскелетная сеть распадается на отдельные кольца в основаниях ядер, которые сокращаются (Adam *et al.*, 2000).

В эмбрионах дикого типа Pnut, Sep1 и Sep2 вместе локализируются во время целлюляризации в целлюляризационном фронте. Отсутствие материнского продукта Pnut не приводит к серьезным дефектам целлюляризации: медленная начальная фаза идет нормально, и даже последующая быстрая фаза идет лишь с небольшими нарушениями (Adam *et al.*, 2000).

Хотя в отсутствие Pnut раннее синцитиальное развитие и начало целлюляризации идут нормально, в течение поздних стадий организация актинового цитоскелета в переднем крае

инвагинирующей борозды становится постепенно все более аномальной, и у эмбрионов обнаруживаются дефекты в морфологии к началу гастрюляции (Adam *et al.*, 2000).

1.5.5. Взаимодействие септинов дрозофилы с другими белками

На сегодняшний день накопилось много данных, свидетельствующих о взаимодействии септинов дрозофилы с белками, участвующими в самых разных процессах (Табл. 4). Это указывает на плеiotропность действия септинов.

Таблица 4. Известные взаимодействия септинов дрозофилы с другими белкам.

Белок	Краткая характеристика белка	Характер взаимодействия
Anillin	Важный белок, необходимый для локализации компонентов сократительного кольца.	Anillin необходим для локализации Pnut и Sep2 в борозде деления (D'Avino, 2009; Field <i>et al.</i> , 2005).
Diaphanous	FH (Formin Homology) белок дрозофилы. Играет важную роль в цитокинезе.	Diaphanous необходим для правильной локализации Pnut (а также миозина II и анилина) в кортикальной области борозды деления (Afshar <i>et al.</i> , 2000).
Orc6	Малая субъединица ORC (origin recognition complex) комплекса. Участвует в репликации и в цитокинезе дрозофилы.	Orc6 взаимодействует с Pnut, и, возможно, регулирует сборку и разборку септиновых комплексов, а также их ГТФазную активность (Huijbregts <i>et al.</i> , 2009; Akhmetova <i>et al.</i> , 2015).
Parkin	Убиквитин-лигаза, гомолог человеческого белка Parkin, мутации в котором вызывают ювенильный паркинсонизм.	Для Pnut и Sep1 показано, что они убиквитинируются Parkin дрозофилы (Bae <i>et al.</i> , 2007).
Ran	ГТФаза, регулирующая образование псевдоборозды деления во время целлюляризации.	Ran необходим для локализации Pnut в псевдоборозде деления (Silverman-Gavrila <i>et al.</i> , 2008).
Ras1	Сигнальный путь, необходимый для передачи внеклеточного сигнала в ядро клетки. Участвует в процессах определения клеточной судьбы в различных тканях и в различное время. В ходе оогенеза дрозофилы ответственен за формирование дорзальных структур оболочки яйца.	Pnut является одним из компонентов Ras1 сигнального пути (Schnorr <i>et al.</i> , 2001).

D-Hillarín	Белок, экспрессирующийся в ЦНС эмбрионов и личинок, а также в борозде деления в культуре клеток S2.	Паттерн экспрессии D-Hillarín в значительной степени перекрывается с паттерном экспрессии Pnut. Кроме того, показано взаимодействие на генетическом уровне (Ji <i>et al.</i> , 2005).
ССТ (Chaperonin containing TCP-1) комплекс	Шаперон, участвующий в фолдинге ряда белков, также вовлечен в формирование септинового кольца у дрожжей и в процесс целлюляризации эмбрионов дрозофилы.	Pnut был мизлокализован из борозды деления при целлюляризации эмбрионов дрозофилы, мутантных по ССТ. Показано также взаимодействие методом иммунопреципитации. По всей видимости, Pnut является субстратом ССТ (Monzo <i>et al.</i> , 2010).

Белок Orc6 является одним из немногих известных на сегодняшний день белков, стимулирующих полимеризацию септинов (известен также белок Borg у млекопитающих, а также его функциональный гомолог у дрожжей - Gic1). Септины дрозофилы, как и других организмов, способны само-полимеризоваться только при достаточно высоких концентрациях. Однако, у дрозофилы было показано, что белок Orc6 стимулирует формирование септиновых филаментов при низких концентрациях септинового комплекса. Orc6 представляет собой наименьшую субъединицу ORC (Origin Recognition Complex) комплекса, он необходим для репликации ДНК (Dutta, Bell, 1997), и большая его часть находится в ядре. Однако, как у дрозофилы (Chesnokov *et al.*, 2001), так и в человеческих клетках (Prasanth *et al.*, 2002), значительная часть пула Orc6 – цитоплазматическая, и было показано, что белок ассоциирует или располагается рядом с плазматической мембраной. У дрозофилы, Orc6 и Pnut колокализуются *in vivo* на клеточных мембранах в бороздах деления, а также в ходе целлюляризации в ранних эмбрионах (Chesnokov *et al.*, 2003). С-концевой домен Orc6 необходим для ассоциации с Orc3 при формировании ORC комплекса, а также с Pnut, однако эти взаимодействия опосредованы различными мотивами внутри С-концевого домена Orc6. РНК интерференция Orc6 приводила к цитокинетическим дефектам в культуре клеток дрозофилы, тогда как РНК интерференция Pnut нарушала локализацию Orc6 на плазматической мембране (Bleichert *et al.*, 2013; Chesnokov *et al.*, 2003; Huijbregts *et al.*, 2009). Была предложена модель, согласно которой Orc6 садится на Pnut белки, находящиеся по краям соседних септиновых комплексов, приводя к конформационным изменениям Pnut, способствующим полимеризации (Huijbregts *et al.*, 2009).

Заключение по обзору литературы

Септины представляют собой высококонсервативные ГТФ-связывающие белки, обнаруженные у большинства эукариот. У дрожжей, а также в соматических клетках многоклеточных септины необходимы для нормального прохождения цитокинеза, и в случае мутаций септиновых генов клетки не разделяются, что приводит к полиплоидии. Однако, до сих пор остается неясной роль септинов в делении генеративных клеток, которое характеризуется неполным цитокинезом, при котором клетки продолжают соединяться друг с другом кольцевыми каналами. В данной работе, при помощи метода РНК-интерференции были исследованы функции септина *Peanut* дрозофилы в оогенезе и сперматогенезе.

Анализ литературных данных позволяет сделать заключение о том, что помимо цитокинеза, септины участвуют во множестве других процессов, таких как движение и полярность клеток, секреция, динамика цитоскелета. Большое разнообразие процессов, в которых задействованы септины, основано на их способности формировать комплексы и филаменты друг с другом. Принадлежа к классу Р-петлевых ГТФ-аз, септины содержат консервативный ГТФ-связывающий домен. Структурные исследования и функциональный анализ септинов, проведенные в последние годы, указывают на роль связывания и гидролиза ГТФ в сборке и разборке септиновых структур (Bertin *et al.*, 2008; Sirajuddin *et al.*, 2007), однако точные механизмы до сих пор невыяснены. На С-конце септинов располагается биспиральный домен, который также может участвовать в регуляции динамики септинов за счет взаимодействия с белками-партнерами. Один из кандидатов – репликационный белок *Orc6* дрозофилы, который стимулирует полимеризацию септиновых филаментов (Huijbregts *et al.*, 2009).

В настоящей работе была исследована роль консервативных доменов септинов на примере белка *Peanut* дрозофилы как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, был более подробно изучен механизм действия *Orc6*, а также влияние ГТФ на септиновые филаменты дрозофилы.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Линии дрозофилы, использованные в работе, и работа с ними

Мух выращивали на обогащенной среде: дрожжи (сухие) – 18г, изюм – 40г, агар-агар – 6-12г, кукурузная крупа – 36г, патока – 50мл, пропионовая кислота – 0,8мл, вода – до 1л. Скрещивания проводили в стаканах диаметром 25мм при 25°C.

В работе были использованы следующие линии мух:

Получены из Блумингтонского центра линий дрозофилы (Bloomington Stock Center, USA):

1. (11194) $cn^1 P\{PZ\}pnut^{02502}/CyO; ry^{506}$ – линия, несущая инсерцию P -элемента $P\{ry+t7.2=PZ\}$ со встроенным репортерным геном β -галактозидазы. Инсерция локализована в некодирующей области гена $pnut$.
2. (5687) $pnut^{XP}/T(2;3)SM6a-TM6B, Tb^1$ – нуль-аллель гена $pnut$, представляющий собой делецию кодирующей части гена.
3. (5905) w^{1118} ;
4. (4937) $w^{1118}; P\{GAL4::VP16-nos.UTR\}CG6325^{MVDI}$ – специфический для генеративных клеток драйвер $nanos-GAL4$.
5. (4414) $y^1 w^*$; $P\{Act5C-GAL4\}25FO1/CyO, y^+$ - повсеместный драйвер $Actin5C-GAL4$.
6. (3731) $P\{GawB\}185Y, w^{1118}$;
7. (7023) $y^1 w^*$; $P\{GawB\}109-30/CyO$;
8. (7024) $y^1 w^*$; $P\{GawB\}109-39/TM3, Sb^1$;
10. (5138) $y^1 w^*$; $P\{w[+mC]=tubP-GAL4\}LL7/TM3, Sb^1 Ser^1$ - повсеместный драйвер $tub-GAL4$;
11. (13134) $w^{1118}; P\{GT1\}chif^{BG02820a}/CyO$.

12. Линия $w;T4+/CyO;bam-GAL4/VP16$ была любезно предоставлена Лактионовым П.П. из ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН.

Линии, любезно предоставленные лабораторией д-ра Чеснокова (г. Бирмингем, США):

13. $pCasper3-FLAG-pnutWT(1-539)$;
14. $pCasper3-FLAG-pnut(1-427)$;
15. $pCasper3-FLAG-pnut(G4)$;
16. $pCasper3-FLAG-pnut(G1,G3,G4)$.

В качестве линий дикого типа использовались:

17. $Hikone-AW$ из фонда сектора генетики клеточного цикла;
18. $Canton-S$ из фонда лаборатории д-ра Чеснокова (Бирмингем, США).

2.2. Детекция β -галактозидазы в различных органах дрозофилы

Использовалась линия №11194 (Блумингтон), несущая инсерцию *P*-элемента $P\{ry+t7.2=PZ\}$ со встроенным репортерным геном β -галактозидазы. Для окраски на β -галактозидазу органы дрозофилы извлекали в растворе Хэнкса, фиксировали в 0.75%-ном глутаровом альдегиде, приготовленном на 0.1М натрий-какодилатном буфере в течение 20 мин при комнатной температуре, отмывали от фиксатора в PBS буфере (130 мМ NaCl, 7 мМ Na₂HPO₄, 3 мМ NaH₂PO₄, pH 7.3) и окрашивали в течение 2-16 часов красящим раствором (10 мМ NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH 7.2 или pH 7.8), 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 3.1 мМ K₄[Fe(CN)₆], 3.1 мМ K₃[Fe(CN)₆], 0.3% тритон X-100, 0.15% X-gal (5-бromo-4-хлоро-3-индоксил- β -D-галактопиранозид)) Для остановки реакции окрашивания органы промывали водой и переносили в 30% глицерин.

2.3. Препараты митозов нервных ганглиев

Нервные ганглии личинок третьего возраста выделяли и накапливали в растворе Хэнкса. Затем их выдерживали 5 минут в гипотоническом растворе (0,075М KCl) и фиксировали 20 минут фиксатором Карнуа (смесь метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1). После этого ганглии переносили в каплю пропионовой кислоты на предметное стекло и диспергировали препаровальной иглой. Затем препараты высушивали, красили 5% раствором Гимза 30 минут, и, после промывки дистиллированной водой и очередного высушивания, заключали в канадский бальзам (Лебедева и др., 2003).

2.4. Получение плазмидной конструкции для проведения РНК-интерференции гена *pnut*

Для получения гибридной плазмиды, содержащей функциональную часть плазмиды *pWIZ* (Lee, Carthew, 2003), соответствующий участок *pWIZ* размером около 100 п.н. (интрон гена *white*) был амплифицирован с использованием праймеров 5'-TGCCCGTGGGGTTTGAAT-3' и 5'-GTCTAGATTATAAGCTAGCTGAGTTTCA-3'. Полученный фрагмент встроили в плазмиду *pUASP* по сайтам рестрикции NotI и XbaI с получением плазмиды *pUASP-W*. Для получения плазмиды для проведения РНК-интерференции гена *pnut*, участок этого гена был амплифицирован с помощью праймеров 5'-GGGTACCAACACCATCATCGA-3' и 5'-TGCTGGTGTGTGTTCCGGG-3' и встроен в плазмиду *pUASP-W* по обеим сторонам от интрона гена *white* в обратной ориентации. Трансформация в зародышевую линию дрозофилы проводилась согласно описанной ранее

методике (Шилова и Омелянчук, 2007). Была получена встройка конструкта *pUASP-W-pnut_RNAi* в III хромосому.

2.5. Получение трансгенных линий дрозофилы

Для мутанта Pnut(1-460 а/к) получение конструкции для трансформации проводилось автором самостоятельно. Трансгенные линии дрозофилы, содержащие Pnut дикого типа, делеционный мутанты Pnut(1-427 а/к), а также ГТФазные мутанты Pnut(G4) и Pnut(G1,G3,G4) были любезно предоставлены лабораторией д-ра Чеснокова (Бирмингем, США). Для получения конструкций для трансформации, последовательности кДНК, кодирующие соответствующие формы Pnut, были клонированы в модифицированный вектор *pCasper3*. В этом векторе в промоторной области были удалены все UAS-последовательности и вставлены 1.7 килобаз 5' UTR *pnut* (предполагаемый промотор). Все конструкции также содержат на 5' конце от кДНК *pnut* последовательность, кодирующую FLAG полипептид. Все полученные конструкты были трансформированы в w^{1118} эмбрионов дрозофилы (Model System Genomics, Duke University, Северная Каролина, США). Взрослых мух индивидуально скрещивали с особями линии w^{1118} , анализировали их потомство и получали отдельные трансгенные линии. Для каждой конструкции было получено несколько (не менее 3) независимых трансгенных линий мух. С помощью генетического картирования были определены хромосомы, в которые произошла инсерция конструкций, кодирующих разные мутантные формы Pnut. Экспрессия трансгенов была проверена Вестерн блоттингом с использованием антител к FLAG и Pnut.

Для экспериментов по спасению нуля-аллеля, гетерозиготных самцов и самок $w^{1118}; pnut^{XP}/Cy; FLAG-pnut/+$ (где $pnut^{XP}$ - нуль-аллель гена *pnut* (Neufeld, Rubin, 1994)) скрещивали между собой и проверяли наличие спасенных особей с генотипом $w^{1118}; pnut^{XP}/pnut^{XP}; FLAG-pnutWT/+$ или $w^{1118}; pnut^{XP}/pnut^{XP}; FLAG-pnutWT/FLAG-pnutWT$. Наличие трансгена определяли при помощи цвета глаз мух, закодированного геном *mini-white*, содержащемся в трансгенной конструкции.

2.6. Иммунохимическое окрашивание органов дрозофилы

2.6.1. Приготовление давленных препаратов семенников и нервных ганглиев личинок

В работе были использованы первичные антитела: mouse anti- γ -Tubulin, mouse anti- α -Tubulin, rabbit anti-pH3-histone; вторичные антитела: goat anti-rabbit Alexa 568 fluor, goat antimouse Alexa 488 fluor. Приготовление препаратов проводилось согласно методике, описанной ранее (Bonaccorsi *et al.*, 2000). Нервные ганглии и семенники личинок третьего

возраста выделяли и накапливали в растворе Хэнкса. Затем их выдерживали 30 минут в 3,7% растворе HCl в PBS. После этого инкубировали в 45% уксусной кислоте в течение 3-4 минут (для окрашивания на альфа-тубулин перед этим выдерживали в метаноле в течение 2 минут), переносили на предметное стекло в каплю 60% уксусной кислоты. Накрывали сверху покровным стеклом, мягко давили, замораживали в жидком азоте и скалывали покровное стекло. Далее выдерживали 10 минут в 96% этаноле при -20°C . После этого проводили пермеабиллизацию в PBT (0,1% раствор Triton-X в PBS) 10 минут, отмывали 2 раза по 5 минут в PBS и обрабатывали в течение 45 минут блокирующим раствором (5% обезжиренное сухое молоко, 0,5% BSA в PBS). Затем отмывали 2 раза по 10 минут в PBT и инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C .

Затем снова отмывали 2-3 раза по 15 минут в PBT и инкубировали с вторичными антителами 3-4 часа при комнатной температуре. После этого отмывали 2 раза по 15 минут в PBT и красили DAPI 3-5 минут (для семенников 15 минут). Отмывали 5 минут в дистиллированной воде и заключали в Mowiol, содержащий 2,5% DABCO. Микроскопический анализ проводился в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН на микроскопах Axioscope 2 plus и LSM 510 Meta (Zeiss).

2.6.2. Иммунохимическое окрашивание целых органов дрозофилы

В работе были использованы первичные антитела: rabbit anti-Pnut (1:1000) (Huijbregts et al., 2009), mouse anti-Pnut (4C9H4: G.M.Rubin, DSHB, 1:500), rabbit anti-Sep1 (1:1000, gift of Dr. Chesnokov), rabbit anti-Sep2 (1:1000, gift of Dr. Chesnokov), mouse anti- α -spectrin (3A9: D.Branton, R.Dubreuil, DSHB, 1:30), mouse anti-FLAG (Sigma-Aldrich, 1:500). Вторичные антитела: goat anti-mouse Alexa 568 fluor, goat anti-rabbit Alexa 488 fluor, goat anti-mouse Alexa 488 fluor, goat anti-rabbit Alexa 568 fluor (Molecular Probes®, 1:1000).

Имагинальные диски, нервные ганглии и слюнные железы личинок третьего возраста, а также семенники и яичники имаго диссектировали в растворе Рингера (7.5 г NaCl, 0.35 г KCl и 0.279 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на 1 л дистиллированной воды) и фиксировали 20 минут в 4% растворе формальдегида в PBS (1.47 мМ KH_2PO_4 , 4.29 мМ Na_2HPO_4 , 137 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl, pH 7,2). Затем промывали 3 раза по 15 минут в PBST (PBS с добавлением 0.3% Triton X-100) и блокировали в течение 1 часа блокирующим раствором (PBST содержащим 10% нормальной сыворотки козы). Далее инкубировали с первичными антителами в блокирующем растворе в течение ночи при 4°C . Затем снова отмывали 3 раза по 15 минут в PBST и инкубировали с вторичными антителами в блокирующем растворе 2-4 часа при

комнатной температуре. После этого отмывали 3 раза по 15 минут в PBST и красили DAPI (Roche) 3-5 минут. Отмывали 5 минут в PBS и заключали в 80% глицерол, 18% PBS, and 2% N-пропил галлат. Микроскопический анализ проводился на Olympus BX61 моторизованном микроскопе, оборудованном модулем дисковой сканирующей системы DSU для получения псевдо-конфокального изображения.

2.6.3. Приготовление препаратов яичников и семенников дрозофилы, окрашенных по DAPI

Для приготовления препаратов яичников и семенников дрозофилы, окрашенных по DAPI, изолированные в растворе Хэнкса органы фиксировали в течение 20 минут в 4% растворе формальдегида, отмывали в PBS три раза по 10 мин при комнатной температуре. Затем инкубировали в PBS с добавлением DAPI (2мкг/мл) в течение 5 минут. Промывали в PBS один раз 10 минут и заключали в 20% глицерин. Микроскопический анализ проводился в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН на микроскопах Axioscope 2 plus и LSM 510 Meta (Zeiss).

2.7. Определение стадии гибели эмбрионов

Для определения стадии гибели эмбрионов яйца, отложенные в течение 1 ч, собирали и помещали на предметное стекло в каплю галокарбонового масла. Стекла с эмбрионами держали во влажной камере при 25°C, стадии развития эмбрионов определяли по В. Фое (Фое, 1989) под бинокулярной лупой в проходящем свете.

2.8. Экспрессия индивидуальных септиновых белков дрозофилы

Плазмидные конструкции для экспрессии индивидуальных септинов в системе *E.coli* были любезно предоставлены лабораторией д-ра Чеснокова (Бирмингем, США). В данных конструкциях последовательности кДНК, кодирующие Sep1 (дикого типа), а также Pnut (дикого типа, делеционных и ГТФазных мутантов), были встроены в *pET-Duet* экспрессирующий вектор для получения белка, меченного гистидиновым тэгом (His-tag) на N-конце – His-Pnut и His-Sep1. Последовательности кДНК, кодирующие Sep2 дикого типа были встроены в *pGEX-4T1* экспрессирующий вектор для получения белка с глутатион-S-трансферазным тэгом (GST-tag) на N-конце – GST-Sep2.

Плазмиды были трансформированы в *E.coli* (штамм *BL21 DE3*). Колонии растили в среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина при 37°C до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0.6$. Культуры переносили на 16°C, и экспрессия белка индуцировалась добавлением 0.4 mM ИПТГ в течение ночи. Далее клетки были собраны центрифугированием, ресуспендированы в ледяном лизирующем буфере (25 mM HEPES-

NaOH pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM ЭДТА, ингибиторы протеаз - 0.1 mM фенилметилсульфонилфторид, лейпептин 0.5 мкг/мл, апротинин 0.5 мкг/мл, пепстатин 1 мкг/мл) и лизированы при помощи French press, после чего His-Pnut и His-Sep1 были изолированы из лизированной смеси при помощи кобальт-агарозы HisPur Cobalt resin (Thermo Scientific), и GST-Sep2 был изолирован с использованием глутатион-агарозы Pierce Glutathione agarose (Thermo Scientific) согласно рекомендациям производителя.

His-Pnut был далее очищен на 5 мл HiTrap SP HP катионном обменнике (GE Healthcare). Белок был элюирован с колонки с использованием градиента соли от 100 mM до 1M NaCl в HEPES буфере (25 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM ЭДТА, 5% глицерол, 1 mM ДТТ). His-Sep1 и GST-Sep2 были очищены при помощи 5 мл HiTrap Q HP анионного обменника (GE Healthcare). Белки были элюированы с использованием градиента соли от 50 mM для Sep1 или 100 mM для Sep2 до 1M NaCl в HEPES буфере. Фракции элюции были проанализированы на содержание белков при помощи электрофореза белков в ПААГ с последующей окраской кумасси, а также вестерн-блоттингом с использованием кроличьих поликлональных антител к Pnut (1:1000), Sep1 (1:1000) и Sep2 (1:1000), любезно предоставленных д-ром Чесноковым (Университет Алабамы в Бирмингеме, Бирмингем, США).

GST-тег был удален от очищенного GST-Sep2 белка с помощью тромбиновой протеазы.

2.9. ГТФазный анализ индивидуальных септинов

50 мкг His-Pnut или His-Sep1, или 100 мкг Sep2 были разведены в 200 мкл ГТФазного буфера (25 mM HEPES-KOH pH 7.6, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 50 mM KCl, 1 mM ДТТ), содержащего 5 мкКи [α -³²P]GTP (3000 Ки/мМоль, GE Healthcare), и также холодный 2 мкм ГТФ. Реакцию инкубировали 4 часа при 21°C. Аликвоты по 100 мкл были разведены в 900 мкл ледяного ГТФазного буфера и нанесены на нитроцеллюлозные мембранные фильтры диаметром 25 мм (0.22 μ m, Millipore), соединенные с вакуумным коллектором (Millipore). Фильтры были промыты 6 раз 3 мл ледяного ГТФазного буфера. Включение нуклеотида в септиновые белки было проанализировано при помощи измерения ³²P радиоактивности на фильтрах на жидкостном сцинтилляционном детекторе. Гидролиз ГТФ был анализирован при помощи элюирования связанного с септином нуклеотида с фильтра 100 мкл элюционного буфера (8 M мочевины, 5 mM ЭДТА, 20 mM Tris-HCl pH 7.5). 10 мкл элюата были анализированы на соотношение нуклеотидов ГТФ и ГДФ при помощи тонкослойной хроматографии на полиэтилениминовых целлюлозных пластинках (polyethyleneimine (PEI)-

cellulose plates, Selecto Scientific). Мочевину удаляли при помощи проявления хроматографических пластин в воде. Пластины затем высушивали и проявляли в 0.85 M KH_2PO_4 pH 3.4. Радиоактивные пятна ГТФ и ГДФ были измерены посредством визуализации при помощи phosphorimaging.

2.10. Очистка септинового комплекса дрозофилы из клеток, инфицированных бакуловирусом

Рекомбинантные бакуловирусы для экспрессии индивидуальных септинов дрозофилы Pnut, Sep1 и Sep2, полученные при помощи Bac-to-Bac системы (Invitrogen), были любезно предоставлены лабораторией д-ра Чеснокова (Бирмингем, США). Принципиальная схема такова: ген интереса клонируется в донорную плазмиду *pFastBac*, и рекомбинантная плазида трансформируется в *DH10Bac* компетентные клетки, которые содержат бакмиду с *mini-attTn7* сайтами, а также хэлперную плазмиду. Ген интереса включается в бакмиду при помощи сайт-специфической транспозиции *mini-Tn7* элементов на донорной плазмиде *pFastBac* с сайтами-мишенями *mini-attTn7* бакмиды в присутствии белков транспозиции, которые кодируются хэлперной плазмидой. Колонии, содержащие рекомбинантную бакмиду, отбираются по нарушению гена *lacZa*. Соответствующие колонии *E.coli* далее наращиваются, из них выделяется ДНК бакмиды, и затем эта ДНК используется для трансфекции клеток насекомых для получения бакуловируса.

Для экспрессии белков с целью наработки септинового комплекса использовались клетки High Five (Invitrogen) из *Trichopulsia ni*. Р3 стоки бакуловирусов, содержащих Sep1, Sep2 и His-Pnut конструкции, смешивали друг с другом. 10×10^6 High Five клеток высевали в 25 мл среды в 150x20 мм культуральной чашке и оставляли прикрепиться на 30 минут при 27°C. Затем клетки инфицировали смесью трех вирусов (1.5 мл на чашку). Через 72 часа клетки проверяли на поздние признаки вирусной инфекции (лизис): клетки должны выглядеть крупнее по размерам, содержать везикулы, открепляться от поверхности чашки. Если все эти признаки наблюдались, клетки вместе со средой переносили в чистую пробирку приступали к очищению септинового комплекса. Для этого клетки осаждали центрифугированием 2500xg 5 минут при 4°C и осадок ресуспендировали в ледяном лизирующем буфере (10 mM HEPES-KOH pH 7.6, 15 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM ЭДТА, ингибиторы протеаз - 0.1 mM фенилметилсульфонилфторид, лейпептин 0.5 мкг/мл, апротинин 0.5 мкг/мл, пепстатин 1 мкг/мл) из расчета 10 мл буфера на 5 культуральных чашек. Ресуспендированные клетки инкубировали 15 минут на льду, после чего лизировали при помощи гомогенизатора Даунса в течение 5 минут на льду. К лизированной смеси

добавляли NaCl до концентрации 300 мМ, и осаждали ядра центрифугированием на низких оборотах - 1800xg 10 минут при 4°C. В супернатант добавляли имидазол до концентрации 10 мМ и переносили в пробирку с промытой лизирующим буфером никель-агарозой (Ni-NTA beads, Pierce) из расчета 0.5 мл на 5 культуральных чашек. Смесь инкубировали с вращением 2 часа при 4°C. Затем, агарозу со связанным с ней белком промывали 50 объемами промывочного буфера (10 мМ HEPES-КОН pH 7.6, 300 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 0.1 мМ ЭДТА, 20 мМ имидазол). Белок элюировали 5 мл элюционного буфера (10 мМ HEPES-КОН pH 8.0, 300 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 0.1 мМ ЭДТА, 250 мМ имидазол, 5% глицерин). Элюционные фракции, содержащие комплекс, были далее очищены на 1 мл HiTrap Q HP анионном обменнике (GE Healthcare) с использованием градиента от 50 мМ до 1М NaCl в HEPES буфере (25 мМ HEPES-NaOH pH 8.0, 2 мМ MgCl₂, 0.1 мМ ЭДТА, 5% глицерин, 1 мМ ДТТ). Септиновый комплекс элюируется при ~200 мМ NaCl. 10 мкл из каждой фракции смешивали с 2 мкл загрузочного буфера, и анализировали при помощи электрофореза белков в ПААГ в присутствии SDS по Лэммли с последующей окраской кумасси.

2.11. Анализ связывания ГТФ рекомбинантными септиновыми комплексами

2 мкг рекомбинантного септинового комплекса His-Pnut-Sep2-Sep1 (дикого типа или мутантного) были разведены в 25 мкл ГТФазного буфера с добавлением 0.05 мг/мл BSA, содержащего 5 мкКи [α -³²P]GTP (3000 Ки/мМоль, GE Healthcare), и также холодный 2 мкм ГТФ. Реакцию инкубировали 1 час при 21°C. Затем реакцию разводили в 10 раз ледяным ГТФазным буфером, и 5 аликвот по 50 мкл наносили в ячейки вакуумного коллектора (Bio-Dot® SF, Bio-Rad), выложенные 0.22 мкм нитроцеллюлозным мембранным фильтром. Фильтр в каждой ячейке промывали 4 раза 1 мл ГТФазного буфера, высушивали, и количество связанного нуклеотида анализировали при помощи измерения ³²P радиоактивности на фильтрах на жидкостном сцинтилляционном детекторе.

2.12. Анализ гидролиза ГТФ рекомбинантными септиновыми комплексами

4 мкг рекомбинантного септинового комплекса His-Pnut-Sep2-Sep1 (дикого типа или мутантный) были разведены в 20 мкл ГТФазного буфера с добавлением 2 мкМ фосфатного сенсора (Invitrogen). Реакция запускалась добавлением ГТФ до концентрации 100 мкМ. Фосфатный сенсор представляет собой фосфат-связывающий белок, соединенный с флюорофором. Когда сенсор связывает свободный неорганический фосфат, интенсивность флюоресценции увеличивается. Измерения были проведены на Synergy 2 multi-mode microplate reader (BioTek) при длинах волн возбуждения 360(40) нм и эмиссии 460(40) нм.

2.13. Методы детекции белков

2.13.1. Электрофорез белков в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли

Электрофорез белков проводили в ПААГ размером 84x80x0.75 мм, используя прибор для гель-электрофореза Mini PROTEAN 3 Cell фирмы BIO-RAD (США). Для разделения белков использовался ПААГ, состоящий из концентрирующего геля (5% акриламидной смеси, 0.125 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% персульфат аммония) и разделяющего геля (8-12% акриламидной смеси, 0.375 мМ Tris pH 8.8, 0.1% додецилсульфата натрия, 0.1% персульфат аммония). Обе смеси приготавливались каждый раз непосредственно перед фореозом в необходимых количествах. Для приготовления гелей использовалась смесь 30:0.8 акриламида и бис-акриламида (National Diagnostics). К раствору разделяющего геля добавляли ТЕМЕД (5 мкл на 10 мл) и заливали раствор между стеклянными пластинами, вставленными в устройство для заливки геля (примерно 3 мл раствора на один гель). Сразу же сверху наносили тонкий слой смеси бутанола с водой 1:1 для выравнивания поверхности. После того, как гель застыл, бутанол убирали, высушивали, в концентрирующий гель добавляли ТЕМЕД (2 мкл на 2 мл) и заливали его поверх разделяющего до края стеклянной пластины (примерно 0.7 мл раствора на один гель). Сразу же вставляли зубчатую пластинку для создания карманов для нанесения проб. Оставляли полимеризоваться на 10 минут. Затем стеклянные пластины с гелем между ними закрепляли в устройстве для электрофореза при помощи специальных зажимов, заливали электрофорезный буфер (25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 0.1% SDS) в верхнюю и нижнюю камеры и промывали карманы буфером. Наносили пробы, маркер, и разделяли при напряжении 180 В до тех пор, пока бромфеноловый синий, входящий в состав буфера для нанесения, не доходил до нижнего края геля.

2.13.2. Окраска белкового геля с помощью Кумасси

После электрофореза гель осторожно переносили в красящий раствор (45% метанол, 10% ледяная уксусная кислота, 0.025 г/мл кумасси ярко-голубого R-250) и инкубировали при перемешивании 15 мин-2 часа в зависимости от свежести краски. После этого гель отмывали в отмывочном растворе 1 (50% метанол, 10% ледяная уксусная кислота) в течение 1-3 часа, и в отмывочном растворе 2 (7% метанол, 5% ледяная уксусная кислота) 1-5 часов. Затем гель фотографировали и высушивали.

2.13.3. Вестерн-блоттинг

Вестерн-блот проводили влажным методом с использованием модуля Mini Trans-Blot для прибора для гель-электрофореза Mini PROTEAN 3 Cell фирмы BIO-RAD (США). После

электрофореза гель инкубировали в буфере для переноса (47.9 mM Tris, 38.6 mM глицин, 0.037% SDS, 10% метанол) 15 минут. В это время вырезали мембрану для переноса нужного размера (Immobilon-P, 0.45 мкм, Millipore), смачивали в метаноле 15 секунд, затем промывали в воде 2 минуты, и инкубировали в буфере для переноса 5 минут. Приготавливали так называемый «сэндвич»: на катодную пластину складывали губчатую прокладку, смоченную в буфере для переноса, на нее накладывали листок бумаги (Whatman 3MM). Затем на бумагу помещали гель, сверху клали мембрану для переноса, которую накрывали смоченным в буфере листком бумаги, губчатой прокладкой и закрывали анодной пластинкой. Аккуратно переносили «сэндвич» в модуль Mini Trans-Blot, закрепляли его в прибор для гелевого электрофореза, наполняли охлажденным буфером для переноса и проводили перенос при 50-60 В в течение часа.

После переноса мембрану инкубировали в блокирующем растворе (TBS-T буфер 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6, 0.1% Tween 20 с добавлением 1% щелочного раствора казеина (Novagen)) в течение 1 часа, затем инкубировали с первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе в течение 1 часа, отмывали 3x15 минут в TBS-T буфере. Далее инкубировали с HRP-конъюгированными вторичными антителами, разведенными в TBS-T блокирующем растворе в течение 1 часа с последующей отмывкой мембраны 3x15 минут в TBS-T буфере. Для визуализации вторичных антител использовался кит для хемилюминисцентной детекции Chemiluminescent Sensitive Plus HRP Substrate (Surmodics®), регистрацию сигнала проводили на пленке Blue Devil Lite (Genesee Scientific).

2.14. Экспрессия рекомбинантного Orc6

Экспрессирующий вектор *pQE-30* со встройкой кДНК *Orc6* дикого типа был любезно предоставлен Баласовым М.Л. (лаборатория д-ра Чеснокова). Плазмида была трансформирована в *E.coli* (штамм *M15*). Колонии растили в LB бульоне Миллера с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина при 37°C до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0.6$, после чего экспрессия белка индуцировалась добавлением 1 mM ИПТГ в течение 4 часов. Клетки собирали центрифугированием и лизировали при помощи French press. His-Orc6 из лизата выделяли с использованием HisPur Cobalt resin (Thermo Scientific), после чего белок очищали на 5 мл HiTrap SP HP катионном обменнике (GE Healthcare) с использованием градиента соли от 100 mM до 1M NaCl в HEPES буфере (25 mM HEPES-NaOH pH 7.6, 2 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ).

2.15. Электронная микроскопия

2.15.1. Электронная микроскопия септиновых комплексов и филаментов

Рекомбинантный септиновый комплекс His-Pnut-Sep2-Sep1 (дикого типа или мутантный) разводили в ГТФазном буфере (25mM Hepes-KOH pH 7.6, 2mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 50mM KCl) до 10 нг/мкл. Где необходимо, добавляли His-Orc6 дикого типа или мутантный до 15 нг/мкл, а также ГТФ, ГДФ или ГТФγS в указанных концентрациях. Образцы инкубировали 2 часа при 22°C, после чего 3 мкл реакции наносили на медную сеточку, покрытую углеродной подложкой (CF400-Cu, Electron Microscopy Sciences) и инкубировали 3 минуты, после чего избыток раствора удаляли с сеточки фильтровальной бумагой, и белки на сеточке фиксировали 1% раствором уранилацетата в 30% этаноле в течение 1 минуты. Затем убирали фиксатор и сеточки высушивали. Препарат анализировали на электронном микроскопе FEI Tecnai F20 в режиме 200 кВ.

2.15.2. Статистический анализ длин филаментов

Рекомбинантный септиновый комплекс His-Pnut-Sep2-Sep1 дикого типа (10 нг/мкл) инкубировали в присутствии Orc6 (15 нг/мкл) без добавления нуклеотида (контрольная реакция), а также с добавлением 1 mM ГТФ, 1 mM ГДФ или 1 mM ГТФγS. Реакцию проводили в течение двух часов при комнатной температуре (22°C), после чего визуализировали при помощи ЭМ. Частоты мономерных – n-мерных филаментов были посчитаны с 10 ЭМ фотографий (>800 филаментов) для каждой реакции, и затем сгруппированы на основании длины. 24 нм было принято за длину мономерного септинового комплекса (Field *et al.*, 1996; Mavrakis *et al.*, 2014).

Критерий хи-квадрат использовался для сравнения распределения частот длин филаментов. При этом ожидаемые частоты для реакций с ГТФ, ГДФ или ГТФγS рассчитывались исходя из распределения частот в контрольной реакции (без добавления нуклеотида). Стандартизованные остатки были посчитаны для каждой группы как: (наблюдаемое значение - ожидаемое значение) / √ожидаемое значение. Группы, в которых значение Стандартизованного остатка превышало 2, считались вносящими наибольший вклад в различие между двумя распределениями.

2.15.3. Локализация Orc6 на септиновых филаментах

Для локализации His-Orc6 на септиновых филаментах в реакции филаментообразования, гистидиновый тэг был удален из септинового комплекса дикого типа His-Pnut-Sep2-Sep1 при помощи AcTEV протеазы согласно рекомендациям производителя (Invitrogen). His-Orc6 (15 нг/мкл) инкубировали с септиновым комплексом дикого типа Pnut-

Sep2–Sep1 (20 нг/мкл) в присутствии или отсутствии 1мМ ГТФ в 20 мкл ГТФазного буфера. После двух часов инкубации при 22°C 3 мкл реакции наносили на ЭМ сеточку на 3 минуты, после чего избыток жидкости убирала и окрашивала 20 минут при помощи 5нм Ni-NTA Nanogold® реагента (Nanoprobes, cat. 2082) следуя рекомендациям производителя. ЭМ фотографии из трех независимых экспериментов по мечению His-Orc6 (более 30 филаментов) были проанализированы для определения стехиометрии связывания His-Orc6 с септиновым комплексом. Для этого, количество частиц золота Nanogold (где каждая частица полагалась соответствующей одной молекуле His-Orc6) на каждом филаменте было поделено на число 24-нм мономеров, составляющих данный филамент.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Анализ экспрессии гена *pnut*

Экспрессию гена *pnut* выявляли при помощи окраски на β -галактозидазу. Для этого мы использовали линию № 11194 (Блумингтон), несущую инсерцию *P*-элемента $P\{ry+t7.2=PZ\}$ с встроенным репортерным геном β -галактозидазы. Встройка *P*-элемента локализована в некодирующей области гена *pnut*. Результаты окраски представлены на **Рис. 4**. Необходимо отметить, что наблюдаемая окраска ядер обусловлена наличием сигнала ядерной локализации для репортерного гена.

На эмбриональной стадии окрашиваются ядра клеток хориона, а также область дорзальных выростов. На личиночной стадии окраска наблюдается в нервных ганглиях, как в оптических (в области внешних пролиферативных центров), так и в вентральной долях. В крыловых, ножных и глазо-антеннальных имагинальных дисках экспрессия репортерного гена наблюдалась в различных группах клеток. Кроме того, на стадии личинки экспрессия обнаруживается в ядрах слюнных желез и в апикальной части дистального конца семенника.

На стадии имаго окраска выявляется в яичниках: в ранних яйцевых камерах – в зоне гермариума, где происходит обволакивание будущих цист фолликулярными клетками, в поздних яйцевых камерах – в ядрах питающих клеток и фолликулярных клеток, образующих оболочку яйцевой камеры. В семенниках взрослых особей окраска наблюдается в клетках апикальной части дистального конца семенника, а также в группах клеток либо в отдельных клетках вдоль всего семенника, за исключением области делений мейоцитов.

Т.о., мы показали, что ген *pnut* экспрессируется на всех стадиях развития дрозофилы. Мы обнаружили, что экспрессия наблюдается в тех местах, где идут деления соматических клеток (внешние пролиферативные центры оптических долей нервных ганглиев, определенные группы клеток в имагинальных дисках). В гонадах в областях делений генеративных клеток экспрессии обнаружено не было, однако она выявляется в клетках соматического происхождения (клетки хориона на эмбриональной стадии, фолликулярные клетки в яичниках, а также клетки, находящиеся в апикальной части дистального конца семенника).

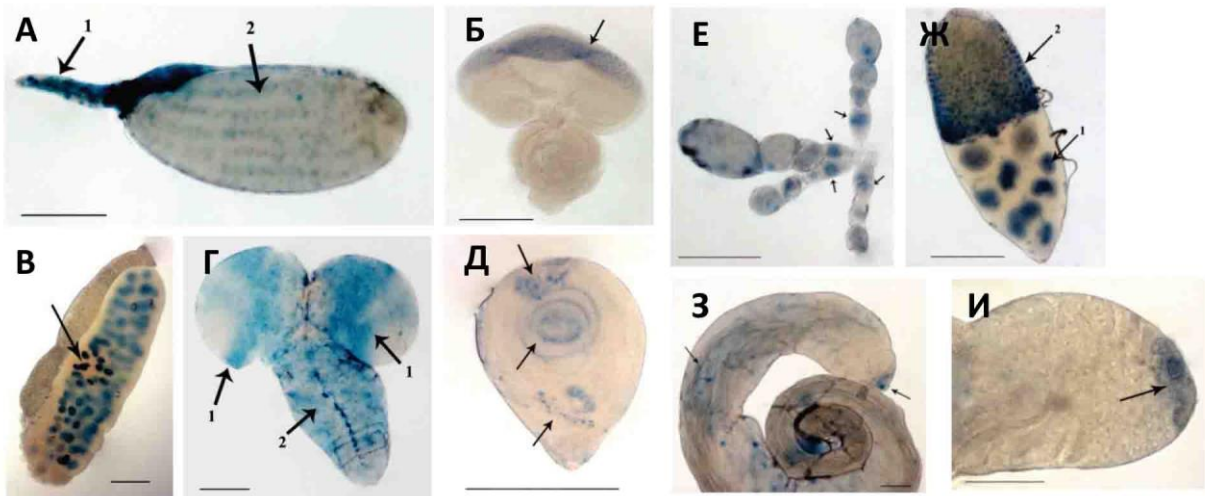


Рис. 4. Паттерн экспрессии репортерного гена β -галактозидазы в составе Р-элемента $P\{PZ\}pnut^{02502}$. Стрелками указаны области экспрессии репортерного гена. (А) Эмбрион дрозофилы (1 - дорзальные выросты, 2 - клетки хориона); (Б) глазо-антеннальный имагинальный диск; (В) слюнная железа личинки; (Г) нервный ганглий личинки (1 – оптические доли, 2 – вентральная доля); (Д) ножной имагинальный диск; (Е) окраска в зоне гермариума яичника; (Ж) окраска в яйцевой камере поздней стадии (1 - питающие клетки (трофоциты), 2 – фолликулярные клетки); (З) общий вид семенника; (И) дистальный конец семенника. Масштаб 50 мкм.

3.2. Влияние продукта гена *pnut* на деления соматических клеток

Септины были открыты как белки, принимающие участие в цитокинезе. Авторы, впервые открывшие ген *pnut*, показали дефекты цитокинеза в соматических тканях гомозигот по нуль-аллелю *pnut*^{XP} (Neufeld, Rubin, 1994). Мы решили более тщательно изучить влияние мутаций в гене *pnut* на деления как соматических, так и в генеративных клеток. Как было показано в предыдущем разделе, мы обнаружили высокий уровень экспрессии *pnut* в нервных ганглиях, представляющих собой личиночный орган дрозофилы, состоящий из активно делящихся мелких ганглиозных клеток и крупных нейробластов. Поэтому в качестве модели соматической ткани мы использовали данный личиночный орган.

Мы провели цитологический анализ митозов в клетках нервных ганглиев личинок дрозофилы, нуль-аллельных по *pnut* (мутация *pnut*^{XP}). По морфологическим особенностям хромосом различали следующие стадии митоза (Лебедева и др., 2000): ПМ – прометафаза: сестринские хроматиды еще не разошлись, хроматин находится в деконденсированном (ранняя прометафаза) или еще не равномерно конденсированном состоянии (поздняя прометафаза); М – метафаза: сестринские хроматиды разъединены по всей длине, кроме центромерных районов, конденсация равномерная по всей длине плеч хромосом; НА – начало анафазы: сестринские хроматиды разъединены по всей длине включая область

центромеры, без видимой поляризации хроматид и расхождения их к полюсам; А – анафаза: расхождение хроматид к противоположным полюсам. Результаты по распределению клеток нервных ганглиев по стадиям митоза нуль-аллельных личинок и личинок дикого типа представлены в **Таблице 5**. Следует отметить, что частота встречаемости клеток на определенной стадии митоза отражает длительность данной стадии. Из **Таблицы 5** видно, что у личинок *pnut^{XP}/pnut^{XP}* стадия прометафазы значительно удлинена по сравнению с диким типом, а стадия метафазы укорочена. Кроме того, на стадии анафазы находилось почти в 2 два раза меньше клеток, чем у дикого типа.

Таблица 5. Распределение клеток нервных ганглиев личинок дрозофилы дикого типа, а также *pnut^{XP}* по стадиям митоза.

	Суммарное количество ядер	Прометафаза %	Метафаза %	Начало анафазы %	Анафаза %	Аномалии митоза	
						Полиплоидия %	Анеуплоидия %
<i>Hikone-AW</i> (дикий тип)	379	23,74	56,99	6,33	12,94	0	2.64
<i>pnut^{XP}/pnut^{XP}</i>	216	43,52*	44,91*	4,17	7,40*	23.15	4.63

* - достоверное отличие от дикого типа (*Hikone-AW*), $P > 0,95$ по критерию Стьюдента

Помимо различий в длительности стадий, у мутантов по гену *pnut* наблюдались аномалии плоидности (см. **Рис. 5, Табл. 5**): полиплоидия (количество хромосом в ядре больше диплоидного набора и кратно гаплоидному набору) и анеуплоидия (количество хромосом в ядре не кратно гаплоидному набору). Кроме того, с невысокой частотой наблюдались аномалии сегрегации хромосом: 1) монополярная анафаза: сформировался только один полюс веретена деления, и все хромосомы движутся к нему, 2) анафаза с плохо сформированными полюсами, 3) удлинение стадии ранней анафазы. Аномалии сегрегации хромосом указывают на то, что у мутантов затронут митотический аппарат. Для подтверждения этого мы провели иммунохимическое окрашивание клеток нервных ганглиев антителами, специфичными к микротрубочкам веретена, а также антителами, связывающимися с белками центросом. В большинстве случаев веретено деления, а также расположение и количество центросом были нормальными. Однако встречались такие нарушения, как монополярное веретено деления и нерасхождение центросом, мультиполярное веретено деления, а также хромосомные мосты (**Рис. 6**).

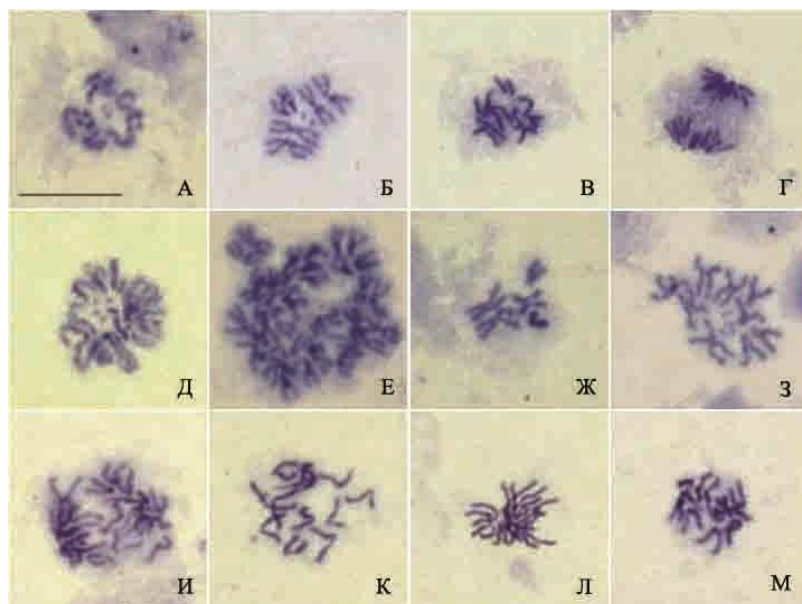


Рис. 5. Аномалии митоза в клетках нервных ганглиев личинок, мутантных по гену *pnut*. А, Б, В, Г – нормальные прометафаза, метафаза, начало анафазы и анафаза соответственно; Д - полиплоидная прометафаза с уровнем ploidy 4n; Е – полиплоидная метафаза; Ж – анеуплоидная метафаза, отсутствует одна аутосома; З – анеуплоидная метафаза, содержащая четыре Х-хромосомы и всего пять аутосом; И – полиплоидная анафаза; К – анафаза с плохо сформированными полюсами; Л – монополярная анафаза; М – ранняя анафаза. Масштаб – 10 мкм.

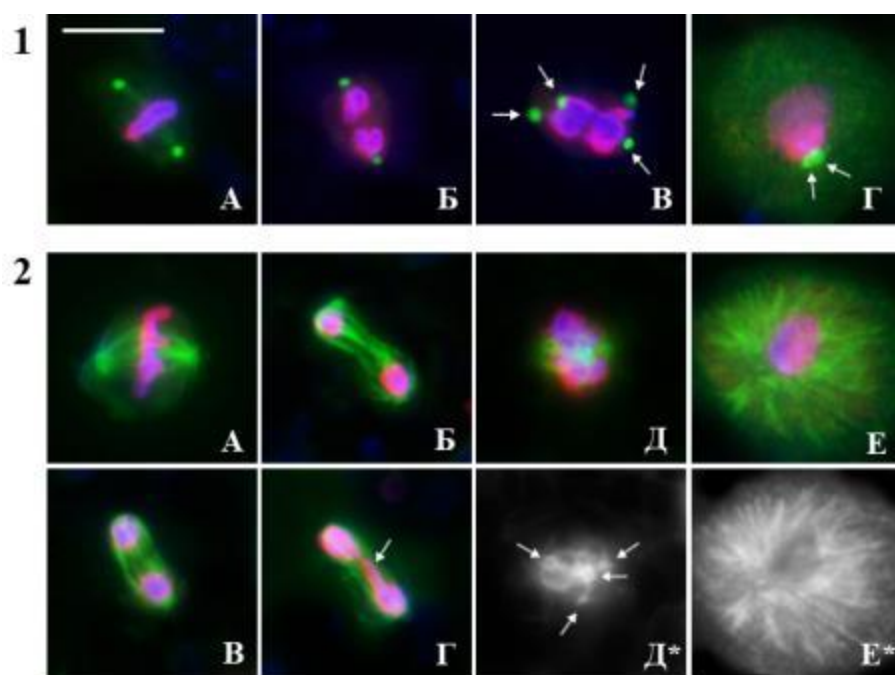


Рис. 6. Аномалии сегрегации хромосом в клетках нервных ганглиев личинок *pnut^{XP}/pnut^{XP}*. (1) Окраска на γ -тубулин (зеленый), фосфорилированный H3 гистон (красный), ДНК (синий). А, Б – нормальные метафаза и анафаза, В – анафаза с четырьмя centrosомами (указаны стрелкой), Г – монополярная анафаза, centrosомы не разошлись (стрелки) и сформировался один полюс; (2) Окраска на α -тубулин (зеленый), рH3 гистон (красный), ДНК (синий). А, Б, В – нормальные метафаза, телофаза, анафаза, Г – анафаза с хромосомным мостом, Д – мультиполярное веретено, Е – монополярное веретено, Д*, Е* - показана только окраска на α -тубулин.

3.3. Изучение функций септина *Pnut* в гонадогенезе при помощи РНК-интерференции

3.3.1. Получение плазмидной конструкции для проведения РНК-интерференции гена *pnut*

Как показано в предыдущем разделе, в соматических тканях делеция *pnut* приводит к аномалиям митоза. Одной из задач работы было выяснение роли *pnut* в гонадогенезе

дрозофилы. Для разделения функций гена в соматической и генеративной компонентах яичников и семенников дрософилы мы запланировали проведение РНК-интерференции в изучаемых тканях. РНК-интерференция представляет собой один из механизмов специфического подавления экспрессии гена. Когда двуцепочечная РНК попадает в клетку, особая РНКаза Dicer распознает её и разрезает на короткие, 21-23 п.н., фрагменты (миРНК - малые интерферирующие РНК). Вокруг миРНК собирается комплекс, который, используя миРНК как проводник, затем связывается с гомологичной последовательностью РНК клетки и расщепляет её.

Вектор *pWIZ* для создания РНК-интерференционных линий дрософилы был описан ранее (Lee, Carthew, 2003). Однако, он был сконструирован на основе вектора *pUAST*, который обеспечивает экспрессию только в соматических клетках. Для того чтобы иметь возможность изучать эффекты РНК-интерференции как в соматических, так и в генеративных клетках, мы сконструировали вектор *pUASP-W*. Для этого интрон гена *white*, являющийся функциональной частью вектора *pWIZ*, был перенесен в вектор *pUASP*. Преимущества вектора *pUASP* состоят в том, что он работает во всех типах клеток, и кроме того, обеспечивает более высокий уровень экспрессии за счет наличия большего числа UAS-элементов. Таким образом, мы получили вектор *pUASP-W*, который дает возможность изучать эффекты РНК-интерференции различных генов дрософилы как в генеративных, так и в соматических клетках, и с большей эффективностью, чем *pWIZ*.

Для получения плазмидной конструкции для проведения РНК-интерференции гена *pnut*, по краям от интрона было встроено два одинаковых фрагмента гена в противоположных направлениях. Схема получения конструкции *pUASP-W-pnut_RNAi* показана на **Рис. 7**. Для сконструированной плазмиды *pUASP-W-pnut_RNAi* были получены соответствующие трансгенные линии дрософилы. Для запуска РНК-интерференции гена *pnut* линию, несущую инсерцию *pUASP-W-pnut_RNAi* (далее для краткости – *pnut-RNAi*), скрещивали с различными ткане- или стадия-специфическими энхансерами (*GAL4*-драйверами).

Для анализа экспрессии гена *pnut* в норме и при подавлении экспрессии данного гена при помощи созданной нами РНК-интерференционной плазмиды был использован метод вестерн-блоттинга с использованием антител на белок Pnut, а также антител на β -тубулин для контроля загрузки. На **Рис. 8** на примере семенников видно, что при использовании повсеместного драйвера *tub-Gal4* РНК-интерференция *pnut* приводила к снижению количества продукта гена, тогда как количество контрольного белка (β -тубулин) оставалось

неизменным. Таким образом, созданная нами плазмидная конструкция является функциональной.

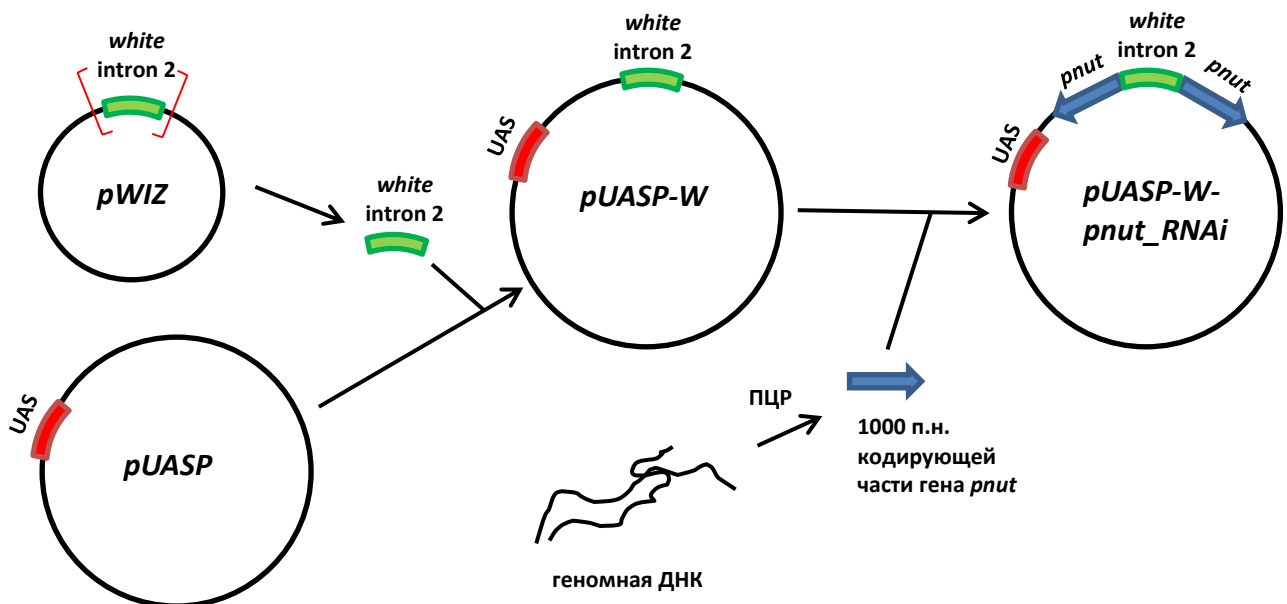


Рис. 7. Схема получение плазмиды для проведения РНК-интерференции гена *pnut*.

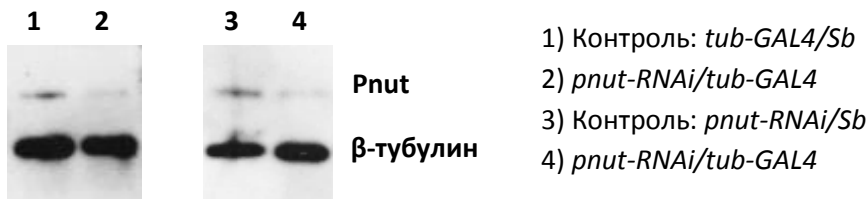


Рис. 8. Проверка уровня экспрессии *pnut* при проведении РНК-интерференции. Показаны результаты Вестерн-блота экстракта семенников. Использовались антитела на Pnut, а также на β -тубулин для контроля загрузки.

3.3.2. Влияние продукта гена *pnut* на деление генеративных клеток

Был проведен цитологический и морфологический анализ сперматогенеза у самцов с РНК-интерференцией гена *pnut* в генеративных клетках, запущенной при помощи драйвера *nanos-GAL4*, специфического к генеративным клеткам. Нарушения цитокинеза и другие аномалии деления сперматоцитов у таких самцов встречались крайне редко (примерно на уровне дикого типа).

Анализ делений в семенниках нуль-аллельных личинок третьего возраста *pnut^{XP}* также показал отсутствие цитокINETических дефектов. В некоторых случаях наблюдались нарушения расхождения хромосом в анафазе - хромосомные мосты и запаздывающие хромосомы (**Рис. 9**). Однако телофазные клетки выглядели нормально, и полиплоидии или анеуплоидии в последующих метафазах и анафазах обнаружено не было, что свидетельствует об исправлении наблюдаемых аномалий в течение анафазы.

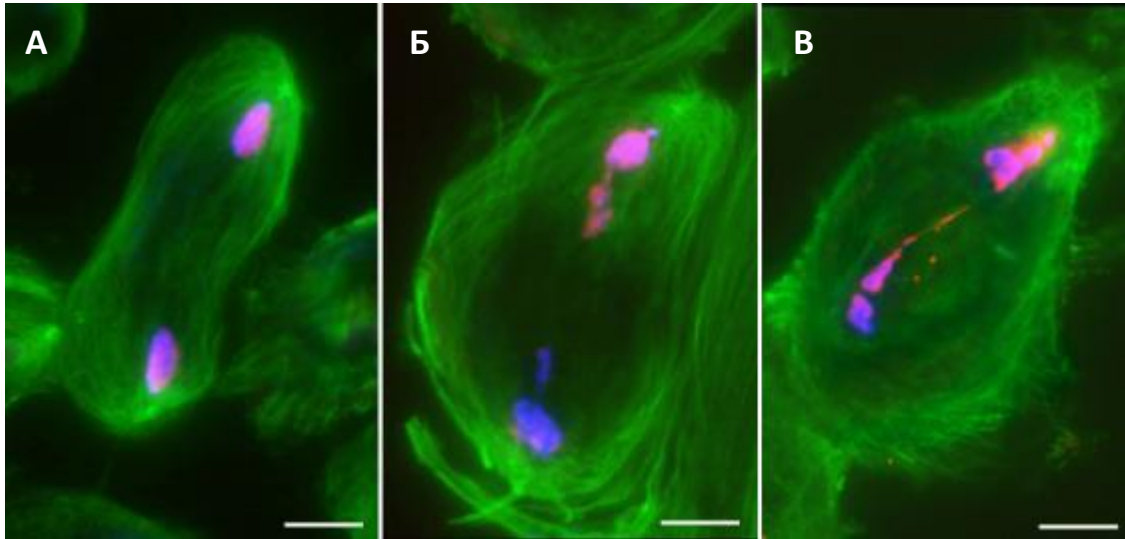


Рис. 9. Стадия анафазы в делениях генеративных клеток семенников у личинок дикого типа и мутантных по гену *pnut*. (А) Нормальная анафаза дикого типа; (Б) Анафаза с запаздывающими хромосомами в анафазе у гомозигот по *pnut^{XP}*; (В) Анафаза с хромосомным мостом у гомозигот по *pnut^{XP}*. Окраска на α -тубулин (зеленый), фосфорилированный H3 гистон (красный), ДНК (синий). Масштаб 10 мкм.

Чтобы оценить предмейотические деления генеративных клеток яичников (цистобластов), мы проводили анализ количества питающих клеток в яйцевых камерах дрозофилы у мух с РНК-интерференцией *pnut* в генеративных клетках. В норме, каждый цистобласт, являющийся клеткой зародышевого пути, делится 4 раза, давая начало цисте из 16 клеток, одна из которых затем становится ооцитом, а остальные 15 – питающими клетками. Если деления цистобластов нарушены, то в результате появляются фолликулы с числом трофоцитов, отличающимся от нормы. При эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut* с использованием драйвера *nanos-GAL4*, специфического к генеративным клеткам, мухи доживали до стадии имаго, самки были фертильны. Большинство яйцевых камер содержали 15 питающих клеток и один ооцит, как в норме (проанализировано по 180 яйцевых камер). У таких самок не наблюдалось никаких аномалий оогенеза, что указывает на

незначительность роли данного гена в функционировании женских генеративных клеток у дрозофилы.

Таким образом, мы показали, что продукт гена *pnut* не критичен для деления генеративных клеток как семенников, так и яичников дрозофилы.

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

Был проведен цитологический и морфологический анализ сперматогенеза дрозофилы в норме и при подавлении экспрессии, запускаемой повсеместными драйверами *Act5C-GAL4*, *tubulin-GAL4*, а также специфичными для генеративных клеток драйверами *nanos-GAL4*, *bam-GAL4* и *chif-GAL4*. При подавлении экспрессии 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 (Табл. 6). Подавление экспрессии на стадии предмейотических сперматоцитов, когда происходит основное запасание РНК для спермиогенеза (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.

Таблица 6. Анализ на подвижность спермиев при 24°C.

Генотип	Просмотрено самцов	Подвижная	Неподвижная	Частично подвижная + примечания
<i>nanos-GAL4/pnut-RNAi</i>	46	17	5	24 – один семенной пузырек с подвижной спермой, другой – с неподвижной
<i>bam-GAL4/pnut-RNAi</i>	13	10	1	2 – один семенной пузырек с подвижной спермой, другой – с неподвижной
<i>Act5c-GAL4/pnut-RNAi</i>	30	12	-	8 – один семенной пузырек с подвижной спермой, другой – с неподвижной 10 – частично подвижные спермии
<i>tub-GAL4/pnut-RNAi</i>	22	8	2	12 – один семенной пузырек с подвижной спермой, другой – с неподвижной
<i>chif-GAL4/pnut-RNAi</i>	10	8	1	1 – один семенной пузырек с подвижной спермой, другой – с неподвижной

Как было показано выше, цитологические аномалии сперматогенеза при проведении РНК-интерференции *pnut* встречались с низкой частотой и не могли быть причиной стерильности. Чтобы выяснить причины неподвижности спермиев, был проведен электронно-микроскопический анализ семенников, выделенных из стерильных самцов. Для подвижности спермы существенны всего 3 компонента: аксонема, митохондрии и базальное тело. Мы показали, что структура аксонемы, а также структура митохондрий у мутантов не отличались от нормы. Однако структура базального тела отличалась у мутантов и дикого типа. Базальное тело представляет 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*), одним из компонентов которой является γ -тубулин. Центриолярный придаток напоминает перицентриолярный материал centrosом, однако функции этой структуры до сих пор не выяснены. На **Рис. 10** видно, что центриолярный придаток у мутантов имеет больше лопастей (похож на фейерверк), причем его реструктуризация к более поздним стадиям (в норме он постепенно принимает округлую форму и вакуолизируется) запаздывает. На стадиях спермиогенеза, когда ядро имеет вытянутую форму, у мутантов центриолярный придаток продолжает быть вытянутым.

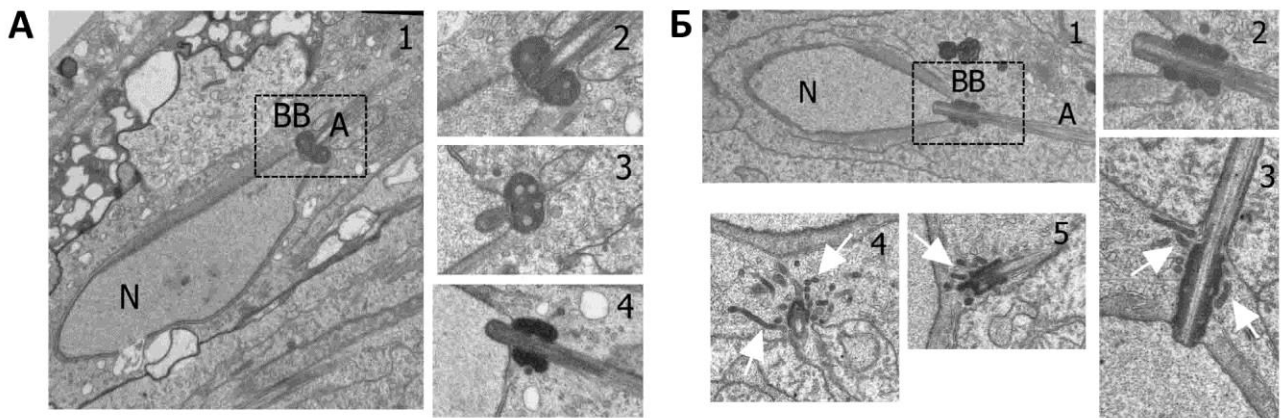


Рис. 10. Электронно-микроскопический анализ базального тела сперматид. (А) ЭМ фотографии срезов сперматид дикого типа. N – ядро сперматиды, BB – базальное тельце (*basal body*), A – аксонема. 1,2 – срез почти продольный ядру, слегка по касательной к аксонеме (2 – увеличение 1), 3 – срез сильно по касательной 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 *nanos-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).

3.3.4. Анализ нарушений оогенеза при эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut* в соматических клетках яичников

Комбинации, несущие одновременно конструкцию *pUASP-W-pnut_RNAi* и повсеместный драйвер *Act5c-GAL4*, работающий как генеративных, так и в соматических клетках, доживали до стадии имаго. Анализ оогенеза выявил следующие аномалии (**Рис. 11**): 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. Практически все комбинации подтвердили фенотип, наблюдаемый при запуске повсеместного драйвера (**Табл. 7**). Таким образом, продукт гена *pnut* необходим для соматических фолликулярных клеток яичника.

Таблица 7. Анализ аномалий оогенеза при эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut* в оогенезе дрозофилы. Номер драйвера соответствует номеру линии в стоковом центре Блумингтон, США.

Драйвер	Область экспрессии	Pnut-RNAi
3731	Интерфолликулярные клетки (ИФ)	Отсутствие ИФ в некоторых яйцевых камерах
6989	Клетки терминального филамента (ТФ) гермариума	Отсутствие ТФ в некоторых яйцевых камерах
7023	Клетки ТФ, фолликулярные клетки (ФК) 2-3 районов гермария, ФК яйцевых камер на 1 стадии развития, ИФ	Отсутствие ИФ в некоторых яйцевых камерах, нарушение полярности яйцевых камер
7024	ИФ, ФК яйцевых камер на 1-3 стадиях развития, клетки бластодермы в эмбриогенезе	Отсутствие ИФ в некоторых яйцевых камерах, нарушение полярности яйцевых камер
4937 (<i>nanos-GAL4</i>)	Генеративные клетки	Оогенез нормальный
4414 (<i>Actin5c-GAL4</i>)	Повсеместная экспрессия	Отсутствие ИФ в некоторых яйцевых камерах, нарушение полярности яйцевых камер, нарушение цитокинеза в клетках хориона

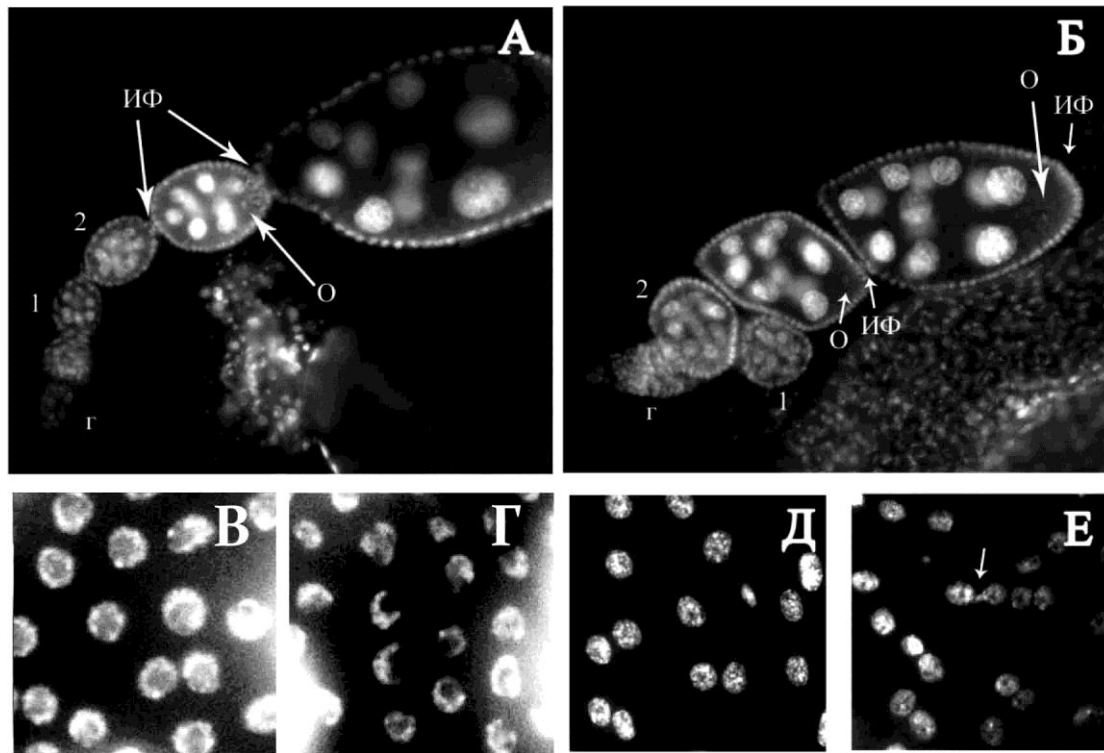


Рис. 11. Аномалии оогенеза при эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut* в яичниках дрозофилы. (А) Овариола дикого типа. Каждая яйцевая камера отделена от соседних интерфолликулярными клетками (ИФ, стрелка). Ооцит (О, стрелка) располагается на переднем конце яйцевой камеры. Яйцевые камеры располагаются «в ряд». (Б) Нарушение поляризации яйцевых камер при РНК-интерференции гена *pnut*. ИФ либо отсутствуют, либо смещены относительно передне-задней оси яйцевой камеры (стрелка). (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*. Г- гермарий, 1,2 – яйцевые камеры на первой, второй стадиях развития соответственно. Окраска DAPI.

РНК гена *pnut*, экспрессирующаяся в генеративных клетках яичников, может не транслироваться в оогенезе, а запасаться в ооплазме яйца для будущего развития эмбриона. Для оценки влияния генеративной и соматической составляющих яичника на развитие эмбриона мы изучили развитие яиц, откладываемых самками с РНК-интерференцией гена *pnut* в генеративных и фолликулярных клетках.

Стадии эмбриогенеза определялись в проходящем свете по Фое (Фое, 1989). Данные по развитию яиц, отложенных самками с РНК-интерференцией гена *pnut*, представлены на **Рис. 12** и в **Таблице 8**. Наблюдаемая разница в проценте гибели в разных направлениях скрещиваний связана с особенностью эмбриогенеза дрозофилы, в котором ключевую роль

играет материнская мРНК, запасенная в ходе оогенеза. Несмотря на то, что комбинации *nanos-GAL4* с *pnut-RNAi* и *Act5c-GAL4* с *pnut-RNAi* доживают до стадии имаго, мы выявили 2 пика гибели эмбрионов, отложенных такими самками: первый, наиболее существенный, происходит на самых ранних стадиях, задолго до целлюляризации, а второй, более слабый, выявляется на 9-10 стадии (Рис. 12).

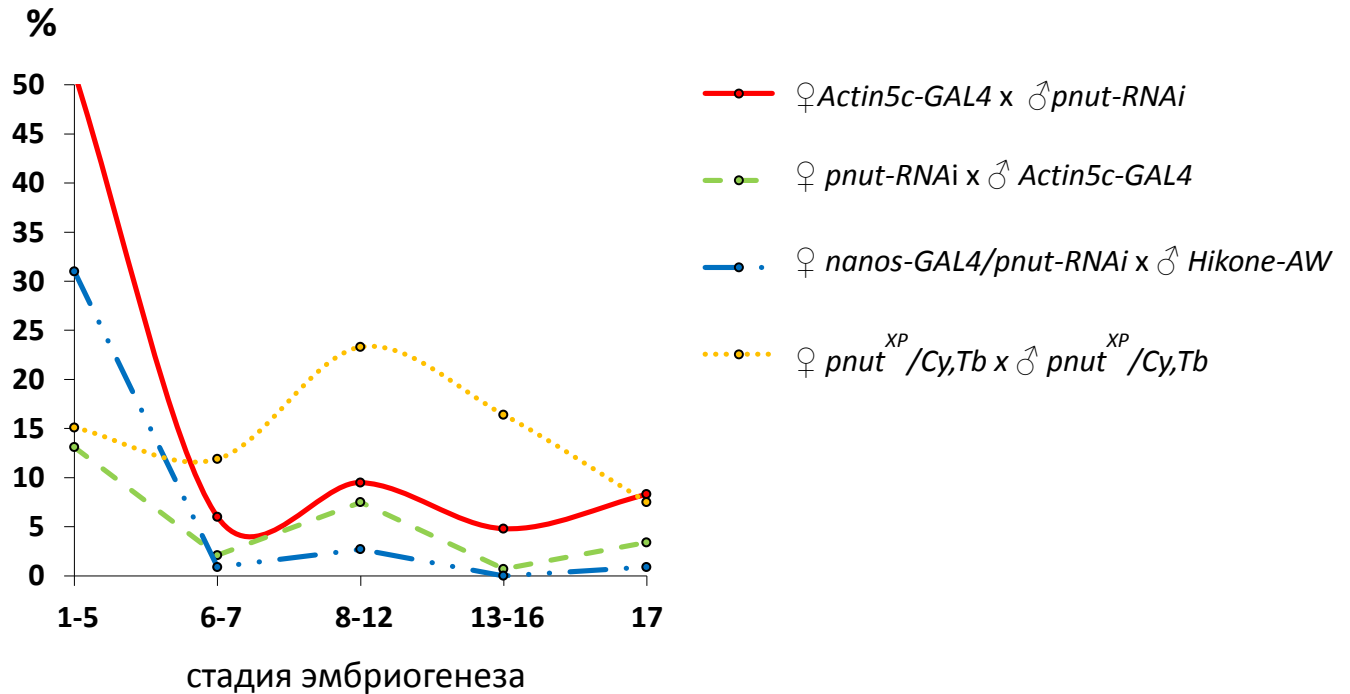


Рисунок 12. Определение стадии эмбриональной гибели особей при эктопическом подавлении экспрессии разными драйверами. Линию, несущую транспозон с *pnut-RNAi* скрещивали с линиями, содержащими драйвер *Actin5c-GAL4* (повсеместный драйвер) в обоих направлениях. В качестве положительного контроля анализировались эмбрионы, полученные от гетерозигот по нуль-аллелю *pnut^{XP}*. Для определения вклада материнского эффекта были проанализированы эмбрионы, полученные от самок, содержащих одновременно *pnut-RNAi* и драйвер *nanos-GAL4*. Горизонтальная ось – стадии эмбриогенеза, вертикальная ось – процент эмбрионов, погибших на данной стадии по отношению к общему числу отложенных эмбрионов.

Таблица 8. Определение стадии эмбриональной гибели особей при эктопическом подавлении экспрессии разными драйверами.

	% гибели эмбрионов на стадиях эмбриогенеза					% вылупившихся эмбрионов	Число проанализированных эмбрионов
	1-5	6-7	8-12	13-16	17		
♀ <i>Actin5c-GAL4</i> x ♂ <i>pnut-RNAi</i>	51,2	6,0	9,5	4,8	8,3	20,2	84
♀ <i>pnut-RNAi</i> x ♂ <i>Actin5c-GAL4</i>	13,1	2,1	7,5	0,7	3,4	73,2	145
Контроль: ♀ <i>HikoneAW</i> x ♂ <i>Actin5c-GAL4</i>	4,2	3,2	2,1	2,1	8,4	80,0	95
♀ <i>nanos-GAL4/pnut-RNAi</i> x ♂ <i>Hikone AW</i>	31,0	0,9	2,7	0	0,9	65,5	113
Контроль: ♀ <i>nanos-GAL4</i> x ♂ <i>Hikone AW</i>	0	0	0	0	0	100	28
Контроль: ♀ <i>HikoneAW</i> x ♂ <i>nanos-GAL4</i>	0	0	2,2	0	0	97,8	90
Контроль: ♀ <i>pnut^{XP}/Cy,Tb</i> x ♂ <i>pnut^{XP}/Cy,Tb</i>	15,1	11,9	23,3	16,4	7,5	25,8	159

3.4. Изучение роли функциональных доменов Pnut

3.4.1. Мутации гена *pnut*, использованные в работе

РНК-интерференция подавляет экспрессию гена, но ничего не может сказать о функциональных доменах продукта данного гена. Чтобы проанализировать структуру белка, были использованы мутанты по консервативным доменам белка Pnut. В работе были использованы одиночные мутации в консервативных мотивах ГТФазного домена белка Pnut - (G1), (G3), (G4), а также тройная мутация (G1,G3,G4), при этом консервативные аминокислоты были заменены на аланины (**Рис. 13**). Кроме того, в работе использовались делеционные формы белка Pnut с нарушенным С-концевым доменом - Pnut (1-427) и Pnut (1-460). Помимо Pnut, в работе использовались также септины Sep1 и Sep2 дикого типа, имеющие сходную с Pnut доменную структуру.

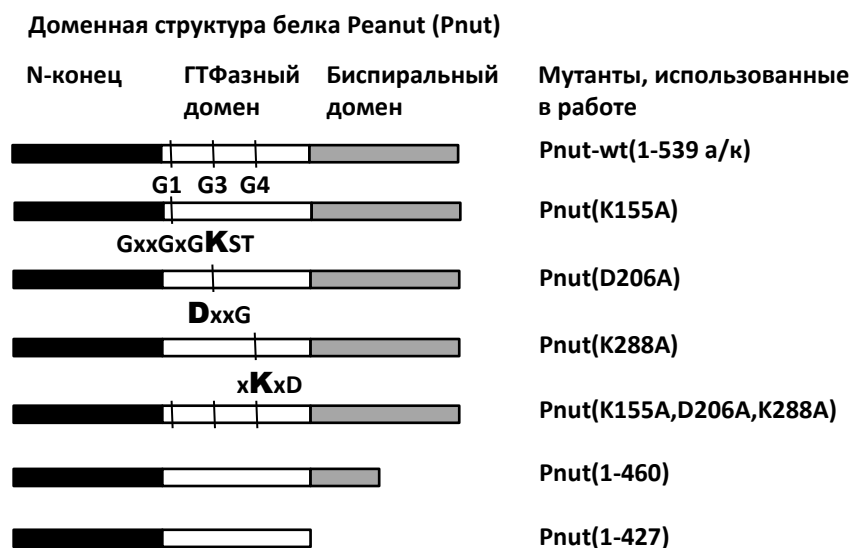


Рис. 13. Мутантные формы Pnut, использованные в работе. Схематическое изображение доменной структуры белка Pnut показано слева. Мутации в консервативных доменах показаны справа. Консервативные аминокислоты в G1, G3 и G4 мотивах ГТФазного домена (обозначены жирным шрифтом) были заменены на аланины.

3.4.2. ГТФазная активность индивидуальных септинов дрозофилы

Перед тем как исследовать влияние мутаций *in vivo*, мы провели предварительные эксперименты *in vitro*. Для изучения ГТФазной активности септинов, рекомбинантные белки Pnut (мутантные и дикого типа, см. **Рис. 13**), Sep1 дикого типа и Sep2 дикого типа были изолированы и очищены с использованием экспрессирующей системы *E.coli*. На **Рис. 14** представлен ПААГ гель с нанесенными фракциями белков после очистки, которые использовались для дальнейших экспериментов.

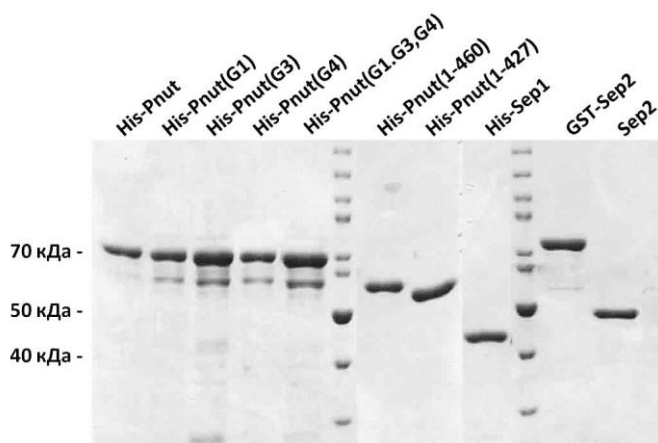


Рис. 14. Очистка индивидуальных белков Pnut. На ПААГ геле, окрашенном кумасси, отображены очищенные из *E.coli* рекомбинантные белки Pnut, Sep1 и Sep2. Pnut и Sep1 содержат гистидиновый тэг (His-тэг) на N-конце. G1, G3, G4 – указывают на мутации в консервативных мотивах ГТФазного домена. His-Pnut(1-460) и His-Pnut(1-427) содержат делецию C-концевого домена.

Очищенные индивидуальные белки были проанализированы на включение и гидролиз ГТФ, полученные данные представлены в **Табл. 9**. Белок Pnut дикого типа гидролизировал ГТФ: доля ГДФ от суммарного количества нуклеотидов, содержащихся в белках после проведения ГТФазной реакции в течение 4 часов, составляла 0.86 ± 0.12 . Кроме того, Pnut дикого типа был способен обменивать нуклеотид, находящийся внутри ГТФазного домена – за 4 часа реакции включение радиоактивного ГТФ составило 0.02787 ± 0.00061 моль ГТФ/моль белка. У всех мутантов по ГТФазному домену ГТФазная активность была значительно снижена, что и ожидалось, поскольку для мутирования были выбраны консервативные аминокислоты, входящие в состав функциональных мотивов, участвующих в связывании ГТФ. Интересно, что делеция С-концевого биспирального домена Pnut (мутанты Pnut(1-460) и Pnut(1-427)) приводила к увеличению включения ГТФ и гидролиза ГТФ. Похожий эффект был показан на дрожжах *S. cerevisiae*, где укороченная форма септина Cdc12 с делецией С-концевого домена обнаруживал в 4-5 раз повышенную скорость ГТФ гидролиза по сравнению с полноразмерной копией Cdc12 (Versele, Thorner, 2004).

Данные по ГТФазной активности белков Sep1 и Sep2 дикого типа также представлены в **Табл. 9**. His-Sep1 имел более высокую ГТФазную активность, чем Pnut: включение радиоактивного ГТФ составило 0.06935 ± 0.01087 моль ГТФ/моль белка, за 4 часа реакции был гидролизован весь ГТФ (доля связанного ГДФ составила 0.99 ± 0.01). Sep2, наоборот, не проявлял заметной ГТФазной активности.

Табл. 9. ГТФазная активность рекомбинантных индивидуально очищенных септинов.

Септин	Включение ГТФ (моль ГТФ/моль белка)	ГДФ (доля от суммарного количества нуклеотида)
His-PnutWT	0.02787 ± 0.00061	0.86 ± 0.12
His-Pnut(G1)	0.00013 ± 0.00023	0.39 ± 0.04
His-Pnut(G3)	0.00024 ± 0.00029	0.64 ± 0.22 * p=0.38
His-Pnut(G4)	0.00014 ± 0.00024	0.31 ± 0.06
His-Pnut(G1,G3,G4)	0.00017 ± 0.00022	0.51 ± 0.03
His-Pnut(1-460)	0.05284	0.97 ± 0.01
His-Pnut(1-427)	0.03532	0.97 ± 0.01
His-Sep1	0.06935 ± 0.01087	0.99 ± 0.01
Sep2	0.00036	0.05

В таблице представлены результаты включения радиоактивно-меченного ГТФ, что отражает обмен нуклеотида, а также доля ГДФ от суммарного количества нуклеотида, что отражает эффективность гидролиза. Приведены средние значения \pm среднеквадратическое отклонение, с вычетом контроля (реакции, проведенной без добавления белка). ГТФазный анализ был проведен в трех повторениях, за исключением His-Pnut(1-460), His-Pnut(1-427) и Sep2, для которых приведено среднее двух экспериментов. Р-значения были определены при помощи критерия Стьюдента (относительно дикого типа), $p < 0.05$ для всех мутантов, кроме * доля ГТФ для His-Pnut(G3), где $p = 0.38$.

3.4.3. Анализ септиновых комплексов с использованием мутантов Pnut по ГТФазному домену

Важной характеристикой септинов является их способность формировать гетеромерные комплексы друг с другом. На основании структурных исследований человеческих септинов (Sirajuddin *et al.*, 2007), а также гомологии последовательностей септинов человека и дрозофилы (Pan *et al.*, 2007), септиновый комплекс дрозофилы можно описать как линейный гексамер с белками Pnut по обеим сторонам комплекса вида Pnut-Sep2-Sep1-Sep1-Sep2-Pnut. Для краткости далее в работе гексамерный комплекс будет обозначаться как Pnut-Sep2-Sep1.

Ранее было показано, что делеции С-концевых мотивов Pnut (Pnut (1-427 а/к) и Pnut (1-460 а/к) препятствуют сборке септинового комплекса *in vitro* (Huijbregts *et al.*, 2009). Чтобы определить роль мотивов ГТФазного домена для формирования комплекса, септиновые белки Pnut мутантные или дикого типа были экспрессированы одновременно с Sep1 и Sep2 дикого типа с использованием бакуловирусной системы экспрессии с целью получения септинового комплекса. Конструкции для экспрессии Pnut содержали последовательность гистидинового тэга (His-) на N-конце. Лизат клеток, зараженных бакуловирисами, содержащими Sep1, Sep2 и His-Pnut конструкторы, инкубировали с никель-агарозой и затем проводили элюцию с использованием имидазола. Как показано на ПААГ на **Рис. 15**, белки Pnut, содержащие одиночные мутации в ГТФазном домене (в G1, G3 или G4 мотивах) были способны входить в состав комплекса. Белок Pnut, содержащий мутации во всех трех мотивах одновременно, также входил в состав комплекса.

Мутация в G4 мотиве Pnut приводила к наиболее ярко выраженному эффекту на ГТФазную активность индивидуального белка (**Табл. 9**). Однако, эта мутация не нарушала формирование септинового комплекса (**Рис. 15, дорожка 4**). Очищенный комплекс His-Pnut (G4)-Sep2-Sep1 далее был проанализирован в реакциях ГТФ связывания и ГТФ гидролиза. Как показано на **Рис. 16**, мутация в G4 мотиве Pnut приводила к 2-3 кратному снижению как

в ГТФ связывании, так и в ГТФ гидролизе комплекса, содержащего данный мутантный белок.

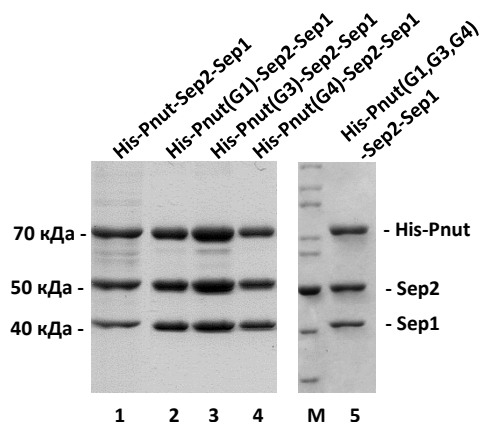


Рис. 15. Очистка рекомбинантных септиновых комплексов.

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. G1, G3, G4 – указывают на мутации в консервативных мотивах ГТФазного домена Pnut.

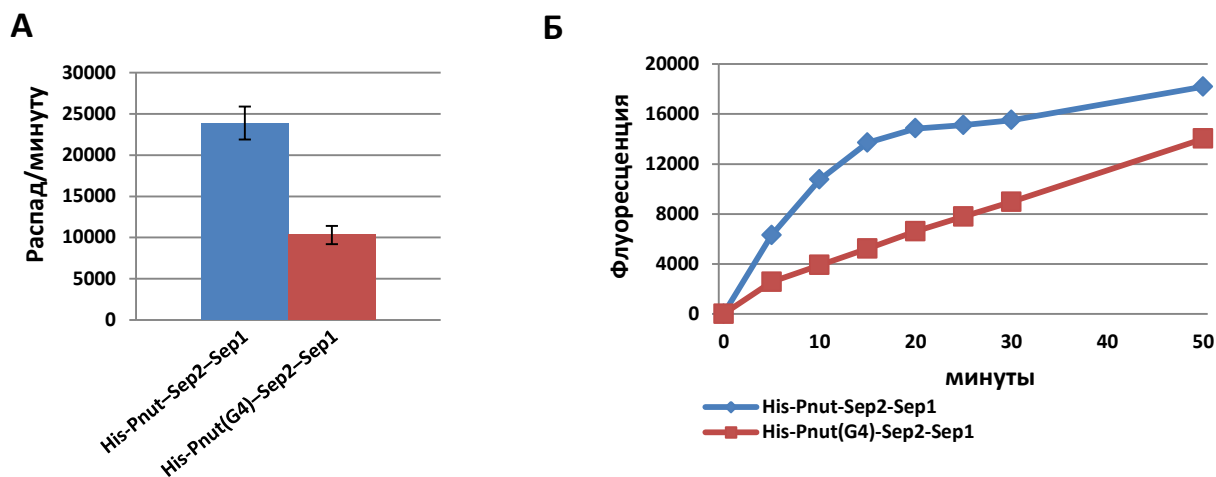


Рис. 16. ГТФазная активность рекомбинантных очищенных септиновых комплексов. (А) ГТФ-связывание. Представлены средние значения распад/минуту с вычетом контроля (реакция, проведенная без добавления комплекса) \pm среднеквадратическое отклонение. Сравнение средних проводилось при помощи *t*-критерия Стьюдента, $p < 0.05$, $n = 5$. **(Б) ГТФ гидролиз.** В графике приведены значения флуоресцентного излучения фосфатного сенсора в указанных временных точках. Значения приведены с вычетом нулевой временной точки.

3.4.4. Влияние мутаций в консервативных доменах *pnut* на соматические ткани дрозофилы *in vivo*

Чтобы исследовать влияние мутаций в ГТФазном домене, а также делеций С-конца Pnut *in vivo*, были использованы трансгенные линии мух, содержащие соответствующие мутантные формы Pnut. Схема плазмидной конструкции представлена на **Рис. 17**. Для

мутанта *Pnut*(1-460 а/к) получение конструкции проводилось автором самостоятельно, остальные линии мух были любезно предоставлены д-ром Чесноковым (Бирмингем, США).



Рис. 17. Схема конструктора для трансформации в зародышевые пути дрозофилы.

Полученные конструкции, работающие под нативным промотором *pnut*, были проанализированы на способность восстанавливать жизнеспособность летального нуля-аллеля *pnut*^{XP}. Все линии мух, полученные для отдельно взятой конструкции, одинаково проявляли себя в способности восстанавливать фенотип летальной мутации *pnut*^{XP}. Для более детального исследования было взято по одной линии мух для каждой конструкции. Линии, использованные в этой работе, содержали встроенные трансгены в третьей хромосоме.

Экспрессия трансгена дикого типа - *FLAG-pnutWT* - приводила к восстановлению жизнеспособности *pnut*^{XP} летального нуля-аллеля (Табл. 10). У личинок, экспрессирующий данный трансген, формировались имагинальные диски, нервные ганглии не содержали полиплоидных клеток. Однако, восстановление трансгеном дикого типа было не полным – из 662 проанализированных потомков вылетело только 67 спасенных особей, что составляет 38% от ожидаемого количества. Таким образом, результаты по восстановлению летального фенотипа нуля-аллельной мутации *pnut*^{XP} при помощи экспрессии трансгена *FLAG-pnutWT* дикого типа свидетельствуют о том, что полученные конструкции в составе модифицированного вектора *pCasper3*, несущего нативный промотор гена *pnut* обеспечивают необходимый для выживания уровень экспрессии белка, однако не в 100%, а только в ~40% случаев.

Таблица 10. Эксперимент по восстановлению жизнеспособности нуля-аллеля *pnut*^{XP}.

Трансген	Способность спасать летальный фенотип нуля-аллеля <i>pnut</i> ^{XP}
<i>FLAG-pnutWT</i> (1-539)	+
<i>FLAG-pnut</i> (1-460)	-
<i>FLAG-pnut</i> (1-427)	-
<i>FLAG-pnut</i> (G4)	-
<i>FLAG-pnut</i> (G1,G3,G4)	-

Для начала, мы выявили влияние мутаций Pnut на деления соматических клеток. Введение трансгенов, содержащих делецию С-концевого домена белка – *FLAG-pnut(1-427)* или *FLAG-pnut(1-460)* - не спасало полностью делецию *pnut^{XP}*, летальную на стадии ранней предкуколки, однако, в личинках, экспрессирующих данные трансгены, развивались имагинальные диски, в отличие от *pnut^{XP}* гомозиготных личинок, не содержащих диски как следствие нарушения пролиферации. Кроме того, нервные ганглии делеционных мутантов не содержали полиплоидных клеток (**Рис. 21Б**), в отличие от нуль-аллеля *pnut^{XP}* (**Рис. 21Е, Ж**).

С использованием антител на Pnut была исследована локализация Pnut в мутантных личинках. В норме, а также при спасении нуль-аллеля трансгеном дикого типа *FLAG-pnut^{WT}*, Pnut в имагинальных дисках локализуется кортикально, на **Рис. 18** приведен для примера крыловой имагинальный диск (**Рис. 18А, Б**). В некоторых участках цитоплазматической мембраны наблюдается неравномерный, пунктирный паттерн окраски, (**Рис. 18А', Б'**) очень напоминающий таковой в S2 культуре клеток дрозофилы (Huijbregts *et al.*, 2009).

Обе укороченные формы Pnut с делецией С-концевого домена не обнаруживали характерной кортикальной локализации Pnut, вместо этого, как показано на примере *FLAG-Pnut(1-460)*, белок формировал «агрегаты» в имагинальных дисках (**Рис. 18В, В'**). Следует отметить, что мутантный белок, тем не менее, продолжал локализоваться в области цитоплазматической мембраны, как показано при помощи одновременной окраски на субмембранный маркер α -спектрин на **Рис. 18Г и Г'**. Помимо имагинальных дисков, схожие «агрегаты» были обнаружены во всех остальных проанализированных органах и тканях личинки – на **Рис. 19** как пример представлены слюнные железы и нервные ганглии. Интересно отметить, что в клетках слюнных желез, в отличие от клеток имагинальных дисков, укороченная форма Pnut(1-460) не была локализована в области цитоплазматической мембраны, вместо этого агрегаты находились в цитоплазме, как показывает одновременная окраска на Pnut и α -спектрин (**Рис. 19В'**).

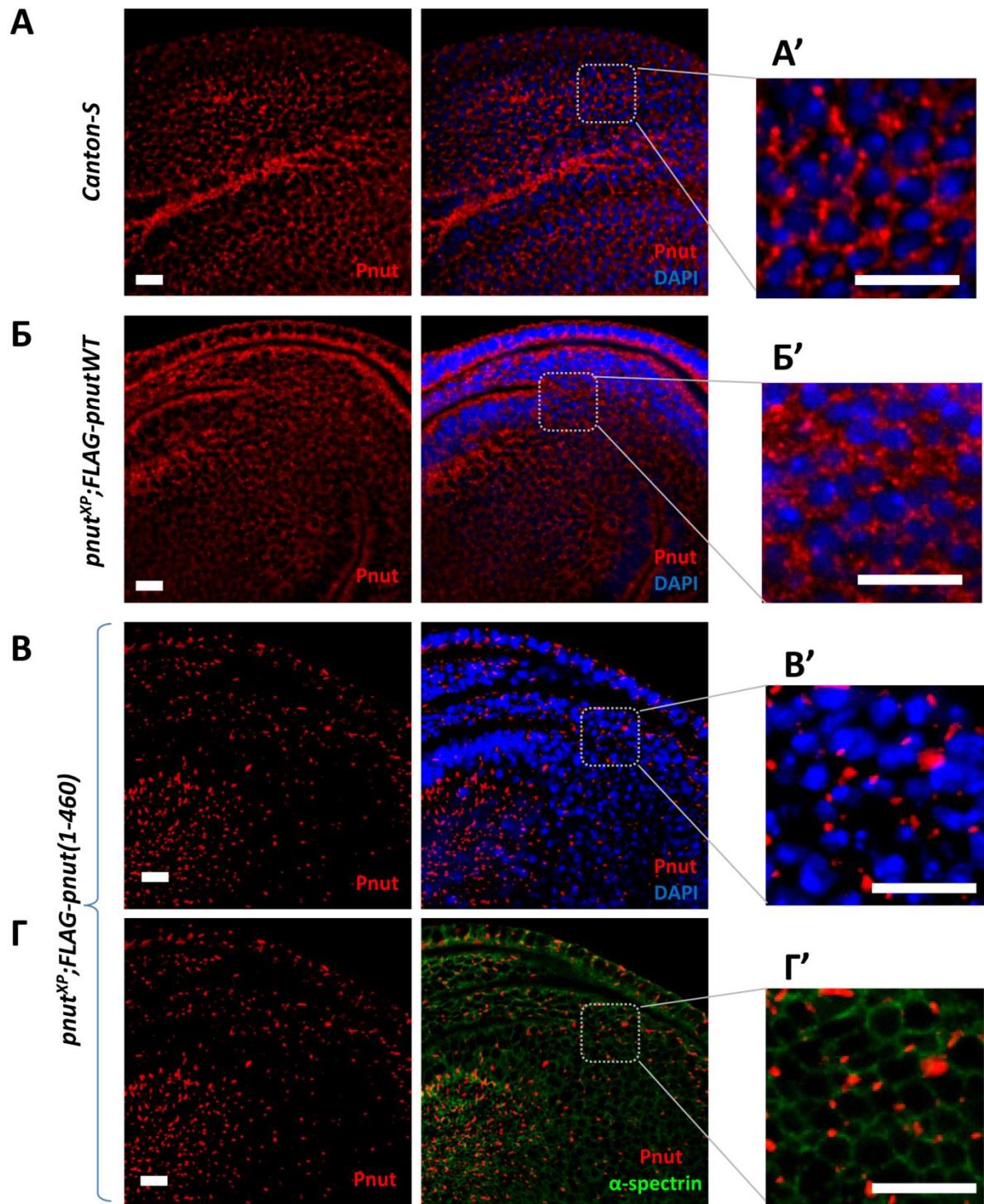


Рис. 18. Делеция С-концевого домена Pnut приводит к формированию агрегатов *in vivo*. На рисунке представлены крыловые имагинальные диски личинок третьего возраста (А) дикого типа *Canton S*; (Б) экспрессирующих трансген дикого типа на фоне нуля-аллеля - $pnut^{XP};FLAG-pnutWT$; (В), (Г) экспрессирующих трансген с делецией С-конца на фоне нуля-аллеля - $pnut^{XP};FLAG-pnut(1-460)$. (А'), (Б'), (В'), (Г') Отдельные участки диска показаны крупным планом. Окраска на Pnut (красный), α -спектрин (зеленый) и DAPI (синий). Масштаб 10 мкм.

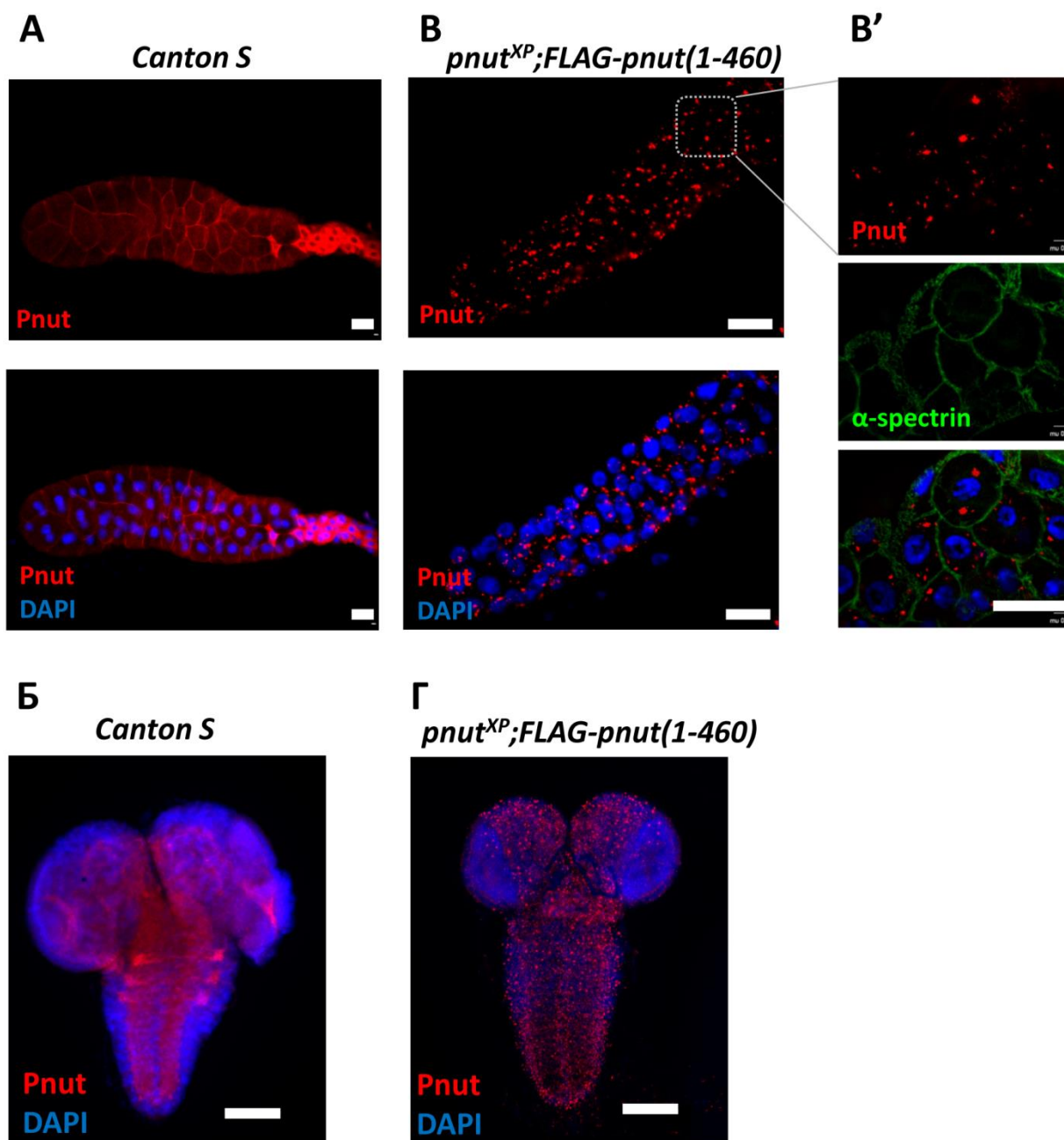


Рис. 19. Делеция С-концевого домена Pnut приводит к формированию агрегатов *in vivo*. На рисунке представлены (А) слюнные железы личинок третьего возраста дикого типа *Canton S*; (Б) нервные ганглии *Canton S*; (В) и (В') слюнные железы личинок *pnut^{XP};FLAG-pnut(1-460)*; (Г) нервные ганглии личинок *pnut^{XP};FLAG-pnut(1-460)*. Окраска на Pnut (красный), α -спектрин (зеленый) и DAPI (синий). Масштаб 50 мкм для слюнных желез и 100 мкм для нервных ганглиев.

В норме, два других септина дрозофилы, Sep1 и Sep2, формирующие комплекс с Pnut, колокализуются с ним в большинстве случаев. У делеционных мутантов Sep1 и Sep2 также колокализовались вместе с транскрированной формой Pnut в «агрегатах», как показано на **Рис. 20** для Pnut(1-427).

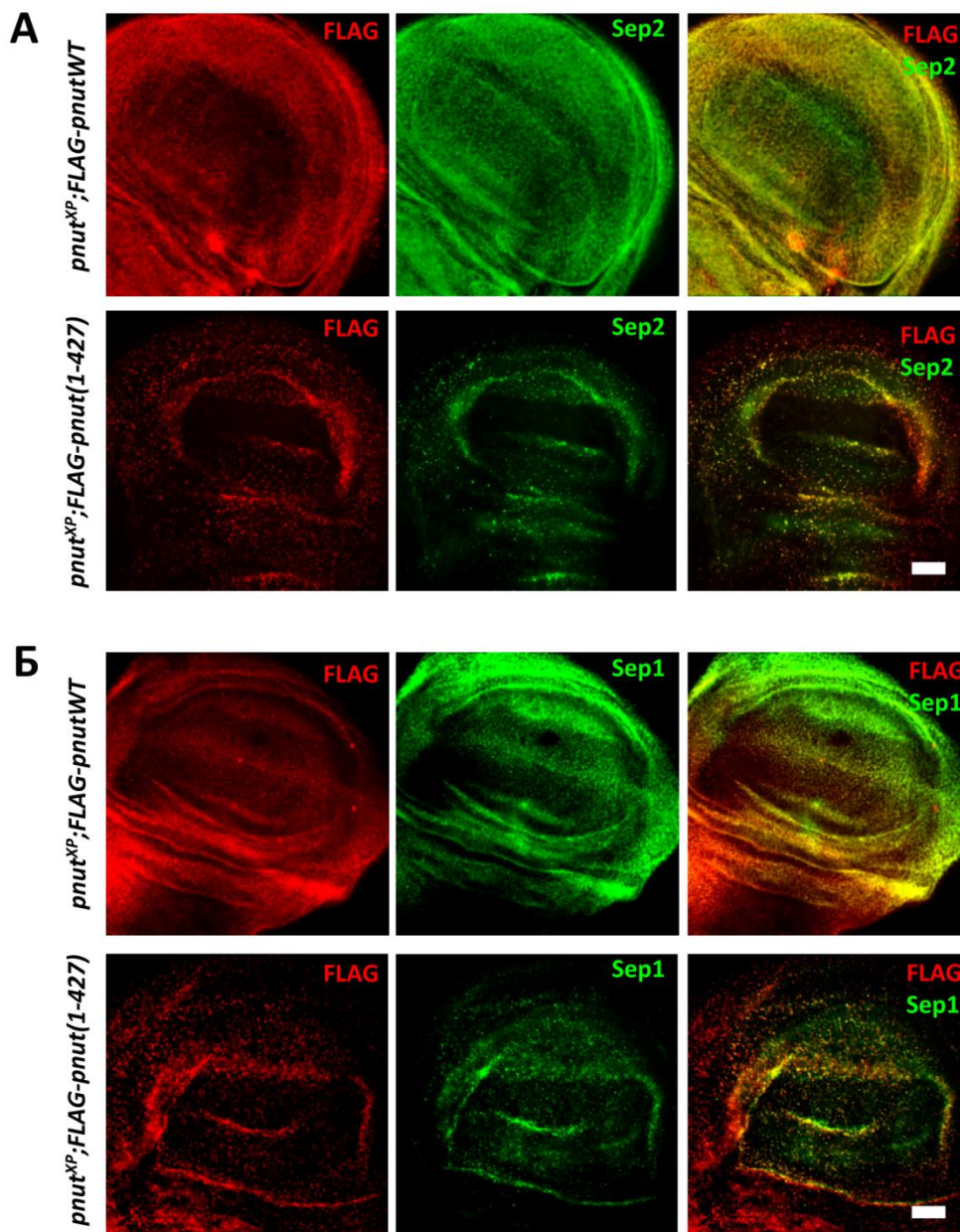


Рис. 20. Sep1 и Sep2 колокализуются с укороченной формой Pnut(1-427) в агрегатах. На рисунке представлены крыловые диски личинок третьего возраста, экспрессирующих трансген дикого типа *FLAG-pnutWT* или С-концевую делецию *FLAG-pnut(1-427)* на фоне нуль-аллеля - *pnut^{XP}*. Окраска проводилась на FLAG (красный), локализирующий FLAG-Pnut, а также на Sep2 (A) или Sep1 (B) (зеленый). Масштаб 10 мкм.

Трансгены *pnut*, содержащие мутации в ГТФазном домене белка, также не спасали нуль-аллель. Интересно, что одиночная мутация в G4 мотиве Pnut не приводила к видимым серьезным нарушениям цитокинеза, поскольку гомозиготы по нуль-аллелю *pnut^{XP}*, экспрессирующие данный трансген, содержали имагинальные диски, и нервные ганглии таких личинок не обнаруживали полиплоидии (**Рис. 21В**). Однако, когда были мутированы все три консервативных мотива ГТФазного домена - G1, G3 и G4 - личинки, несущие данный трансген на фоне нуль-аллеля *pnut^{XP}*, имели фенотип, неотличимый от фенотипа нуль-аллеля: отсутствие дисков, полиплоидные клетки в нервных ганглиях (**Рис. 21Г, Д**).

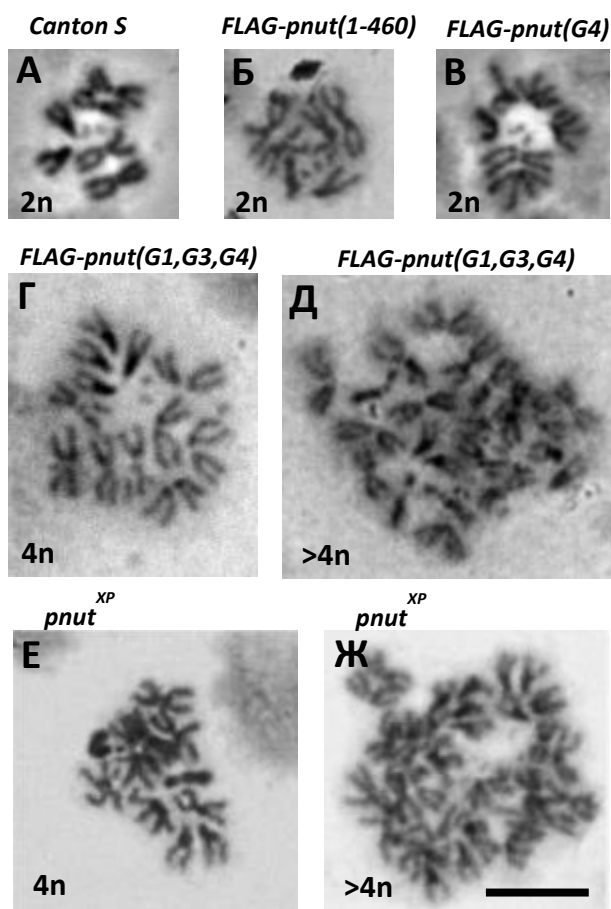


Рис. 21. Митозы в нервных ганглиях личинок дрозофилы. (А) Метафаза в нервных ганглиях дикого типа *Canton S*. (Б) Нормальная метафаза с двумя наборами хромосом в нервных ганглиях личинок *pnut^{XP};FLAG-pnut(1-460)*. (В) Нормальная метафаза с двумя наборами хромосом в нервных ганглиях личинок *pnut^{XP};FLAG-pnut(G4)*. (Г) и (Д) Полиплоидные метафазы личинок *pnut^{XP};FLAG-pnut(G1,G3,G4)*, содержащие 4 (Г) и более (Д) наборов хромосом. (Е) и (Ж) Полиплоидные метафазы гомозигот по нуль-аллелю *pnut^{XP}*. Масштаб 10 мкм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами на Pnut показало отсутствие характерной пунктирной кортикальной локализации Pnut в имагинальных дисках *pnut^{XP}* гомозиготных личинок, содержащих *pnut* трансген с мутацией в G4 мотиве, по сравнению с эндогенным белком в личинках дикого типа *Canton S*, а также у *pnut^{XP}* личинок, спасенных трансгеном *FLAG-pnut^{WT}* дикого типа (**Рис. 22А**). Следует отметить, что, хотя специфическая пунктирная мембранная окраска отсутствовала, мембранная локализация не терялась полностью, и обнаруживалась диффузная окраска в области плазматической

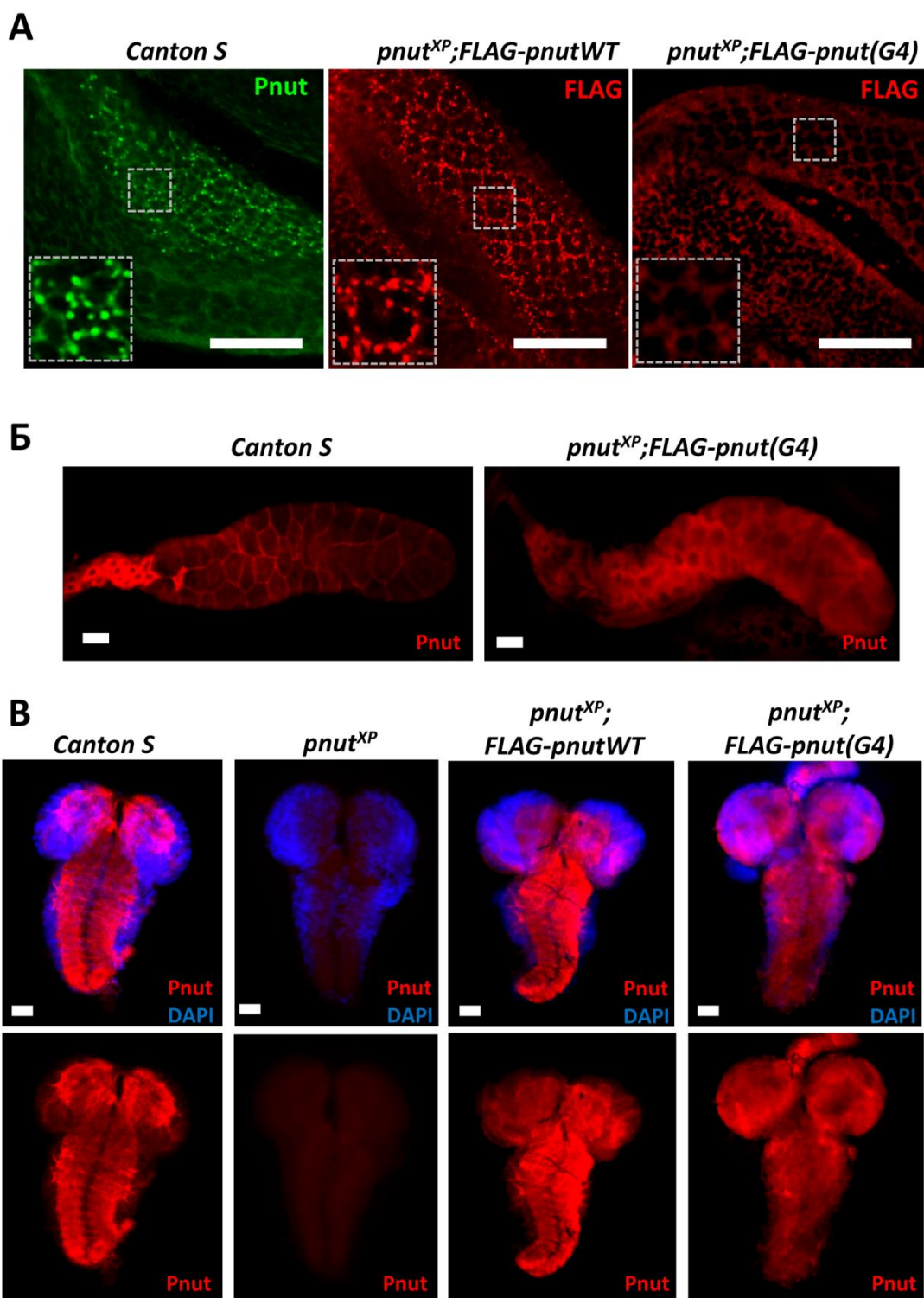


Рис. 22. Мутации в ГТФазном домене Pnut нарушают правильную локализацию белка *in vivo*. (А) Глазные имгинальные диски личинок третьего возраста, окрашенные на Pnut (зеленый) или FLAG (красный). (Б) Слюнные железы, окрашенные на Pnut (красный). (В) Нервные ганглии, окрашенные на Pnut (красный) и DAPI. Масштаб 50 мкм.

мембраны. В слюнных железах мутантных личинок окраска на Pnut также показала диффузную окраску по всей клетке, тогда как в слюнных железах дикого типа, Pnut в основном сосредоточен в области клеточных мембран (**Рис. 22Б**). В нервных ганглиях, в норме, Pnut локализуется в специфических нейронных структурах в оптических долях (в области внешних пролиферативных центров), а также в вентральной доле, как показано на **Рис. 22В** для дикого типа *Canton S*. У нуль-аллельных личинок $pnut^{XP}$ окраска на Pnut не выявляет присутствия белка. При спасении нуль-аллеля трансгенном *FLAG-pnut^{WT}* дикого типа, характерная окраска восстанавливается. При экспрессии *FLAG-pnut(G4)* трансгена на фоне нуль-аллеля $pnut^{XP}$ наличие белка подтверждается окраской на Pnut, однако, отсутствует характерный паттерн как в оптических долях, так и в вентральной доле нервного ганглия, вместо этого Pnut обнаруживает диффузную окраску.

Таким образом, было выявлено влияние отдельных доменов белка Pnut на выживаемость нуль-аллеля *pnut*, а также локализацию мутантной формы белка. Восстановление жизнеспособности обеспечивал только полноразмерный белок дикого типа. Ни одна из усеченных или мутантных форм Pnut не обеспечивали полного восстановления жизнеспособности, при этом все мутантные формы белка обнаруживали нарушения в локализации. Таким образом, можно заключить, что как С-концевой домен, так и ГТФазный домены важны для правильной локализации белка *in vivo* и выживания дрозофилы.

3.4.5. Влияние мутаций различных доменов Pnut на оогенез дрозофилы

Эксперименты по спасению фенотипа летальной мутации $pnut^{XP}$ конструкциями, несущими трансгены с нормальной или мутантными формами Pnut, описанные выше, проводились непосредственно после первой балансировки только что полученных трансгенных встроек. Спасения для мутантных форм Pnut обнаружено не было. Были получены трансгенные линии вида $pnut^{XP}/Cy;FLAG-pnut$. Через несколько поколений, в результате стабилизации генетического фона, в полученных линиях, для которых в первом эксперименте не было обнаружено спасения (а именно, содержащих трансгены *FLAG-pnut(1-427)*, *FLAG-pnut(1-460)*, *FLAG-pnut(G4)* и *FLAG-pnut(G1,G3,G4)*) стало появляться незначительное количество мух, доживающих до стадии поздней куколки и даже имаго, но с сильно ослабленной жизнеспособностью. Это позволило нам изучить влияние данных мутаций на процессы оогенеза и сперматогенеза дрозофилы.

Эффект делеции С-концевого домена Pnut рассмотрен на примере более длинной делеции, захватывающей целиком С-концевой домен - Pnut(1-427). При экспрессии трансгена

FLAG-pnut(1-427) на фоне нуля аллеля *pnut^{XP}*, у небольшого числа особей, доживших до стадии поздней куколки или имаго в яичниках, как и остальных тканях, обнаруживались «агрегаты» Pnut (**Рис. 23А**). В яичниках таких мутантных самок практически все яйцевые камеры были мелкие, хотя и с нормальной морфологией. Такие камеры приводили к появлению мелких зрелых яиц с аномально короткими и кривыми дорзальными выростами. На **Рис. 23Б** представлены в одном масштабе слева зрелые яйцеклетки с нормальной морфологией, а слева – мутантные по *FLAG-pnut(1-427)*, короткие круглые, с аномальными дорзальными выростами (стрелка). Практически все яйцевые камеры имели такую форму, из 21 проанализированной самки только в 4 яичниках мы наблюдали по 1-2 яйцеклетке нормального размера.

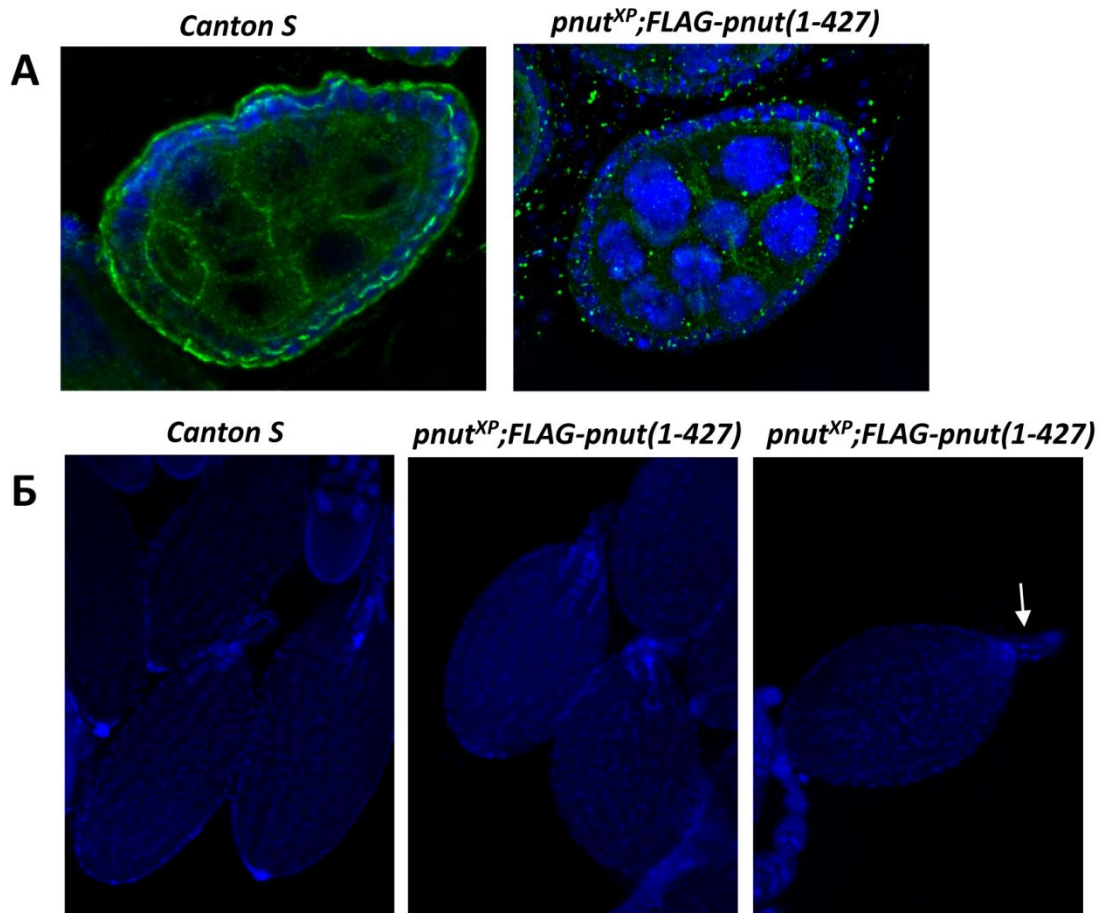


Рис. 23. Нарушения оогенеза у мутантов с делецией С-концевого домена Pnut. (А) FLAG-pnut(1-427) формирует агрегаты в яичниках самок *pnut^{XP};FLAG-pnut(1-427)*. Окраска на Pnut (зеленый) и DAPI. (Б) В оогенезе у мутантных самок формируются короткие круглые яйца с аномальными дорзальными выростами (стрелка). Окраска на DAPI.

В яичниках у нуль-аллельных по *pnut* самок, спасенных экспрессией трансгена *FLAG-pnut(G4)*, а также *FLAG-pnut(G1,G3,G4)*, обнаруживалась диффузная локализация Pnut, в отличие от мембранной локализации у дикого типа (**Рис. 24А, Б**). У мутантов по мотиву G4 на фоне нуль-аллеля *pnut^{XP}* оогенез проходил нормально, и формировались нормальные зрелые яйца, нарушений цитокинеза не было обнаружено. В то же время, у мутантов по всем трем мотивам ГТФазного домена, в каждом яичнике по несколько (2-6) фолликулов содержали вместо положенных 15 ядер питающих клеток по 1-3, чаще всего такие клетки были гораздо крупнее по размеру, чем полагается (**Рис. 24В**).

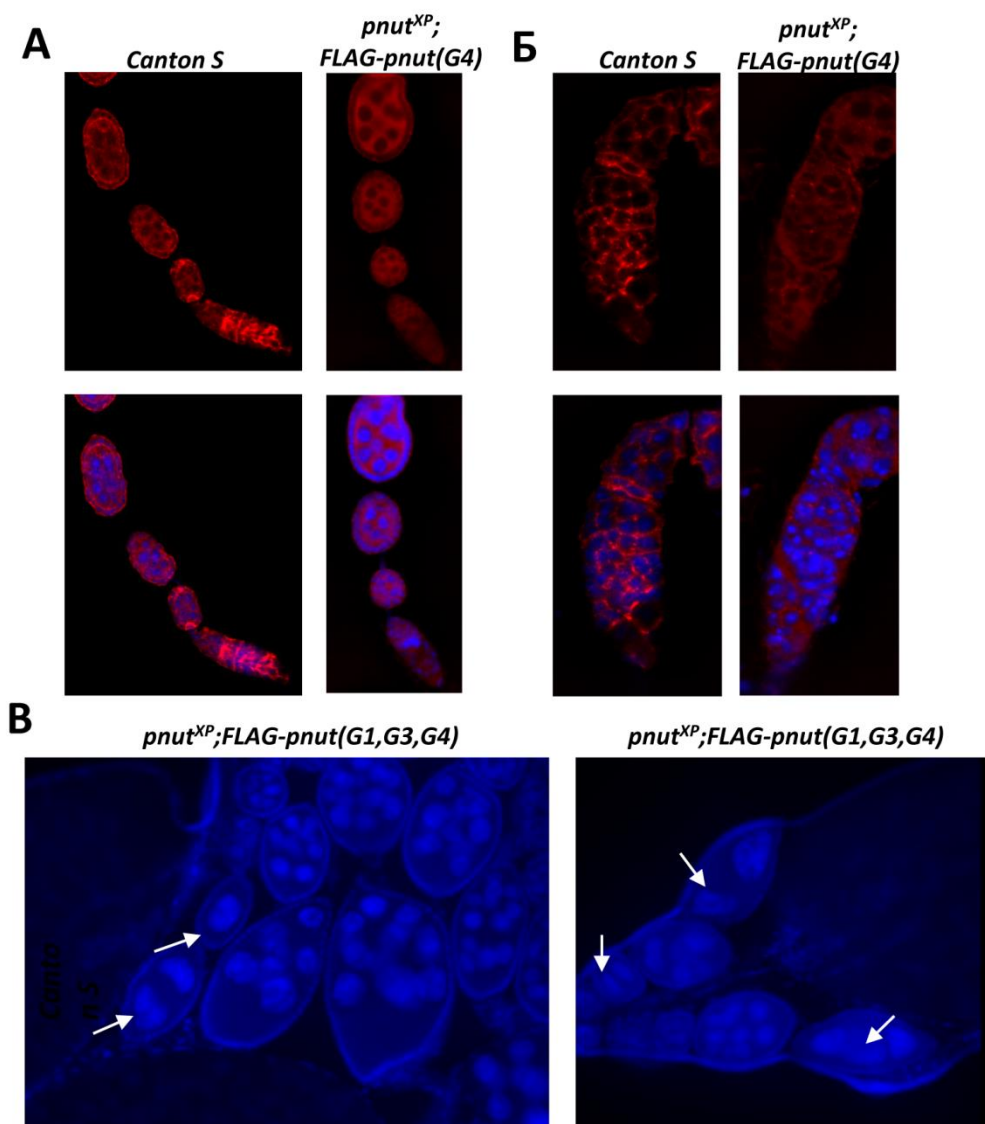


Рис. 24. Нарушения оогенеза у мутантов по ГТФазному домену Pnut. Изображены (А) начальные стадии оогенеза, а также (Б) гермариум крупным планом. Окраска на Pnut (красный) и DAPI (синий). У мутантов по ГТФазному домену Pnut локализован диффузно. (В) Оогенез у мутантов *pnut^{XP};FLAG-pnut(G1,G3,G4)*. Окраска DAPI. Стрелками отмечены фолликулы, содержащие всего 1-3 крупные питающие клетки вместо 15 в норме.

3.4.6. Влияние мутаций различных доменов *Pnut* на сперматогенез дрозофилы

Генетические тесты на стерильность показали, что самцы *pnut^{XP}*, экспрессирующие трансген с С-концевой делецией *FLAG-pnut(1-427)*, а также ГТФазный мутант *FLAG-pnut(G1,G3,G4)* имели аналогичный фенотип неподвижных спермиев, как и при проведении РНК-интерференции *pnut* (Табл. 11).

Таблица 11. Анализ на подвижность спермиев при 24°C.

Генотип	Просмотрено самцов	Подвижная	Неподвижная	Частично подвижная + примечания
<i>pnut^{XP};FLAG-pnut(1-427)</i>	24	4	7	13 – невозможно установить, так как нет контакта семенника с семенным пузырьком
<i>pnut^{XP};FLAG-pnut(G1,G3,G4)</i>	9	2	7	0

Нарушения цитокинеза в мейозе наблюдались с невысокой частотой в обеих линиях. Однако, ни в одном случае эти нарушения не были критичны и не могли приводить к стерильности.

В сперматогенезе делеционных мутантов *pnut^{XP};FLAG-pnut(1-427)* помимо неподвижных спермиев ярким нарушением была форма семенников, которые в 70-80% случаев выглядели как личиночные и не контактировали с семенными пузырьками (Рис. 25). Однако в этих шаро- и грибо-образных семенниках шли все процессы, характерные для сперматогенеза: генеративные клетки (стрелка 1) делятся, вступают в мейоз (стрелка 2), затем идет спермиогенез, завершающийся образованием нормальных на вид сперматозоидов (стрелка 3). Подвижность этих сперматозоидов оценить не удалось, так как для анализа подвижности используется сперма из семенного пузырька, а в случае мутантов он пустой из-за отсутствия контакта с остальной частью семенника.

В сперматогенезе у тройного ГТФазного мутанта *pnut^{XP};FLAG-pnut(G1,G3,G4)* самые значительные нарушения происходили на постмейотических стадиях, во время элонгации сперматид. У мутантов часто была нарушена элонгация и/или поляризация цист, что приводило к разбросанным по цисте ядрам.

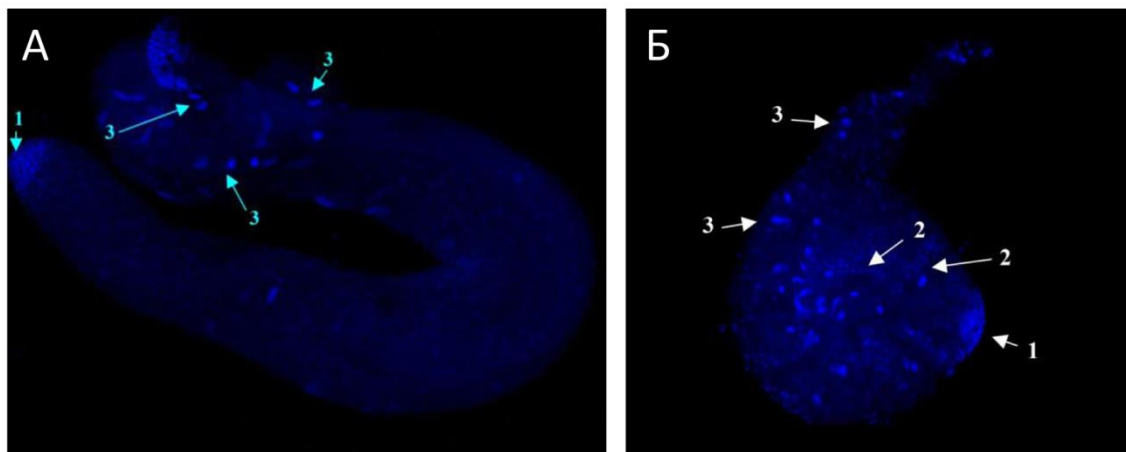


Рис. 25. Нарушения сперматогенеза и оогенеза у мутантов с делецией С-концевого домена Pnut. (А) Семенник дикого типа. (Б) Шаровидный семенник мутантных самцов *pnut^{XP};FLAG-pnut(1-427)*, не контактирующий с семенным пузырьком. Стрелками отмечены: митотические деления генеративных клеток (стрелка 1), мейоз (стрелка 2), спермиогенез, завершающийся образованием сперматозоидов (стрелка 3). Окраска на DAPI.

3.5. Изучение филаментообразования септиновых комплексов *in vitro*

3.5.1. Влияние ГТФ и Orc6b на формирование септиновых филаментов

Септиновый комплекс дрозофилы представляет собой гексамер вида Pnut-Sep2-Sep1-Sep1-Sep2-Pnut, в котором белок Pnut находится по краям комплекса. Формирование септиновых филаментов происходит за счет взаимодействия белков Pnut из соседних комплексов (Рис. 26).

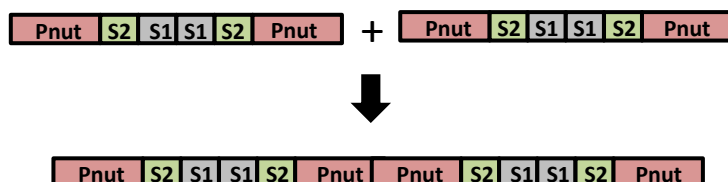


Рис. 26. Схема формирования септиновых филаментов дрозофилы.

В данной работе филаментообразование наблюдали с помощью электронной микроскопии (ЭМ), используя негативное окрашивание. Концентрация септиновых комплексов была подобрана таким образом, чтобы на ЭМ были видны отдельные мономеры (Рис. 27А), и составила 10 нг/мкл. Кроме того, при данной концентрации также формируются

димеры комплексов. При увеличении концентрации комплекса до 100 нг/мкл начинается концентрационно-зависимая самоагрегация комплексов в филаменты (**Рис. 27Б**). Добавление такого уплотняющего агента, как полиэтилен гликоль (ПЭГ), приводило к формированию более толстых пучков, вследствие агрегации комплексов как продольно, так и латерально (**Рис. 27В, Г**). Далее в работе использовались низкие концентрации комплекса (10-20 нг/мкл), чтобы избежать концентрационно-зависимой самоагрегации септиновых комплексов.

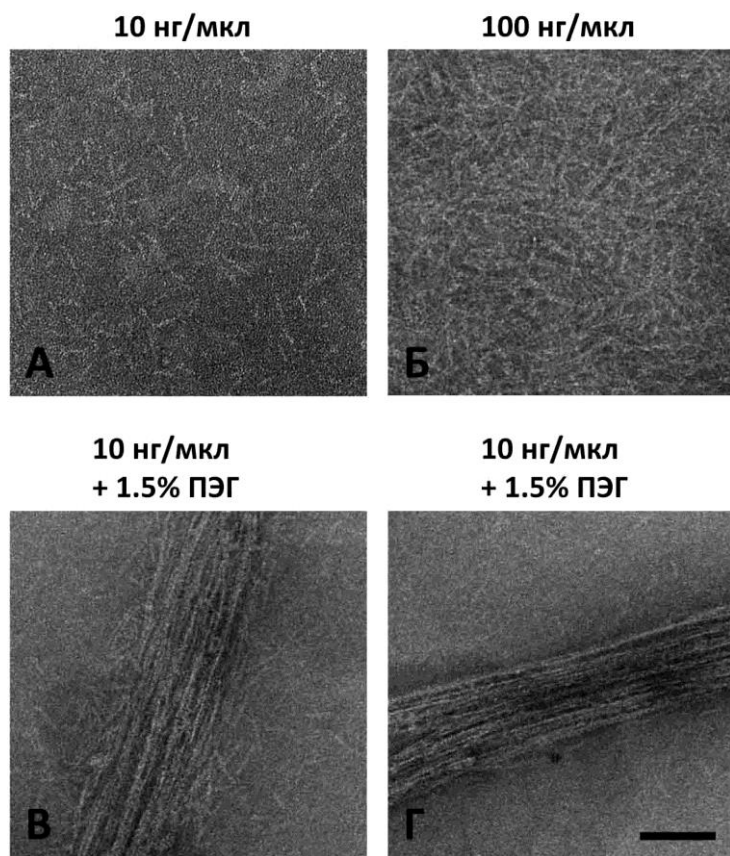


Рис. 27. Влияние концентрации, а также добавления ПЭГ на септиновый комплекс. (А) Рабочая концентрация комплекса (10 нг/мкл), при которой видны отдельные комплексы, а также димеры комплексов. (Б) Повышенная концентрация комплекса (100 нг/мкл), при которой начинается само-агрегация комплексов. (В), (Г) Рабочая концентрация комплекса (10 нг/мкл) с добавлением 1.5% ПЭГ. Комплексы агрегируются в толстые пучки. Масштаб 100 нм.

Септины как дрозофилы (**Рис. 27**), так и других организмов, способны само-полимеризоваться только при достаточно высоких концентрациях. Однако, у дрозофилы было показано, что белок Ogs6, необходимый для инициации репликации ДНК у эукариот, взаимодействует с С-концевым доменом Pnut *in vitro* и стимулирует формирование септиновых филаментов при низких концентрациях комплекса.

В согласии с предыдущими исследованиями, добавление Ogs6 к септиновым комплексам приводило к формированию филаментов *in vitro* (Рис. 28Б, В).

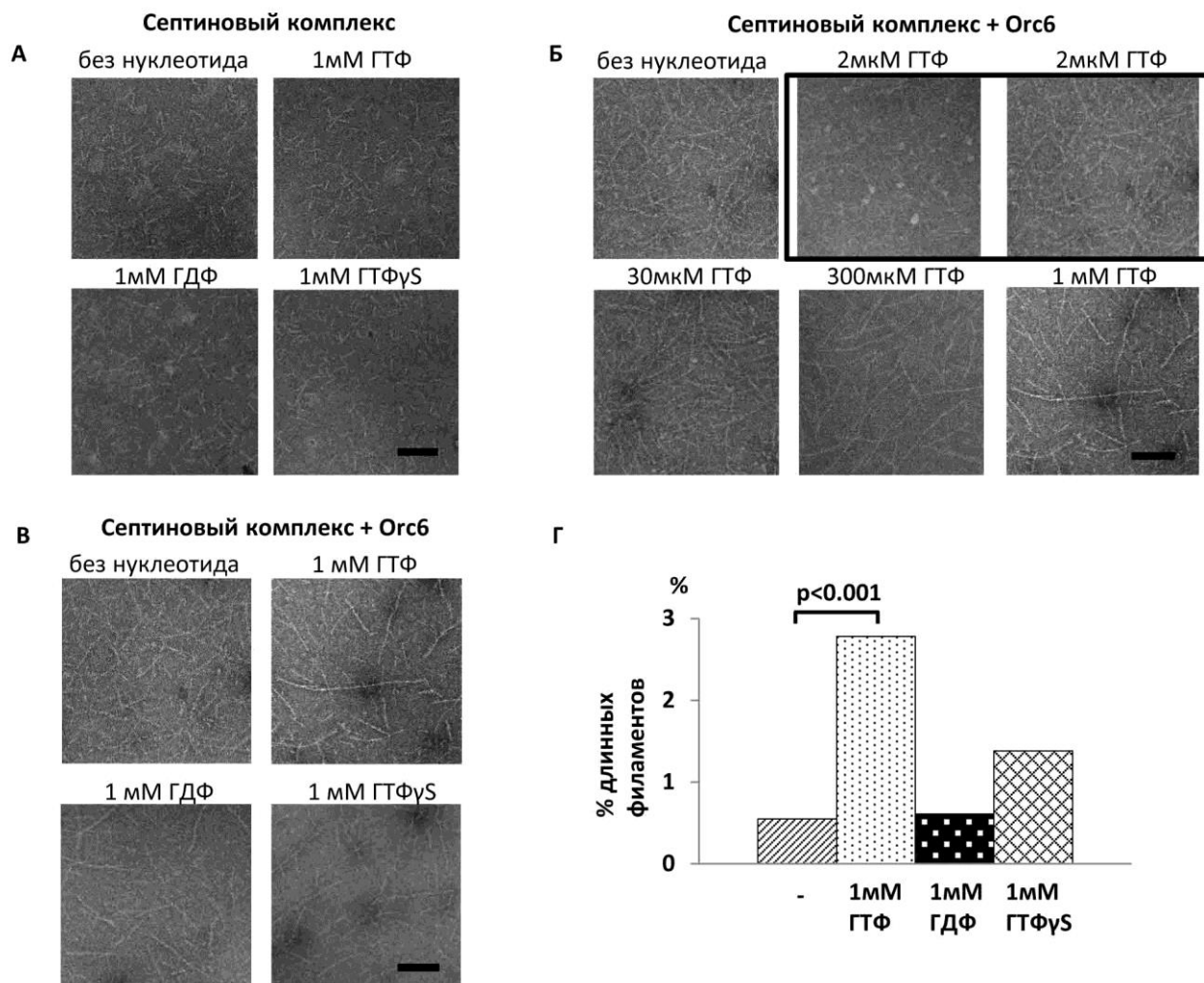


Рис. 28. Септиновые комплексы в присутствии различных гуаниновых нуклеотидов и Ogs6. Реконбинантный септиновый комплекс дрозофилы дикого типа инкубировали с ГТФ, ГДФ или ГТФγS в ГТФазном буфере в (А) отсутствие или (Б,В) присутствие Ogs6. Реакцию проводили в течение двух часов при комнатной температуре (22°C), после чего визуализировали при помощи ЭМ. Масштаб 100 нм. (Г) На графике отображены проценты длинных филаментов (длиной >10 мономеров), посчитанные для реакций полимеризации септиновых комплексов в присутствии Ogs6 и различных гуаниновых нуклеотидов.

В предыдущей работе (Huijbregts *et al.*, 2009) авторы показали, что Ogs6 стимулирует ГТФзную активность комплекса, а также, что добавление 2 мкМ ГТФ наряду с Ogs6 приводит к разборке филаментов. Мы повторили эксперимент. В настоящей работе, мы наблюдали, что в присутствии низких концентраций ГТФ (2 мкМ) филаменты действительно имели

тенденцию диссоциировать (**Рис. 28Б, в рамке**), что согласуется с предыдущей работой. Однако, увеличение концентрации ГТФ (вплоть до 1 мМ) приводило к построению более длинных филаментов в присутствии Огсб. Добавление негидролизующих гуаниновых нуклеотидов (ГДФ или ГТФγS) не предотвращало формирование филаментов (**Рис. 28В**). Однако, тщательный анализ длины филаментов показал, что в присутствии 1 мМ ГТФ филаменты были статистически более длинные, чем при добавлении ГДФ или ГТФγS в присутствии Огсб (**Рис. 28Г, Табл. 12**). Добавление ГТФ к септиновому комплексу в отсутствие Огсб не приводило к заметным эффектам. Использование ГДФ или ГТФγS также не имело эффекта (**Рис. 28А**).

Таблица 12. Влияние ГТФ, ГДФ и ГТФγS на формирование септиновых филаментов в присутствии Огсб.

кол-во мономеров, составляющих филамент	без нуклеотида (контроль)		1 мМ ГТФ			1 мМ ГДФ		1 мМ ГТФγS	
	N	%	N	%	Станд.ост.	N	%	N	%
1-4	693	76.49	605	73.16	-1.1	639	78.22	693	79.38
5-8	183	20.2	172	20.8	0.4	159	19.46	148	16.95
9-10	25	2.76	27	3.26	0.9	14	1.71	20	2.29
>10	5	0.55	23	2.78	8.8 > 2	5	0.61	7	1.38
сумма	906	100	827	100	-	817	100	873	100
Хи-квадрат тест			p<0.001			p=0.28>0.05		p=0.07>0.05	

Частоты септиновых филаментов, сформировавшихся в присутствии Огсб, были посчитаны с 10 ЭМ фотографий (>800 филаментов) для каждой реакции, и затем сгруппированы на основании длины. Хи-квадрат критерий был применен, при этом ожидаемые частоты для реакций с ГТФ, ГДФ и ГТФγS высчитывались исходя из распределения частот для контрольной реакции (без добавления нуклеотида). Статистически значимые различия ($p < 0.001$) в распределении длин филаментов были обнаружены для реакции с ГТФ, но не с ГДФ или ГТФγS. Стандартизованные остатки (Станд. ост.) были посчитаны как $(\text{наблюдаемое} - \text{ожидаемое}) / \sqrt{\text{ожидаемое}}$. Группы, в которых значение Станд.ост. было больше двух, полагались вносящими наибольший вклад в различия между распределениями.

3.5.2. Механизм Огсб-зависимого формирования септиновых филаментов

Добавление Огсб к септиновым комплексам способствует сборке линейных филаментов, однако неясно, взаимодействует ли Огсб напрямую с комплексом, и, если да,

остается ли он связанным с комплексами после их полимеризации. Для того чтобы выяснить механизм стимулирующего эффекта Orc6, мы визуализировали Orc6 в реакции формирования септиновых филаментов. Для этого было использовано модифицированное иммунно-золото, позволяющее визуализировать меченные белки в ЭМ экспериментах. Результаты представлены на **Рис. 29**. В отсутствие Orc6 филаменты не формировались, и окраска иммуннозолотом не выявила особого паттерна. При добавлении Orc6 формируются длинные филаменты, при этом молекулы Orc6 специфически локализуются вдоль септиновых филаментов и остаются связанными с ними после полимеризации.

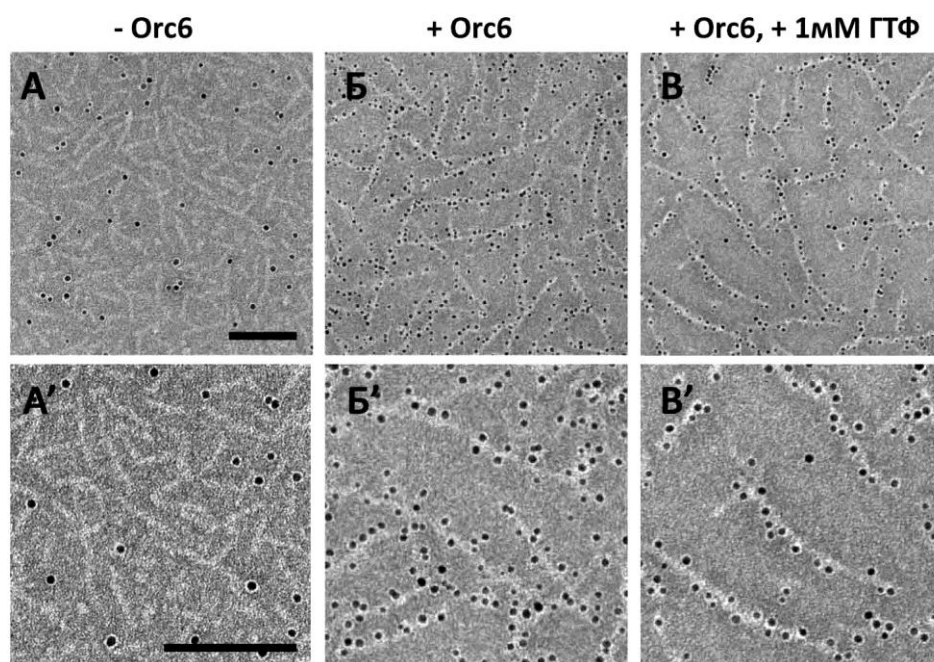


Рис. 29. Orc6 стехиометрически взаимодействует с септиновыми филаментами. Представлены ЭМ фотографии результатов окраски модифицированным иммуннозолотом следующих реакций: (A и A') септиновый комплекс дикого типа, (B и B') септиновый комплекс дикого типа в присутствии Orc6, (B и B'') септиновый комплекс дикого типа в присутствии Orc6 с добавлением 1 мМ ГТФ. Масштаб 100 нм.

Кроме того, использование иммуннозолота позволило нам оценить стехиометрию связывания Orc6 с септиновыми филаментами. Из расчета, что каждый септиновый комплекс содержит две молекулы Pnut, а также зная, что Orc6 взаимодействует с Pnut, ожидаемое соотношение было две частицы иммуннозолота на один мономер. Экспериментальный результат составил 2.26 ± 0.34 частиц на мономер (было проанализировано более 30 филаментов), что близко к ожидаемому 2:1 соотношению. Таким образом, Orc6 участвует в полимеризации септинов за счет белок-белковых взаимодействий.

3.5.3. Формирование филаментов септиновыми комплексами, содержащими Pnut с мутациями в ГТФзном домене

Мутации в ГТФазном домене Pnut не препятствовали сборке септинового комплекса (Рис. 15), однако такие мутантные формы белка не спасали нуль-аллель (Табл. 10). Помимо формирования комплекса, для функционирования септинов также важна способность комплексов полимеризоваться с формированием филаментов. Поэтому следующим этапом очищенные септиновые комплексы с мутацией в ГТФазном домене были проверены на способность к филаментообразованию *in vitro* при помощи ЭМ. Комплексы, содержащие мутации в ГТФазном домене Pnut имели сниженную способность формировать филаменты как при самополимеризации, так и при добавлении Orc6. Наиболее выраженный эффект имела мутация в G4 мотиве – в этом случае филаменты совсем не формировались (Рис. 30).

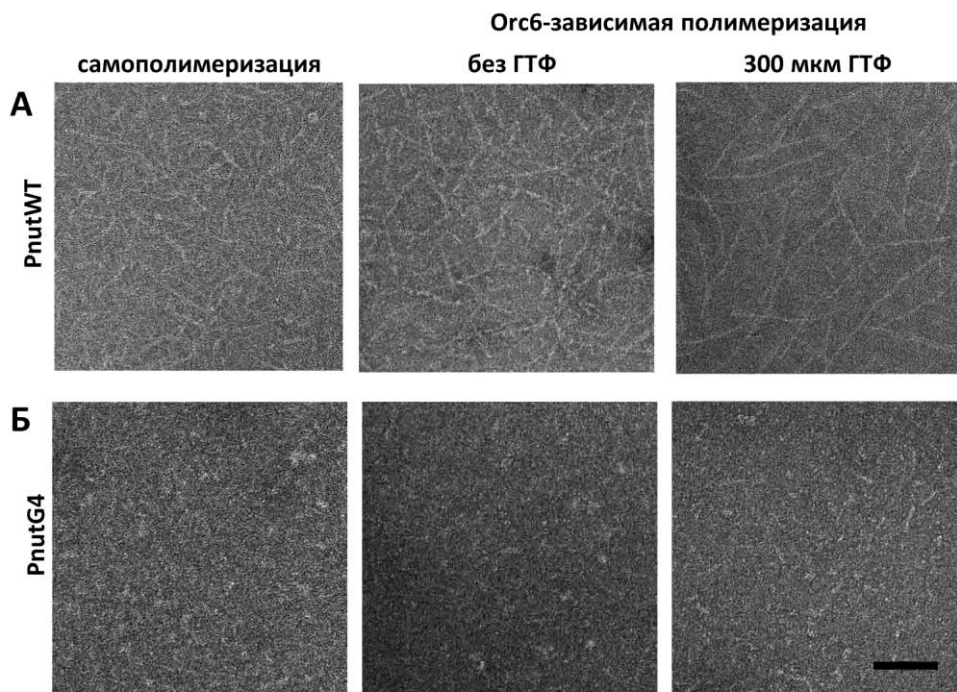


Рис. 30. Влияние мутаций в ГТФ-азном домене Pnut на полимеризацию септиновых комплексов.

Представлены ЭМ фотографии септиновых комплексов (А) дикого типа His-Pnut-Sep2-Sep1, (Б) His-Pnut(G4)-Sep2-Sep1, в условиях само-полимеризации (концентрация 50 нг/мкл), а также Orc6-зависимой полимеризации. Масштаб 100 нм.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Роль Pnut в делении соматических и генеративных клеток

В данной работе мы изучили влияние мутаций в гене *pnut* на деления генеративных и соматических клеток дрозофилы. Анализ паттерна экспрессии гена *pnut* выявил наиболее высокий уровень в районах с активно делящимися соматическими, но не генеративными клетками. Мы показали, что в соматических клетках делеция *pnut* приводила не только к нарушениям цитокинеза, что было ожидаемо согласно литературным данным, но также к аномалиям сегрегации хромосом, а также к удлинению стадии прометафазы, что раньше для данного гена показано не было. Из литературных данных известно, что даже небольшое снижение экспрессии человеческого септина SEPT2 в MDCK и HeLa клетках приводило к серьезным дефектам клеточного деления, в частности, нарушалось прикрепление микротрубочек к кинетохорам, и происходила потеря хромосом из метафазной пластинки (Spiliotis et al., 2005). Кроме того, для белка млекопитающих SEPT7 (гомолог Pnut) было показано взаимодействие с моторным белком CENP-E, стабилизирующим прикрепление кинетохоров к веретену (Zhu et al., 2008). Эти данные согласуются с обнаруженными нами нарушениями прикрепления хромосом к веретену и хромосомными мостами у мутантов по *pnut*.

Создание плазмидной конструкции для проведения РНК-интерференции гена *pnut* позволило нам изучить функции гена *pnut* в делении генеративных клеток, которое характеризуется неполным цитокинезом. Цитологический анализ показал, что при снижении экспрессии *pnut* как предмейотические, так и мейотические деления генеративных клеток нарушены не были. Цитокинетические аномалии у мутантов по С-концевому и ГТФ-азному доменам Pnut тоже встречались с низкой частотой. Фенотип тройного ГТФазного мутанта Pnut, в котором некоторые яйцевые камеры содержали 1-3 крупных питающих клетки, скорее всего, объясняется аномалиями построения веретена, а не нарушениями цитокинеза. Полученные нами данные указывают на то, что Pnut не является необходимым для делений генеративных клеток как самцов, так и самок дрозофилы. Здесь также следует отметить, что анализ паттерна экспрессии гена также показал, что, хотя ген *pnut* экспрессируется в гонадах, его экспрессия в наших экспериментах ограничена клетками соматического происхождения. Несмотря на то, что некоторые исследователи обнаруживали наличие белка Pnut при помощи антител в области делений генеративных клеток в гермариях (Adam et al., 2000), эксперименты, проведенные этими авторами, тем не менее подтверждают наш вывод о том,

что для делений стволовых клеток и цистобластов женской зародышевой линии *Pnut* не требуется (Adam et al., 2000).

Мы полагаем, что септиновый комплекс у многоклеточных, в частности у дрозофилы, не так важен для цитокинеза, как у дрожжей. У дрожжей, делеция любого из септинов, входящих в состав комплекса, приводила к дефектам цитокинеза (Hartwell, 1971). У дрозофилы же, как было показано в данной работе, частота полиплоидных клеток в нервных ганглиях нуль-аллельных по *pnut* личинок составляла около 20% (Табл. 5). 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 блоку цитокинеза (Somma et al., 2002). Вместе, эти данные указывают на то, что большинство клеток у мутантов 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 заякоривая 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. Они взаимодействуют с актином не напрямую, как у дрожжей, а через адаптерный белок анилин, который и играет главную роль в заякоривании компонентов сократительного кольца, таких как миозин II, актин и септины. Именно за счет ассоциации с септинами анилин «прикрепляет» актомиозиновое кольцо к мембране в районе перетяжки. Другой аналогичный комплекс, который связывает актин с плазматической мембраной, включает в себя адгезионные контакты (adherens junctions), состоящие из E-кадгерина (E-cadherin), а также α - и β - катенинов (Hartsock, Nelson, 2008). В одной из недавних статей на модели мейоза в сперматогенезе дрозофилы, а также в мышечных L-клетках было показано, что экспрессия DE-кадгерина (DE-cadherin) частично спасала цитокинетические дефекты, вызванные деплецией анилина (Goldbach et al., 2010). Таким образом, в животных клетках возможны как минимум два альтернативных пути цитокинеза, один из которых не зависит напрямую от септинов.

Мутанты по одному из ГТФазных мотивов G4, а также делеционные мутанты интересны тем, что при экспрессии данных трансгенов на фоне нуль-аллеля *pnut*^{XP} происходит спасение цитокинетических дефектов, однако полного восстановления жизнеспособности не происходит. Этот результат свидетельствует об участии белка *Pnut* в других важных для выживания функциях. Например, некоторые из септинов млекопитающих являются специфичными для нейронов, также было показано участие их в таких процессах

как рост аксонов, формирование дендритов, выброс нейротрансмиттеров, а также вовлеченность в различные заболевания, связанные с нервной системой – болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, наследственная мышечная атрофия. Высокий уровень экспрессии Pnut в нервной системе дрозофилы, а также наличие специфичного паттерна экспрессии (**Рис. 4Г**, **Рис. 22В**), несомненно, указывают на роль данного белка в функционировании этой системы. Стоит также отметить, что *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, 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.

4.2. ГТФазная активность индивидуальных септинов

Все септины содержат ГТФазный домен, который связывает ГТФ, кроме того, многие септины, но не все, способны гидролизовать ГТФ в ГДФ (Leipe *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2007). Мы показали, что индивидуально экспрессированный септин Pnut обладает ГТФазной активностью. Он был способен как гидролизовать ГТФ, так и обменивать связанный нуклеотид на новый из окружающего раствора (**Табл. 9**). Однако скорость гидролиза была достаточно медленной, так как за 4 часа реакции процент связанного с белком ГДФ составил 86%. Для сравнения, за те же самые 4 часа Sep1 гидролизовал весь ГТФ (процент связанного с белком ГДФ составили 99%). Sep2 не обладал ГТФазной активностью (0.05% ГДФ после 4 часов реакции). Полученные данные согласуются с известными литературными данными. Человеческий гомолог Sep2 дрозофилы – SEPT6 – в течение 2-х часов реакции не обнаруживал ГТФ-гидролизной активности (Zent, Wittinghofer, 2014). SEPT7 и SEPT2 (гомологи Pnut и Sep1 дрозофилы, соответственно) обладали ГТФазной активностью, при этом SEPT7 гидролизовал ГТФ очень медленно, а SEPT2 – со средней скоростью, что согласуется с полученными нами результатами.

Мутации консервативных мотивов ГТФазного домена Pnut, использованные нами в работе, нарушали как гидролиз, так и обмен нуклеотида, что подтверждает важность мутированных аминокислот для ГТФазной активности белка. На основе анализа аминокислотных последовательностей септинов разных организмов было показано, что за гидролиз ГТФ отвечает консервативный треонин в switch I участке (Sirajuddin *et al.*, 2007; Versele, Thorner, 2004). В данной работе мы использовали мутации консервативных мотивов,

участвующих в связывании, а не гидролизе ГТФ. Таким образом, пониженный гидролиз ГТФ, наблюдаемый у мутантов, является следствием низкой скорости обмена гуанозинфосфата.

Укороченные формы Pnut с делецией С-концевого домена (Pnut(1-460) и Pnut(1-427)) имели повышенную ГТФазную активность по сравнению с белком дикого типа. Похожий эффект был показан на дрожжах *S. cerevisiae*, где транскрибированный септин Cdc12 с делецией С-концевого домена обнаруживал в 4-5 раз повышенную скорость ГТФ гидролиза по сравнению с полноразмерной копией Cdc12 (Versele, Thorner, 2004). Эти данные указывают на то, что присутствие С-концевого домена ингибирует ГТФазную активность Pnut. В С-концевом домене Pnut располагается биспиральный участок, участвующий в белок-белковых взаимодействиях, поэтому возможно, что этот регион играет регуляторную роль, соединяясь с белками-партнерами. Кроме того, полученный результат можно объяснить увеличением доступности ГТФазного домена для обмена нуклеотида при делеции С-концевого домена, который в белке дикого типа может закрывать ГТФ-связывающий сайт.

4.3. Формирование септинового комплекса

Септины взаимодействуют друг с другом с формированием комплексов. Наиболее охарактеризован комплекс, изолированный из дрожжей. Базовая структурная единица дрожжевого комплекса – октамер, состоящий из четырех субъединиц, организованных как симметрично расположенные два тетрамера (Bertin *et al.*, 2008). Наподобие октамера дрожжей, септиновый комплекс человека представляет собой неполярный гексамер SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 (Sirajuddin *et al.*, 2007). Было показано, что септиновый комплекс млекопитающих в некоторых случаях мог также включать в себя SEPT9, что приводило к формированию октамера, как у дрожжей (Kim *et al.*, 2011; Sellin *et al.*, 2011; Sellin *et al.*, 2012). На сегодняшний день нет данных, указывающих на то, что септиновый комплекс дрозофилы может формировать октамер. Высоко-очищенный нативный септиновый комплекс дрозофилы состоит из Pnut, Sep1 и Sep2 субъединиц (Field *et al.*, 1996; Huijbregts *et al.*, 2009). Анализ материала, иммуннопреципитированного из тканей и клеточных экстрактов дрозофилы, показал наличие тех же самых трех септинов. 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-Sep1-Sep2-Pnut (Huijbregts *et al.*, 2009).

Структурный анализ септинового комплекса человека показал, что в формировании комплекса участвуют ГТФазные домены септинов (Sirajuddin *et al.*, 2007). При этом взаимодействие между субъединицами происходит при помощи двух поверхностей взаимодействия. Первая включает в себя сайт связывания нуклеотида (G-поверхность), вторая состоит из участков, прилегающих к сайту связывания нуклеотида с обеих сторон (NC-поверхность) (**Рис. 1**). В комплексе эти поверхности чередуются, так, например, у человека, SEPT7-SEPT6 и SEPT2-SEPT2 взаимодействия происходят за счет NC-поверхностей, а SEPT6-SEPT2 – за счет G-поверхности (**Рис. 2**).

Стабильность взаимодействия G-поверхностей зависит от присутствия гуанозинфосфата в ГТФ-связывающем сайте (Macedo *et al.*, 2013; Sirajuddin *et al.*, 2007; Zent *et al.*, 2011), тогда как для NC-поверхности это не важно. В случае Pnut, мутации в ГТФазном домене, нарушающие связывание ГТФ (в мотивах G1, G3 и G4), не влияли на сборку комплекса, поскольку Pnut находится по краям гексамера, и его G-поверхность, содержащая сайт связывания гуанозинфосфата, не участвует в формировании комплекса.

Что касается C-концевого домена Pnut, то в данном случае имеют место различия между дрозофилиным и человеческим септиновыми комплексами. У человека, комплекс собирался даже когда C-концевые домены каждой из субъединиц были отрезаны (Sirajuddin *et al.*, 2007). У дрозофилы же делеция C-конца Pnut нарушала формирование комплекса *in vitro* (Huijbregts *et al.*, 2009).

Нами была измерена ГТФазная активность септинового комплекса дикого типа и с мутацией в G4 мотиве Pnut, которая имела наибольший эффект на ГТФазную активность индивидуального белка. Поскольку ГТФазная активность комплекса состоит из объединенных активностей Pnut и Sep1 (Sep2 не способен гидролизовать нуклеотид, и находится в комплексе в ГТФ-связанной форме), то мутантный по Pnut комплекс имел пониженную, но не отсутствующую ГТФ-связывание и ГТФ гидролиз (**Рис. 16**). Анализ ГТФазной активности индивидуальных белков и комплексов мы проводили с использованием разных методик, так как в связи с более трудоемким процессом выделения комплекса по сравнению с экспрессией в *E.coli* мы были ограничены количеством комплексов, и были вынуждены использовать более чувствительные методы для меньших концентраций белка. В связи с этим полученные нами данные не позволяют сравнить ГТФазные активности комплекса и индивидуальных септинов. Тем не менее, в литературе было показано, что при димеризации септиновых субъединиц, суммарная ГТФазная

активность падает (Zent, Wittinghofer, 2014). Следовательно, следовало бы ожидать пониженную ГТФазную активность для комплекса по сравнению с индивидуальным белком.

4.4. Формирование септиновых филаментов

Септиновые комплексы далее могут полимеризоваться с формированием длинных филаментов, которые, как принято считать, являют биологически активной формой септинов. Используя электронную микроскопию для визуализации, мы показали, что при больших концентрациях комплекса, а также при добавлении ПЭГ, формировались филаменты, а также пучки филаментов; при низких концентрациях комплекса наблюдались отдельные мономеры и димеры комплексов. Такая зависимость формирования филаментов от концентрации комплекса, а также эффект ПЭГ были показаны и ранее (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. Большинство септинов содержат на С-конце биспиральный домен, который чаще всего необходим для белок-белковых взаимодействий. Более того, из структурных данных известно, что С-концы септинов в составе комплекса расположены перпендикулярно продольной оси комплекса (**Рис. 2А**), и, следовательно, представляют собой удобную посадочную площадку для других белков. У млекопитающих, *Vorg* белок связывается специфически с септинами и его оверэкспрессия внутри клетки приводит к агрегации септиновых филаментов (Joberty *et al.*, 2001). Функциональный гомолог *Vorg* у дрожжей - *Gic1* – также взаимодействует с септиновыми комплексами и стимулирует формирование длинных пучков филаментов (Sadian *et al.*, 2013).

У дрозофилы не было обнаружено гомологов *Vorg* и *Gic1*. Однако, не так давно было показано, что репликационный белок *Orc6* важен для цитокинеза дрозофилы и имеет активную роль в функционировании септинового комплекса (Chesnokov *et al.*, 2003). Ранее было показано взаимодействие *Orc6* и *Pnut* методами дрожжевой дигибридной системы, иммуннопреципитации *in vitro* и *in vivo*, а также колокализации *in vivo*. В настоящей работе с помощью меченая модифицированным иммуннозолотом в ходе ЭМ мы подтвердили прямое участие *Orc6* в процессе филаментообразования за счет белок-белковых взаимодействий. Мы показали, что *Orc6* стехиометрически связывается с комплексом в соотношении 2 молекулы *Orc6* на один гексамер (экспериментальное значение составило 2.26 ± 0.34), что согласуется с

наличием двух молекул Pnut в мономере. Кроме того, в реакции филаментообразования Orc6 оставался связанным с филаментами, скорее всего стабилизируя сформированные полимеры за счет димеризации Orc6-Orc6 (Akhmetova *et al.*, 2015).

Мы обнаружили, что увеличение концентрации ГТФ вплоть до 1 мМ в присутствии Orc6 стимулировало формирование более длинных филаментов. Здесь необходимо отметить, что в предыдущих работах авторы использовали низкие концентрации ГТФ (2 мкМ), и в присутствии Orc6 авторы наблюдали деполимеризацию филаментов (Huijbregts *et al.*, 2009). При таких невысоких концентрациях нуклеотида возможен неравномерный обмен ГТФ субъединицами комплекса (в связи с разницей в скорости обмена и гидролиза), что могло бы привести к структурным изменениям и разборке комплекса. Например, связывание ГТФ SEPT2 (человеческий гомолог Sep1 дрозофилы) индуцирует конформационные изменения в G-поверхности, которые передаются на NC-поверхность и дестабилизируют ее (Sirajuddin *et al.*, 2007). Чтобы избежать возможную проблему нехватки ГТФ, мы использовали повышенные концентрации ГТФ, чтобы создать условия насыщения нуклеотидом. При таких условиях, добавление ГТФ способствовало формированию более длинных филаментов (**Рис. 28, Табл. 12**).

Известно, что Orc6 оказывает стимулирующий эффект на ГТФазную активность септинового комплекса (Huijbregts *et al.*, 2009). Учитывая, что Orc6 взаимодействует с Pnut, мы предполагаем, что Orc6 влияет на ГТФазную активность именно Pnut. Orc6 может активно стимулировать ГТФазную активность Pnut, с другой стороны, возможно, что гидролиз представляет собой «побочную» реакцию, происходящую вследствие того, что конформация Pnut изменяется при присоединении к нему Orc6. В любом случае, гидролиз ГТФ в ГДФ в активном сайте Pnut по всей видимости приводит к более тесному контакту между двумя Pnut субъединицами соседних комплексов, стабилизируя формирующиеся филаменты и препятствуя их разборке. SEPT7 (человеческий гомолог Pnut дрозофилы) формирует более плотные димеры за счет G-поверхностей обоих белков в ГДФ-связанном состоянии по сравнению с ГТФ-связанным состоянием (Zent, Wittinghofer, 2014).

Мутации в ГТФазном домене Pnut не нарушали сборку комплекса, однако препятствовали формированию филаментов (**Рис. 30**). Сделанные нами замены аминокислот, вероятно, нарушают структуру ГТФазного домена, и следовательно, ГТФазную активность и связывание ГТФ Pnut. Такие мутантные белки не способны ассоциировать друг с другом, таким образом препятствуя полимеризации септиновых гексамеров. 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 основе полученных данных нами была предложена модель Orc6-зависимого формирования септиновых филаментов, представленная на **Рис. 31**.

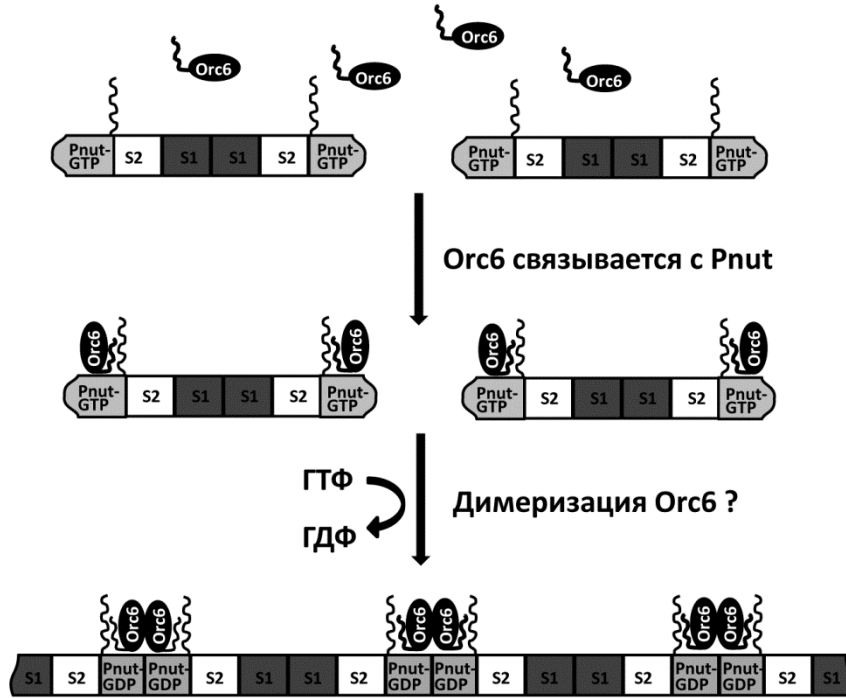


Рис. 31. Модель стимулирующего влияния Orc6 и ГТФ на формирование септиновых филаментов дрозофилы. Белок Orc6 связывается с белком Pnut, располагающимся по краям септинового комплекса. Связывание с Orc6 стимулирует гидролиз ГТФ септином Pnut, в результате чего субъединицы Pnut формируют более плотные контакты между собой, таким образом, стабилизируя сформировавшиеся филаменты.

4.5. Роль консервативных доменов Pnut в соматических тканях дрозофилы

In vivo данные, приведенные в данной работе, указывают на важность как С-концевого, так и ГТФ-связывающего доменов Pnut для выживания дрозофилы. Оба трансгена были неспособны спасти летальную на стадии ранней предкуколки нуль-делецию *pnut^{XP}*. Цитологический анализ показал, что биспиральный домен Pnut, расположенный на С-конце белка, важен для правильной локализации белка *in vivo*, поскольку трансгены с делетированным С-концом имели тенденцию формировать агрегаты в клетках. Подобные агрегаты наблюдали и ранее, при экспрессии Pnut с делетированным С-концом в L2 культуре клеток дрозофилы (Huijbrechts *et al.*, 2009). Интересно, что в некоторых тканях, таких как имагинальные диски, агрегаты продолжали находиться на клеточных мембранах, что характерно для Pnut дикого типа, тогда как, например, в слюнных железах, агрегаты не

ассоциировали с мембраной и обнаруживались в цитоплазме. Скорее всего, в разных типах клеток различается регуляция септин-мембранного взаимодействия. Кроме того, септины могут ассоциировать с мембранами напрямую или же через белки-посредники, такие как анилин или SNARE белки (Beites *et al.*, 1999; D'Avino, 2009).

In vitro было ранее показано, что делеция С-концевого домена Pnut нарушала его способность формировать гексамерный комплекс с двумя другими септинами дрозофилы Sep1 и Sep2 (Huijbregts *et al.*, 2009). Мы показали, что *in vivo*, по крайней мере в имагинальных дисках личинок, Sep1 и Sep2 продолжают колокализироваться с Pnut(1-427) в агрегатах (**Рис. 20**), указывая на то, что комплекс, по всей видимости, формировался. Условия *in vivo* могут очень сильно отличаться от *in vitro* экспериментов, прежде всего, наличием других белков, которые могут играть регуляторную и стабилизирующую роль в формировании септинового комплекса. рН и концентрация солей в микроокружении, а также локальная концентрация самих септиновых белков также могут иметь немаловажное значение.

В любом случае, делеция С-концевого домена Pnut нарушает правильную локализацию белка и всего септинового комплекса, тем самым препятствуя нормальному развитию и выживанию дрозофилы. В делетированном домене содержится биспиральный участок, участвующий в белок-белковых взаимодействиях. Далее, из структурных данных известно, что, С-концы септинов в составе комплекса расположены перпендикулярно продольной оси комплекса, и, следовательно, представляют собой удобную посадочную площадку для других белков. Мы предполагаем, что мутанты Pnut с делецией биспирального домена не могут правильным образом взаимодействовать с другими белками, что приводит к неправильной регуляции функционирования септинового комплекса и филаментов. В частности, известно, что именно за счет С-конца Pnut ассоциирует с Orc6, который стимулирует полимеризацию септинов (Huijbregts *et al.*, 2009).

Оба ГТФазных мутанта Pnut(G4) и Pnut(G1,G3,G4) не спасали нуль-аллельную леталь. Иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием антител к Pnut, а также к FLAG, показало, что оба ГТФазных мутантных белка не обнаруживали характерного для белка дикого типа яркого пунктирного окрашивания цитоплазматической мембраны. Вместо этого мутантный белок располагался как диффузно в области клеточной мембраны, так и по всей клетке, в зависимости от анализируемой ткани. Мы предполагаем, что Pnut(G4) и Pnut(G1,G3,G4) мутанты обладают пониженной способностью взаимодействовать с цитоплазматической мембраной, при этом формирующийся септиновый комплекс не может

формировать специфические структуры из-за того, что данный мутант препятствует формированию филаментов, как было показано нами *in vitro* при помощи ЭМ (Рис. 30). У личинок с одиночной мутацией *Pnut(G4)* формировались имагинальные диски, и в них, а также в нервных ганглиях не было обнаружено сильных цитокINETических дефектов. Это можно объяснить тем, что материнский продукт вместе с мутантным могли бы формировать гибридные комплексы и филаменты, которые частично функциональны, что обеспечивало прогресс в развитии по сравнению с нуль-аллелем. Мутация *Pnut(G4)* таким образом спасает цитокINETические дефекты нуль-аллеля *pnut*, что приводит к формированию имагинальных дисков, однако не спасает другие процессы, в которых задействованы септиновые филаменты.

4.6. Участие *Pnut* в оогенезе дрозофилы

Эктопическое подавление экспрессии гена *pnut* при помощи РНК-интерференции в различных типах фолликулярных клеток яичников приводило к появлению 4-х типов аномалий: отсутствию интерфолликулярных клеток, нарушению полярности яйцевых камер, нарушению цитокИнеза в клетках хориона и нарушению упаковки хроматина в ядрах фолликулярных клеток. Нарушение цитокИнеза и структуры хроматина было ожидаемым, так как известно, что *Pnut* участвует в цитокИнезе, и что он взаимодействует с белком *Orc6*, участвующем в репликации (Akhmetova *et al.*, 2015; Chesnokov *et al.*, 2003; Huijbregts *et al.*, 2009). Характерной особенностью фолликулярных клеток является их эндорепликация, приводящая к повышению копийности ДНК и увеличивающая количество синтезирующихся мРНК. По-видимому, белок *Pnut* также вовлекается в процесс эндорепликации в оогенезе.

Особый интерес вызывает участие *Pnut* в поляризации яйцевых камер и функционирования интерфолликулярных клеток. Поляризация ооцита является важнейшим процессом для нормального развития будущего эмбриона и проходит в течение оогенеза в 3 этапа. Первый этап поляризации происходит в гермариуме и зависит от функционирования фузома, вдоль которой и осуществляется селективный транспорт органелл, белков и РНК в будущий ооцит. На втором этапе на основе фузома выстраивается сеть микротрубочек, которая замещает фузому и также осуществляет направленный транспорт в ооцит. Затем, на 6-7 стадиях развития яйцевой камеры происходит трансляция мРНК гена *gurken*, расположенной в задней области ооцита, между ядром ооцита и фолликулярными клетками. Белок GRK проникает в расположенные рядом фолликулярные клетки и активирует EGFR-сигнальный путь, который специализирует данные фолликулярные клетки как задние

терминальные, которые, в свою очередь, посылают сигнал микротрубочкам ооцита, индуцирующий их реполяризацию (Grammont, Irvine, 2002). В результате на 7-8 стадиях оогенеза в ооците происходит окончательная реорганизация цитоскелета, необходимая для поляризации ооцита и закладки осей будущего эмбриона. Так как участие септинов в регуляции микротрубочкового цитоскелета внутри клетки было неоднократно показано (Bowen *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012), логично предположить, что белок Pnut также может участвовать в поляризации эпителиальных фолликулярных клеток и/или в передаче сигналов от фолликулярных клеток к ооциту.

Фолликулярные клетки каждой яйцевой камеры делятся на три типа: две пары полярных клеток, располагающихся на разных полюсах фолликула; от 4 до 6 интерфолликулярных клеток, которые разделяют фолликулы между собой, и эпителиальные фолликулярные клетки. Установлено, что полярные клетки необходимы для определения судьбы соседних клеток: интерфолликулярных, центропетальных и бордюрных (Grammont, Irvine, 2002; Torres *et al.*, 2003). Кроме того, они определяют локализацию ооцита внутри камеры и участвуют в установлении передне-задней и дорзально-вентральной осей ооцита, способствуя реорганизации его цитоскелета (Grammont, Irvine, 2002). Следовательно, отсутствие интерфолликулярных клеток при подавлении экспрессии гена *pnut* также сигнализирует о нарушении работы полярных клеток, что, в свою очередь, приводит к нарушению поляризации ооцита. В поддержку данного предположения свидетельствует и наблюдаемое нами смещение осей ооцита при РНК-интерференции *pnut* в фолликулярных клетках.

Таким образом, эктопическое подавление экспрессии в различных типах фолликулярных клеток яичников выявило 3 фокуса действия белка Pnut в оогенезе: нарушение поляризации ооцита, нарушение цитокинеза в соматических клетках хориона и нарушение конденсации хроматина в фолликулярных клетках.

При анализе выживаемости яиц, отложенных самками с РНК-интерференцией *pnut*, запущенной повсеместным драйвером *Act5c-GAL4*, было обнаружено 2 пика гибели в эмбриогенезе: первый, наиболее существенный, происходил на самых ранних стадиях, задолго до целлюляризации, а второй, более слабый, выявлялся на 9-10 стадии (**Рис. 12, Табл. 8**). Следует отметить, что при данном способе анализа развития яйца гибель фиксируется на более поздних этапах, когда становится видимой дегградация тканей эмбриона. Следовательно, процессы, приводящие к таким последствиям, начинаются раньше, т.е. в нашем случае первый пик гибели происходит уже при первых дроблениях, а второй – на стадии после бластодермы, по-видимому, в процессе гаструляции (6-8 стадии). Второй пик

гибели хорошо согласуется с литературными данными: известно, что продукт гена *pnut* необходим для цитокинеза соматических клеток (Neufeld, Rubin, 1994; Ахметова и Федорова, 2011). Процесс целлюляризации в эмбриогенезе схож с цитокинезом, в нем участвуют те же белки и сигнальные пути. Ранее было показано, что белок Pnut необходим для организации актина на ведущем крае целлюляризации (Adam *et al.*, 2000). Несмотря на это, отсутствие белка в генеративной линии, которого авторы добились при помощи мозаичных клонов, влияло на целлюляризацию лишь незначительно, однако приводило впоследствии к значительным аномалиям в морфологии эмбриона к началу гастрюляции и к последующей гибели эмбриона (Adam *et al.*, 2000). Такая схема действия белка хорошо согласуется с нашими данными по гибели эмбрионов, продуцируемых самками *nnos-GALA/pnut-RNAi* (**Рис. 12, Табл. 8**).

Гибель эмбрионов на самых ранних стадиях другими авторами показана не была. Это может быть вызвано тем, что в работе (Adam *et al.*, 2000) мозаичные клоны для изучения деплеции белка Pnut получали только в генеративных клетках яичника. Однако 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 ооцита, которая играет ключевую роль в таких процессах как направленный транспорт материнских продуктов, запасаемых для эмбриогенеза, мейоз и отделение полярных телец. Мы полагаем, что первый ранний пик гибели эмбрионов вызван нарушением поляризации ооцита. Косвенным свидетельством в пользу нашего предположения может служить факт, что при деплеции или оверэкспрессии в ооцитах мышей белка SEPT7, гомолога Pnut у млекопитающих, нарушалось построение мейотического веретена и отделение полярных телец, что приводило в итоге к хромосомным аномалиям и ранней гибели (Li *et al.*, 2012).

Единичные особи с ГТФазными и делеционными мутациями Pnut доживали до стадии поздней куколки или имаго, что позволило нам изучить влияние данных мутаций на генеративные ткани взрослых мух. В яичниках мутантов по С-концевому домену практически все яйцевые камеры были короче, чем в норме, и зрелые яйца также имели аномальные дорзальные выросты. При этом нарушений цитокинеза ни в генеративных, ни в соматических клетках, входящих в состав яичника, не наблюдалось. Подобный фенотип был показан для мутантов по *Sep2*, а также в эксперименте по деплеции Pnut за счет получения клонов по генеративной линии (Adam *et al.*, 2000; O'Neill, Clark, 2013). Мы полагаем, что у

мутантов происходят нарушения поляризации яйцеклетки, как и в случае РНК интерференции гена *pnut* в разных типах фолликулярных клетках яичника.

У самок с тройной мутацией *Pnut(G1,G3,G4)* значительное количество фолликулов содержали аномально низкое число питающих клеток – 1-3 вместо 15 в норме. В одной из недавних работ по другому септину дрозофилы *Sep2* был показано, что у гомозигот по мутации *Sep2*, в которой была делетирована часть гена, в яичниках примерно половина фолликулов содержала неправильное число питающих клеток, от 3 до 38, указывая на возможные нарушения цитокинеза (O'Neill, Clark, 2013). Такой фенотип отличается от фенотипа мутантов *Pnut* по ГТФазному домену, поскольку в нашем случае число трофоцитов всегда было меньше 15, но не больше, при этом такие трофоциты были гораздо крупнее, чем полагается. Одной возможной причиной может быть нарушение обволакивания камер фолликулярными клетками. Однако она не так вероятна, поскольку ядра трофоцитов имеют слишком большой размер. Мы считаем, что у мутантов *Pnut(G1,G3,G4)* скорее всего происходят нарушения веретена в предмейотических митозах – а именно, формируется монополярное веретено, что и приводит к фенотипу крупных питающих клеток. Аномалии веретена были обнаружены нами ранее в делениях нервных ганглиев у *pnut^{XP}* мутантов (Ахметова и Федорова, 2011). Подобный фенотип (монополярные веретена в нервных ганглиях в гермариях яичника, яйцевые камеры с количеством трофоцитов меньше 15) также был показан для мутантов по гену *orbit*, продукт которого необходим для правильной поляризации яйцевой камеры (Máthé *et al.*, 2003).

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что *Pnut* не критичен для делений генеративных клеток дрозофилы, однако необходим для соматической составляющей яичников. Обнаруженные нами фенотипы мутантов (отсутствие интерфолликулярных клеток, нарушение полярности яйцевых камер при РНК-интерференции гена, короткие яйца в случае С-концевой делеции, и также крупные питающие клетки у ГТФазного мутанта) указывают на нарушения в процессах установления поляризации яйцеклетки, за которые ответственны фолликулярные клетки. Ранний пик гибели эмбрионов, отложенных самками с РНК интерференцией гена *pnut* тоже, по всей видимости, происходит вследствие дефектов поляризации в ходе оогенеза.

4.7. Участие *Pnut* в сперматогенезе дрозофилы

Запуская РНК-интерференцию гена *pnut* с помощью драйверов *nanos-GAL4*, специфичного к клеткам зародышевого пути, мы обнаружили высокий процент стерильных

самцов. Цитологический анализ сперматогенеза показал, что при снижении уровня экспрессии *pnut* около 60% спермиев были неподвижны. Было также выявлено, что чувствительными к РНК-интерференции гена *pnut* являются генеративные клетки на ранних этапах сперматогенеза, однако эффект пониженной экспрессии данного гена проявлялся позже, уже в ходе спермиогенеза.

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 на различающиеся компартменты. У нокаутных по SEPT4 мышей наблюдалось нарушение или отсутствие аннулуса, нарушение ультраструктурной организации митохондрий, приводящие к неподвижности спермиев и стерильности. Однако в сперматозоидах дрозофилы структуры, подобной аннулусу, не наблюдается. Более того, мы обнаружили, что при подавлении экспрессии *pnut* у дрозофилы ультраструктура митохондрий и аксонемы (основных компонентов, отвечающих за подвижность спермиев) оставалась интактной. Помимо митохондрий и аксонемы, в обеспечении подвижности сперматозоида принимает участие базальное тело. Базальное тело представляет собой модифицированную центриоль. После мейоза каждая гаплоидная сперматиды содержит одно базальное тело с короткой аксонемой. По мере продвижения к ядру, оно ассоциирует с плазматическими микротрубочками (МТ). После ассоциации с мембраной ядра базальное тело служит МТ-организующим центром, участвуя в сборке как аксонемы хвоста сперматозоида, так и перинуклеарных МТ. Правильный докинг и сохранение ассоциации базального тела с ядерной оболочкой критичны для формирования подвижной спермы у дрозофилы. В ходе дифференциации сперматиды, когда базальное тело уже достигло ядра, оно на некоторое время становится окруженным электронно-плотной структурой, называемой *centriolar adjunct* (центриолярный придаток), которая напоминает перичцентриолярный материал центросом. Центриолярный придаток представляет собой очень динамичную структуру, которая по мере удлинения ядра сокращается и принимает форму круглого воротничка, и затем исчезает. Ряд исследований показал, что γ -тубулин локализуется и перераспределяется вокруг базального тела таким же образом, что и центриолярный придаток, так что принято считать, что γ -тубулин является по крайней мере одной из составляющих этой структуры. 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. 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. Дополнительно мы проводили окраску сперматоцитов на γ -тубулин у самцов с РНК-интерференцией *pnut*, и никаких отличий от нормы не нашли. Однако, γ -тубулин играет ключевую роль только на ранних этапах морфогенеза базального тела. По-видимому, Pnut вовлечен в последующие, более поздние этапы биогенеза базального тела. Мы ожидаем, что более тщательный электронно-микроскопический и иммунофлуоресцентный анализ морфологии и структуры базального тела и окружающего его центриолярного придатка помогут прояснить картину.

Интересным фенотипом в случае сперматогенеза обладают мутанты с С-концевой делецией Pnut. Семенники у таких самцов имеют шаро- или грибо-образную форму, напоминая личиночные семенники, и при этом не контактирующие с семенными пузырьками. В литературе есть много сведений о взаимодействии соматических клеток ниши с генеративными клетками, подробно изучено распределение морфогенов и слоев в генитальных дисках, но нет ничего о том, как эти составные части семенника состыкуются в позднем эмбриогенезе или ранней личинке. Скорее всего, для этого нужны клеточные контакты и сигнальные молекулы. Мы полагаем, что в данных процессах могут участвовать белки кадгеринины.

У мутантов по ГТФазному домену Pnut нарушена поляризация цисты. Изначально, циста, состоящая из 64 круглых гаплоидных сперматид, неполяризована. Однако, к ранним стадиям элонгации, кольцевые каналы группируются возле актин-богатых областей кортикальной мембраны на дистальном (растущем) конце элонгирующих сперматид, то есть, происходит поляризация цисты. Микроскопические исследования в реальном времени сперматид, культивируемых *in vitro*, показали, что для правильной своевременной поляризации требуется нормальный уровень фосфолипида фосфатидилинозитол 4,5-дифосфата (PIP2) на плазматической мембране (Fabian *et al.*, 2010). Снижение мембран-связанного PIP2 за счет экспрессии белка SigD, являющегося фосфатазой PIP2, приводило к сильным дефектам поляризации цист. Большинство септинов содержат многоосновный участок на N-конце, служащий для взаимодействия с фосфолипидами мембран (Casamayor, Snyder, 2003). Также, было показано, что септиновый комплекс человека SEPT2-SEPT6-SEPT7 был способен модифицировать морфологию гигантских липосом, содержащих фосфоинозитиды (Tanaka-Takiguchi *et al.*, 2009). Поэтому, возможно, что Pnut участвует в поляризации цист в сперматогенезе за счет модификации уровня фосфолипидов.

Таким образом, показано участие Pnut в спермиогенезе - заключительных этапах сперматогенеза, на которых происходит изменение морфологии сперматоцитов. Характерным фенотипом мутантов по Pnut является стерильность, вызванная неподвижностью спермы. На основе данных по электронной микроскопии мы полагаем, что у мутантов нарушено функционирование базального тела. Другие аномалии сперматогенеза, обнаруженные у мутантов по консервативным доменам Pnut указывают на многофункциональность белка в процессах сперматогенеза, в частности, его участие в клеточном сигналинге, а также в поляризации цист.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Септины изначально были открыты как белки, участвующие в цитокинезе. Анализ делений соматических клеток у гомозигот по нуль-аллелю *pnut* показал, что у мутантов встречаются не только нарушения цитокинеза, но и аномалии прикрепления хромосом к веретену, нерасхождение центросом, а также хромосомные мосты, что ранее показано не было.

Чтобы выяснить влияние Pnut на процессы сперматогенеза и оогенеза дрозофилы, нами была получена плазмидная конструкция *pUASP-W-pnut_RNAi* для проведения РНК-интерференции гена *pnut*, которая позволяет эктопически подавлять экспрессию гена в клетках соматической и зародышевой линии, и получены соответствующие трансгенные линии дрозофилы. При запуске РНК-интерференции гена *pnut* в генеративных клетках нами был обнаружен высокий процент (60%) стерильных самцов с неподвижной спермой. При этом нарушений делений генеративных клеток обнаружено не было. Следовательно, для продуцирования нормальных сперматозоидов данный белок важен для функционирования соматической составляющей гонад, и/или он действует в генеративных клетках на поздних стадиях сперматогенеза. При запуске РНК-интерференции гена *pnut* в генеративных клетках яичников никаких аномалий оогенеза не наблюдалось, что свидетельствует о незначительности роли данного гена в функционировании женских генеративных клеток у дрозофилы. Снижение уровня экспрессии *pnut* в соматических фолликулярных клетках яичников приводило к нарушению поляризации ооцита, аномальному цитокинезу в клетках хориона и нарушению конденсации хроматина в фолликулярных клетках. Мы полагаем, что белок Pnut участвует в реорганизации цитоскелета в ходе поляризации яйцевых камер.

Аномалии делений соматических клеток, а также многообразие дефектов оогенеза и сперматогенеза при снижении экспрессии *pnut* в гонадах указывают на плейотропность 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 показали, что как ГТФазный, так и С-концевой консервативные домены септина Pnut дрозофилы важны для выживания до стадии имаго. Эти мутации нарушали либо формирование септинового комплекса (делеции С-конца), либо филаментообразование (ГТФазные мутанты) *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 Ogsb 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 плаزمида *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 нуль-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 ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Ахметова К.А., Федорова С.А. Влияние мутаций в гене *peanut* на деление соматических и генеративных клеток *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2011. - Т. 15. - № 4. - С. 653-660.
- 2) Лебедева Л.И., Трунова С.А., Омелянчук Л.В. Генетический контроль митоза. Адаптивные модификации проявления мутации *v158* // Генетика. - 2000. - Т. 36. - № 10. - С. 1348-1354.
- 3) Лебедева, Л.И., Трунова, С.А., Федорова, С.А., Омелянчук, Л.В. Генетический контроль митоза. Особенности расхождения сестринских наборов хроматид в анафазе у мутантной линии *aar^{v158} Drosophila melanogaster* // Генетика. - 2003. - Т. 39. - № 7. - С. 1-9.
- 4) Шилова И.Э., Омелянчук Л.В. Метод трансформации клеток зародышевого пути дрозофилы высококонцентрированной экзогенной ДНК // Генетика. - 2007. - Т. 43. - № 1. - С. 96–99.
- 5) Adam J.C., Pringle J.R., Peifer M. Evidence for functional differentiation among *Drosophila* septins in cytokinesis and cellularization. // *Mol. Biol. Cell.* - 2000. - Vol. 11. - N. August. - P. 3123–3135.
- 6) Afshar K., Stuart B., Wasserman S.A. Functional analysis of the *Drosophila* diaphanous FH protein in early embryonic development. // *Development.* - 2000. - Vol. 127. - N. 9. - P. 1887–97.
- 7) Akhmetova K., Balasov M., Huijbregts R.P.H., Chesnokov I. Functional insight into the role of Orc6 in septin complex filament formation in *Drosophila*. // *Mol. Biol. Cell.* - 2015. - Vol. 26. - N. 1. - P. 15–28.
- 8) Almeida Marques I. de, Valadares N.F., Garcia W., Damalio J.C.P., Macedo J.N.A., Araújo A.P.U. de, Botello C.A., Andreu J.M., Garratt R.C. Septin C-Terminal Domain Interactions: Implications for Filament Stability and Assembly // *Cell Biochem. Biophys.* - 2012. - Vol. 62. - P. 317–328.
- 9) Bae Y.J., Kang S.J., Park K.S. *Drosophila melanogaster* Parkin ubiquitinates peanut and septin1 as an E3 ubiquitin-protein ligase // *Insect Biochem. Mol. Biol.* - 2007. - Vol. 37. - P. 430–439.
- 10) Beites C.L., Xie H., Bowser R., Trimble W.S. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. // *Nat. Neurosci.* - 1999. - Vol. 2. - N. 5. - P. 434–9.

- 11) Berbari N.F., O'Connor A.K., Haycraft C.J., Yoder B.K. The primary cilium as a complex signaling center. // *Curr. Biol.* - 2009. - Vol. 19. - N. 13. - P. R526–35.
- 12) Bertin A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2008. - Vol. 105. - N. 24. - P. 8274–8279.
- 13) Bleichert F., Balasov M., Chesnokov I., Nogales E., Botchan M.R., Berger J.M. A Meier-Gorlin syndrome mutation in a conserved C-terminal helix of Orc6 impedes origin recognition complex formation. // *Elife.* - 2013. - Vol. 2. - P. e00882.
- 14) Bonaccorsi S., Giansanti M.G., Gatti M. Spindle assembly in *Drosophila* neuroblasts and ganglion mother cells. // *Nat. Cell Biol.* - 2000. - Vol. 2. - N. 1. - P. 54–6.
- 15) Bowen J.R., Hwang D., Bai X., Roy D., Spiliotis E.T. Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia // *J. Cell Biol.* - 2011. - Vol. 194. - N. 2. - P. 187–197.
- 16) Bowne-Anderson H., Zanic M., Kauer M., Howard J. Microtubule dynamic instability: a new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. // *Bioessays.* - 2013. - Vol. 35. - N. 5. - P. 452–61.
- 17) Byers B., Goetsch L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. // *J. Cell Biol.* - 1976. - Vol. 69. - N. 3. - P. 717–21.
- 18) Cao L., Ding X., Yu W., Yang X., Shen S., Yu L. Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan // *FEBS Lett.* - 2007. - Vol. 581. - P. 5526–5532.
- 19) Casamayor A., Snyder M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function // *Mol. Cell. Biol.* - 2003. - Vol. 23. - N. 8. - P. 2762–2777.
- 20) Cau J., Hall A. Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. // *J. Cell Sci.* - 2005. - Vol. 118. - N. Pt 12. - P. 2579–87.
- 21) Chesnokov I., Remus D., Botchan M. Functional analysis of mutant and wild-type *Drosophila* origin recognition complex. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2001. - Vol. 98. - N. 21. - P. 11997–2002.
- 22) Chesnokov I.N., Chesnokova O.N., Botchan M. A cytokinetic function of *Drosophila* ORC6 protein resides in a domain distinct from its replication activity. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2003. - Vol. 100. - P. 9150–9155.

- 23) Cho S.-J., Lee H., Dutta S., Song J., Walikonis R., Moon I.S. Septin 6 regulates the cytoarchitecture of neurons through localization at dendritic branch points and bases of protrusions. // *Mol. Cells.* - 2011. - Vol. 32. - N. 1. - P. 89–98.
- 24) Connolly D., Abdesselam I., Verdier-Pinard P., Montagna C. Septin roles in tumorigenesis. // *Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 392. - N. 8-9. - P. 725–38.
- 25) Cuevas M. de, Spradling A.C. Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. // *Development.* - 1998. - Vol. 125. - N. 15. - P. 2781–9.
- 26) D'Avino P.P. How to scaffold the contractile ring for a safe cytokinesis - lessons from Anillin-related proteins. // *J. Cell Sci.* - 2009. - Vol. 122. - N. Pt 8. - P. 1071–9.
- 27) Dekker C. et al. The interaction network of the chaperonin CCT. // *EMBO J.* - 2008. - Vol. 27. - N. 13. - P. 1827–39.
- 28) DeMay B.S., Bai X., Howard L., Occhipinti P., Meseroll R. a., Spiliotis E.T., Oldenbourg R., Gladfelter A.S. Septin filaments exhibit a dynamic, paired organization that is conserved from yeast to mammals // *J. Cell Biol.* - 2011. - Vol. 193. - N. 6. - P. 1065–1081.
- 29) Dent E.W., Merriam E.B., Hu X. The dynamic cytoskeleton: backbone of dendritic spine plasticity. // *Curr. Opin. Neurobiol.* - 2011. - Vol. 21. - N. 1. - P. 175–81.
- 30) Dobbelaere J., Barral Y. Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. // *Science.* - 2004. - Vol. 305. - N. 5682. - P. 393–6.
- 31) Dolat L., Hu Q., Spiliotis E.T. Septin functions in organ system physiology and pathology // *Biol. Chem.* - 2014. - Vol. 395. - N. 2. - P. 123–141.
- 32) Douglas L.M., Alvarez F.J., McCreary C., Konopka J.B. Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi. // *Eukaryot. Cell.* - 2005. - Vol. 4. - N. 9. - P. 1503–12.
- 33) Dutta A., Bell S.P. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* - 1997. - Vol. 13. - P. 293–332.
- 34) Ewers H., Tada T., Petersen J.D., Racz B., Sheng M., Choquet D. A Septin-Dependent Diffusion Barrier at Dendritic Spine Necks. // *PLoS One.* - 2014. - Vol. 9. - N. 12. - P. e113916.
- 35) Fabian L. Wei H.C., Rollins J., Noguchi T., Blankenship J.T., Bellamkonda K., Polevoy G., Gervais L., Guichet A., Fuller M.T, Brill J.A. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate directs spermatid cell polarity and exocyst localization in *Drosophila*. // *Mol. Biol. Cell.* - 2010. - Vol. 21. - N. 9. - P. 1546–55.
- 36) Fares H., Peifer M., Pringle J.R. Localization and possible functions of *Drosophila* septins. // *Mol. Biol. Cell.* - 1995. - Vol. 6. - N. December. - P. 1843–1859.

- 37) Farkasovsky M., Herter P., Voss B., Wittinghofer A. Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. // *Biol. Chem.* - 2005. - Vol. 386. - N. 7. - P. 643–56.
- 38) Field C.M., Al-Awar O., Rosenblatt J., Wong M.L., Alberts B., Mitchison T.J. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. // *J. Cell Biol.* - 1996. - Vol. 133. - N. 3. - P. 605–16.
- 39) Field C.M., Coughlin M., Doberstein S., Marty T., Sullivan W. Characterization of anillin mutants reveals essential roles in septin localization and plasma membrane integrity. // *Development.* - 2005. - Vol. 132. - P. 2849–2860.
- 40) Finger F.P., Kopish K.R., White J.G. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. // *Dev. Biol.* - 2003. - Vol. 261. - N. 1. - P. 220–34.
- 41) Foe V.E. Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. // *Development.* - 1989. - Vol. 107. - N. 1. - P. 1–22.
- 42) Ford S.K., Pringle J.R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC11 gene product and the timing of events at the budding site. // *Dev. Genet.* - 1991. - Vol. 12. - N. 4. - P. 281–92.
- 43) Frazier J.A., Wong M.L., Longtine M.S., Pringle J.R., Mann M., Mitchison T.J., Field C. Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. // *J. Cell Biol.* - 1998. - Vol. 143. - N. 3. - P. 737–49.
- 44) Garcia G., Bertin A., Li Z., Song Y., McMurray M. a., Thorner J., Nogales E. Subunit-dependent modulation of septin assembly: Budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation // *J. Cell Biol.* - 2011. - Vol. 195. - P. 993–1004.
- 45) Garcia W., Araújo A.P.U. de, Lara F., Foguel D., Tanaka M., Tanaka T., Garratt R.C. An intermediate structure in the thermal unfolding of the GTPase domain of human septin 4 (SEPT4/Bradeion-beta) forms amyloid-like filaments in vitro. // *Biochemistry.* - 2007. - Vol. 46. - N. 39. - P. 11101–9.
- 46) Giansanti M.G., Farkas R.M., Bonaccorsi S., Lindsley D.L., Wakimoto B.T., Fuller M.T., Gatti M. Genetic dissection of meiotic cytokinesis in *Drosophila* males. // *Mol. Biol. Cell.* - 2004. - Vol. 15. - N. 5. - P. 2509–22.
- 47) Gilden J.K., Peck S., Chen Y.C.M., Krummel M.F. The septin cytoskeleton facilitates membrane retraction during motility and blebbing // *J. Cell Biol.* - 2012. - Vol. 196. - N. 1. - P. 103–114.

- 48) Gladfelter A.S., Pringle J.R., Lew D.J. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2001. - Vol. 4. - N. 6. - P. 681–9.
- 49) Glotzer M. Cytokinesis. // *Curr. Biol.* - 1997. - Vol. 7. - N. 5. - P. R274–6.
- 50) Goldbach P., Wong R., Beise N., Sarpal R., Trimble W.S., Brill J.A. Stabilization of the actomyosin ring enables spermatocyte cytokinesis in *Drosophila*. // *Mol. Biol. Cell.* - 2010. - Vol. 21. - N. 9. - P. 1482–93.
- 51) Gomes E.R., Jani S., Gundersen G.G. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. // *Cell.* - 2005. - Vol. 121. - N. 3. - P. 451–63.
- 52) Gottfried Y., Rotem A., Lotan R., Steller H., Larisch S. The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP. // *EMBO J.* - 2004. - Vol. 23. - N. 7. - P. 1627–35.
- 53) Grammont M., Irvine K.D. Organizer activity of the polar cells during *Drosophila* oogenesis. // *Development.* - 2002. - Vol. 129. - N. 22. - P. 5131–40.
- 54) Guertin D.A., Trautmann S., McCollum D. Cytokinesis in eukaryotes. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2002. - Vol. 66. - N. 2. - P. 155–78.
- 55) Haarer B.K., Pringle J.R. Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. // *Mol. Cell. Biol.* - 1987. - Vol. 7. - N. 10. - P. 3678–87.
- 56) Hagiwara A., Tanaka Y., Hikawa R., Morone N., Kusumi A., Kimura H., Kinoshita M. Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton // *Cytoskeleton.* - 2011. - Vol. 68. - N. September. - P. 512–525.
- 57) Hartsock A., Nelson W.J. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2008. - Vol. 1778. - N. 3. - P. 660–9.
- 58) Hartwell L.H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. // *Exp. Cell Res.* - 1971. - Vol. 69. - N. 2. - P. 265–76.
- 59) Hernández-Rodríguez Y., Momany M. Posttranslational modifications and assembly of septin heteropolymers and higher-order structures // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2012. - Vol. 15. - P. 660–668.
- 60) Hime G.R., Brill J.A., Fuller M.T. Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. // *J. Cell Sci.* - 1996. - Vol. 109 (Pt 1. - P. 2779–2788.

- 61) Hu H., Yu W., Li S., Ding X., Yu L., Bi R.-C. Crystallization and preliminary crystallographic studies of human septin 1 with site-directed mutations. // *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* - 2006. - Vol. 62. - N. Pt 2. - P. 128–32.
- 62) Hu J. et al. Septin-driven coordination of actin and microtubule remodeling regulates the collateral branching of axons. // *Curr. Biol.* - 2012. - Vol. 22. - N. 12. - P. 1109–15.
- 63) Hu Q., Milenkovic L., Jin H., Scott M.P., Nachury M. V, Spiliotis E.T., Nelson W.J. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. // *Science.* - 2010. - Vol. 329. - N. 5990. - P. 436–9.
- 64) Hu Q., Nelson W.J., Spiliotis E.T. Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. // *J. Biol. Chem.* - 2008. - Vol. 283. - N. 43. - P. 29563–71.
- 65) Huang Y.-W., Surka M.C., Reynaud D., Pace-Asciak C., Trimble W.S. GTP binding and hydrolysis kinetics of human septin 2. // *FEBS J.* - 2006. - Vol. 273. - N. 14. - P. 3248–60.
- 66) Huijbregts R.P.H., Svitin A., Stinnett M.W., Renfrow M.B., Chesnokov I. Drosophila Orc6 facilitates GTPase activity and filament formation of the septin complex. // *Mol. Biol. Cell.* - 2009. - Vol. 20. - N. 1. - P. 270–81.
- 67) Ji Y., Rath U., Girton J., Johansen K.M., Johansen J. D-hillarlin, a novel W180-domain protein, affects cytokinesis through interaction with the septin family member Pnut // *J. Neurobiol.* - 2005. - Vol. 64. - P. 157–169.
- 68) Joberty G., Perlungher R.R., Sheffield P.J., Kinoshita M., Noda M., Haystead T., Macara I.G. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. // *Nat. Cell Biol.* - 2001. - Vol. 3. - N. October. - P. 861–866.
- 69) John C.M. et al. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. // *EMBO J.* - 2007. - Vol. 26. - N. 14. - P. 3296–307.
- 70) Joo E., Surka M.C., Trimble W.S. Mammalian SEPT2 is required for scaffolding nonmuscle myosin II and its kinases. // *Dev. Cell.* - 2007. - Vol. 13. - N. 5. - P. 677–90.
- 71) Joo E., Tsang C.W., Trimble W.S. Septins: traffic control at the cytokinesis intersection. // *Traffic.* - 2005. - Vol. 6. - N. 8. - P. 626–34.
- 72) Kim H.B., Haarer B.K., Pringle J.R. Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. // *J. Cell Biol.* - 1991. - Vol. 112. - N. 4. - P. 535–44.
- 73) Kim M.S., Froese C.D., Estey M.P., Trimble W.S. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. // *J. Cell Biol.* - 2011. - Vol. 195. - N. 5. - P. 815–26.

- 74) Kim S.K. et al. Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis. // *Science*. - 2010. - Vol. 329. - N. 5997. - P. 1337–40.
- 75) Kinoshita M. The septins. // *Genome Biol.* - 2003. - Vol. 4. - P. 236.
- 76) Kinoshita M. Diversity of septin scaffolds. // *Curr. Opin. Cell Biol.* - 2006. - Vol. 18. - N. 1. - P. 54–60.
- 77) Kinoshita M., Field C.M., Coughlin M.L., Straight A.F., Mitchison T.J. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins // *Dev. Cell.* - 2002. - Vol. 3. - P. 791–802.
- 78) Kinoshita M., Kumar S., Mizoguchi A., Ide C., Kinoshita A., Haraguchi T., Hiraoka Y., Noda M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. // *Genes Dev.* - 1997. - Vol. 11. - N. 12. - P. 1535–47.
- 79) Kinoshita M., Noda M. Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. // *Cell Struct. Funct.* - 2001. - Vol. 26. - P. 667–670.
- 80) Kissel H., Georgescu M.M., Larisch S., Manova K., Hunnicutt G.R., Steller H. The Sept4 septin locus is required for sperm terminal differentiation in mice // *Dev. Cell.* - 2005. - Vol. 8. - P. 353–364.
- 81) Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. // *Nature*. - 1998. - Vol. 392. - N. 6676. - P. 605–8.
- 82) Kremer B.E., Haystead T., Macara I.G. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. // *Mol. Biol. Cell.* - 2005. - Vol. 16. - N. 10. - P. 4648–59.
- 83) Kudryashov D.S., Reisler E. ATP and ADP actin states. // *Biopolymers*. - 2013. - Vol. 99. - N. 4. - P. 245–56.
- 84) Kuo Y.C. et al. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus // *Hum. Mutat.* - 2012. - Vol. 33. - P. 710–719.
- 85) Kwitny S., Klaus A. V, Hunnicutt G.R. The annulus of the mouse sperm tail is required to establish a membrane diffusion barrier that is engaged during the late steps of spermiogenesis. // *Biol. Reprod.* - 2010. - Vol. 82. - N. December 2009. - P. 669–678.
- 86) Lee Y.S., Carthew R.W. Making a better RNAi vector for *Drosophila*: Use of intron spacers // *Methods*. - 2003. - Vol. 30. - P. 322–329.
- 87) Leipe D.D., Wolf Y.I., Koonin E. V, Aravind L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. // *J. Mol. Biol.* - 2002. - Vol. 317. - N. 1. - P. 41–72.

- 88) Lhuillier P., Rode B., Escalier D., Lorès P., Dirami T., Bienvenu T., Gacon G., Dulioust E., Touré a. Absence of annulus in human asthenozoospermia: Case Report // *Hum. Reprod.* - 2009. - Vol. 24. - N. 6. - P. 1296–1303.
- 89) Li S., Ou X.H., Wei L., Wang Z.B., Zhang Q.H., Ouyang Y.C., Hou Y., Schatten H., Sun Q.Y. Septin 7 is required for orderly meiosis in mouse oocytes // *Cell Cycle.* - 2012. - Vol. 11. - P. 3211–3218.
- 90) Li X., Serwanski D.R., Miralles C.P., Nagata K., Blas A.L. De. Septin 11 is present in GABAergic synapses and plays a functional role in the cytoarchitecture of neurons and GABAergic synaptic connectivity. // *J. Biol. Chem.* - 2009. - Vol. 284. - N. 25. - P. 17253–65.
- 91) Lighthouse D. V, Buszczak M., Spradling A.C. New components of the *Drosophila* fusome suggest it plays novel roles in signaling and transport. // *Dev. Biol.* - 2008. - Vol. 317. - N. 1. - P. 59–71.
- 92) Lin H., Yue L., Spradling A.C. The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. // *Development.* - 1994. - Vol. 120. - N. 4. - P. 947–56.
- 93) Lin Y.-H. et al. The expression level of septin12 is critical for spermiogenesis. // *Am. J. Pathol.* - 2009. - Vol. 174. - N. 5. - P. 1857–68.
- 94) Macedo J.N.A., Valadares N.F., Marques I.A., Ferreira F.M., Damalio J.C.P., Pereira H.M., Garratt R.C., Araujo A.P.U. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. // *Biochem. J.* - 2013. - Vol. 450. - N. 1. - P. 95–105.
- 95) Máthé E., Inoue Y.H., Palframan W., Brown G., Glover D.M. Orbit/Mast, the CLASP orthologue of *Drosophila*, is required for asymmetric stem cell and cystocyte divisions and development of the polarised microtubule network that interconnects oocyte and nurse cells during oogenesis. // *Development.* - 2003. - Vol. 130. - N. 5. - P. 901–15.
- 96) Mavrakakis M. et al. Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles // *Nat. Cell Biol.* - 2014. - Vol. 16. - N. January. - P. 322–334.
- 97) McMurray M.A., Bertin A., Garcia G., Lam L., Nogales E., Thorner J. Septin filament formation is essential in budding yeast. // *Dev. Cell.* - 2011. - Vol. 20. - N. 4. - P. 540–9.
- 98) Menon M.B. et al. Genetic deletion of SEPT7 reveals a cell type-specific role of septins in microtubule destabilization for the completion of cytokinesis. // *PLoS Genet.* - 2014. - Vol. 10. - N. 8. - P. e1004558.

- 99) Miyakawa H., Miyamoto T., Koh E., Tsujimura A., Miyagawa Y., Saijo Y., Namiki M., Sengoku K. Single-nucleotide polymorphisms in the SEPTIN12 gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with Sertoli cell-only syndrome. // *J. Androl.* - 2012. - Vol. 33. - N. 3. - P. 483–7.
- 100) Monzo K., Dowd S.R., Minden J.S., Sisson J.C. Proteomic analysis reveals CCT is a target of Fragile X mental retardation protein regulation in *Drosophila*. // *Dev. Biol.* - 2010. - Vol. 340. - N. 2. - P. 408–18.
- 101) Mostowy S., Cossart P. Autophagy and the cytoskeleton: new links revealed by intracellular pathogens. // *Autophagy.* - 2011. - Vol. 7. - N. 7. - P. 780–2.
- 102) Mostowy S., Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2012. - Vol. 13. - N. 3. - P. 183–194.
- 103) Muñoz-Soriano V., Nieto-Arellano R., Paricio N. Septin 4, the *drosophila* ortholog of human CDCrel-1, accumulates in parkin mutant brains and is functionally related to the Nedd4 E3 ubiquitin ligase. // *J. Mol. Neurosci.* - 2012. - Vol. 48. - N. 1. - P. 136–43.
- 104) Muñoz-Soriano V., Paricio N. Overexpression of Septin 4, the *Drosophila* homologue of human CDCrel-1, is toxic for dopaminergic neurons // *Eur. J. Neurosci.* - 2007. - Vol. 26. - N. August. - P. 3150–3158.
- 105) Nagata K.-I. et al. Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. // *J. Biol. Chem.* - 2003. - Vol. 278. - N. 20. - P. 18538–43.
- 106) Neufeld T.P., Rubin G.M. The *drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins // *Cell.* - 1994. - Vol. 77. - P. 371–379.
- 107) O'Neill R.S., Clark D. V. The *Drosophila melanogaster* septin gene Sep2 has a redundant function with the retrogene Sep5 in imaginal cell proliferation but is essential for oogenesis. // *Genome.* - 2013. - Vol. 56. - N. November. - P. 753–8.
- 108) Oegema K., Savoian M.S., Mitchison T.J., Field C.M. Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. // *J. Cell Biol.* - 2000. - Vol. 150. - N. 3. - P. 539–52.
- 109) Pan F., Malmberg R.L., Momany M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. // *BMC Evol. Biol.* - 2007. - Vol. 7. - P. 103.
- 110) Prasanth S.G., Prasanth K. V, Stillman B. Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. // *Science.* - 2002. - Vol. 297. - N. 5583. - P. 1026–31.

- 111) Riparbelli M.G., Callaini G., Glover D.M., Avides M. do C. A requirement for the Abnormal Spindle protein to organise microtubules of the central spindle for cytokinesis in *Drosophila*. // *J. Cell Sci.* - 2002. - Vol. 115. - N. Pt 5. - P. 913–22.
- 112) Robertson C., Church S.W., Nagar H.A., Price J., Hall P.A., Russell S.E.H. Properties of SEPT9 isoforms and the requirement for GTP binding. // *J. Pathol.* - 2004. - Vol. 203. - N. 1. - P. 519–27.
- 113) Rodal A.A., Kozubowski L., Goode B.L., Drubin D.G., Hartwig J.H. Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex. // *Mol. Biol. Cell.* - 2005. - Vol. 16. - N. 1. - P. 372–84.
- 114) Ryu J., Liu L., Wong T.P., Wu D.C., Burette A., Weinberg R., Wang Y.T., Sheng M. A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function. // *Neuron.* - 2006. - Vol. 49. - N. 2. - P. 175–82.
- 115) Saarikangas J., Barral Y. The emerging functions of septins in metazoans // *EMBO Rep.* - 2011. - Vol. 12. - N. 11. - P. 1118–1126.
- 116) Sadian Y., Gatsogiannis C., Patasi C., Hofnagel O., Goody R.S., Farkasovský M., Raunser S. The role of Cdc42 and Gic1 in the regulation of septin filament formation and dissociation. // *Elife.* - 2013. - Vol. 2. - P. e01085.
- 117) Sandrock K., Bartsch I., Bläser S., Busse A., Busse E., Zieger B. Characterization of human septin interactions. // *Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 392. - N. 8-9. - P. 751–61.
- 118) Schmidt K., Nichols B.J. Functional interdependence between septin and actin cytoskeleton. // *BMC Cell Biol.* - 2004. - Vol. 5. - P. 43.
- 119) Schnorr J.D., Holdcraft R., Chevalier B., Berg C. a. Ras1 interacts with multiple new signaling and cytoskeletal loci in *Drosophila* eggshell patterning and morphogenesis // *Genetics.* - 2001. - Vol. 159. - P. 609–622.
- 120) Sellin M.E., Sandblad L., Stenmark S., Gullberg M. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. // *Mol. Biol. Cell.* - 2011. - Vol. 22. - P. 3152–3164.
- 121) Sellin M.E., Stenmark S., Gullberg M. Mammalian SEPT9 isoforms direct microtubule-dependent arrangements of septin core heteromers // *Mol. Biol. Cell.* - 2012. - Vol. 23. - P. 4242–4255.
- 122) Shankar J., Messenberg A., Chan J., Underhill T.M., Foster L.J., Nabi I.R. Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells. // *Cancer Res.* - 2010. - Vol. 70. - N. 9. - P. 3780–90.

- 123) Shinoda T., Ito H., Sudo K., Iwamoto I., Morishita R., Nagata K. Septin 14 is involved in cortical neuronal migration via interaction with Septin 4. // *Mol. Biol. Cell.* - 2010. - Vol. 21. - N. 8. - P. 1324–34.
- 124) Silverman-Gavrila R. V, Hales K.G., Wilde A. Anillin-mediated targeting of peanut to pseudocleavage furrows is regulated by the GTPase Ran. // *Mol. Biol. Cell.* - 2008. - Vol. 19. - N. 9. - P. 3735–44.
- 125) Sirajuddin M., Farkasovsky M., Hauer F., Kühlmann D., Macara I.G., Weyand M., Stark H., Wittinghofer A. Structural insight into filament formation by mammalian septins. // *Nature.* - 2007. - Vol. 449. - N. September. - P. 311–315.
- 126) Sirajuddin M., Farkasovsky M., Zent E., Wittinghofer A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2009. - Vol. 106. - N. 39. - P. 16592–16597.
- 127) Somma M.P., Fasulo B., Cenci G., Cundari E., Gatti M. Molecular dissection of cytokinesis by RNA interference in *Drosophila* cultured cells. // *Mol. Biol. Cell.* - 2002. - Vol. 13. - N. 7. - P. 2448–60.
- 128) Spiliotis E.T. Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases // *Cytoskeleton.* - 2010. - Vol. 67. - N. June. - P. 339–345.
- 129) Surka M.C., Tsang C.W., Trimble W.S. The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis. // *Mol. Biol. Cell.* - 2002. - Vol. 13. - N. 10. - P. 3532–45.
- 130) Tada T., Simonetta A., Batteredton M., Kinoshita M., Edbauer D., Sheng M. Role of Septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. // *Curr. Biol.* - 2007. - Vol. 17. - N. 20. - P. 1752–8.
- 131) Takizawa P.A., DeRisi J.L., Wilhelm J.E., Vale R.D. Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. // *Science.* - 2000. - Vol. 290. - N. 5490. - P. 341–4.
- 132) Tanaka-Takiguchi Y., Kinoshita M., Takiguchi K. Septin-Mediated Uniform Bracing of Phospholipid Membranes // *Curr. Biol.* - 2009. - Vol. 19. - N. 2. - P. 140–145.
- 133) Tooley A.J., Gilden J., Jacobelli J., Beemiller P., Trimble W.S., Kinoshita M., Krummel M.F. Amoeboid T lymphocytes require the septin cytoskeleton for cortical integrity and persistent motility. // *Nat. Cell Biol.* - 2009. - Vol. 11. - N. 1. - P. 17–26.

- 134) Torres I.L., López-Schier H., St Johnston D. A Notch/Delta-dependent relay mechanism establishes anterior-posterior polarity in *Drosophila*. // *Dev. Cell.* - 2003. - Vol. 5. - N. 4. - P. 547–58.
- 135) Versele M., Thorner J. Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4 // *J. Cell Biol.* - 2004. - Vol. 164. - P. 701–715.
- 136) Vrabioiu A.M., Gerber S. a., Gygi S.P., Field C.M., Mitchison T.J. The Majority of the *Saccharomyces cerevisiae* Septin Complexes Do Not Exchange Guanine Nucleotides // *J. Biol. Chem.* - 2004. - Vol. 279. - N. 4. - P. 3111–3118.
- 137) Weirich C.S., Erzberger J.P., Barral Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2008. - Vol. 9. - N. June. - P. 478–489.
- 138) Xie Y., Vessey J.P., Konecna A., Dahm R., Macchi P., Kiebler M.A. The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. // *Curr. Biol.* - 2007. - Vol. 17. - N. 20. - P. 1746–51.
- 139) Zent E., Vetter I., Wittinghofer A. Structural and biochemical properties of Sept7, a unique septin required for filament formation // *Biol. Chem.* - 2011. - Vol. 392. - P. 791–797.
- 140) Zent E., Wittinghofer A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle // *Biol. Chem.* - 2014. - Vol. 395. - P. 169–180.
- 141) Zhang J., Kong C., Xie H., McPherson P.S., Grinstein S., Trimble W.S. Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. // *Curr. Biol.* - 1999. - Vol. 9. - N. 24. - P. 1458–67.
- 142) Zhang Y., Gao J., Chung K.K., Huang H., Dawson V.L., Dawson T.M. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2000. - Vol. 97. - N. 24. - P. 13354–9.
- 143) Zhu M. et al. Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization // *J. Biol. Chem.* - 2008. - Vol. 283. - N. 8. - P. 18916–18925.