

На правах рукописи



Галимова Юлия Александровна

**РОЛЬ E3 УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ NYD В КЛЕТКАХ ЗАРОДЫШЕВОЙ  
ЛИНИИ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Новосибирск 2022**

Работа выполнена в лаборатории клеточного деления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Федорова Светлана Александровна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая Сектором генетики клеточного цикла, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Мамон Людмила Андреевна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, профессор, Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург

**Щербаков Дмитрий Юрьевич**, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией геносистематики, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита состоится: 8 июня 2022 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49, e-mail: [ovant@mcb.nsc.ru](mailto:ovant@mcb.nsc.ru) С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН [https://www.mcb.nsc.ru/diss\\_council/autoref](https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



О.В. Антоненко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Регулируемая деградация белков является одним из ключевых механизмов поддержания протеостаза в клетке. Вместе с системами, контролирующими синтез и укладку белка, регулируемая деградация позволяет избежать накопления неправильно свернутых или дефектных белков, а также является механизмом контроля количества функциональных белков, регулируя тем самым различные клеточные процессы: клеточный цикл, передачу сигнала, реакцию на повреждение ДНК, метаболизм, контроль транскрипции и апоптоз. Убиквитин-протеасомная система, или UPS (Ubiquitin – Proteasome System), является частью регулируемой деградации белка и отвечает за протеолиз короткоживущих, неправильно свернутых или поврежденных одиночных белков. Основой функционирования этой системы является реакция убиквитинирования, которая представляет собой ковалентное присоединение молекул убиквитина к белку-субстрату, что является сигналом для последующего расщепления белка протеасомой.

В системе UPS E3 убиквитин-лигазы отвечают за специфичность выбора субстрата, к которому ковалентно присоединяют убиквитин. В последние годы возрос интерес к изучению E3 убиквитин-лигаз в качестве потенциальных мишеней для терапии многих болезней, включая рак. Одним из интересных представителей семейства E3 убиквитин-лигаз является НЕСТ-убиквитин-лигаза UBR5, известная также как EDD (E3 identified by Differential Display). Изначально *UBR5* был идентифицирован в клетках рака молочной железы при скрининге генов, регулируемых прогестинном [Callaghan *et. al.*, 1998]. В дальнейшем оказалось, что амплификация *UBR5* характерна для многих видов рака [Clancy *et. al.*, 2003], но механизм, посредством которого этот белок вносит вклад в инициацию и прогрессию опухолей, остается невыясненным.

Белок UBR5 имеет близкого ортолога у дрозофилы – белок *Hyd* (Hyperplastic discs). В первых работах было показано, что в процессе развития дрозофилы *hyd* играет роль в контроле пролиферации соматических клеток, и на этом основании его отнесли к супрессорам опухолевого роста [Martin *et. al.*, 1977; Mansfield *et al.*, 1994].

Изучение мутаций гена *hyd* в соматических тканях дрозофилы выявило интересную особенность этого онкосупрессора. Оказалось, что при сильных мутациях мухи умирают на личиночной стадии или на ранней стадии куколки, а имагинальные диски меньше по размеру или отсутствуют совсем. При слабых мутациях, наоборот, чаще встречаются разросшиеся диски, а особи доживают до поздних стадий куколки или до взрослого состояния. Причем в

одной личинке могут встречаться как разросшиеся, так и редуцированные диски [Mansfield *et al.*, 1994]. Функции Hyd в зародышевой ткани практически не изучены. В единственной работе на эту тему было показано, что в гене *hyd* приводят к аномалиям развития зародышевых тканей и стерильности [Mansfield *et al.*, 1994].

Исследования показали, что Hyd, за счет своих протеолитических и регуляторных функций, вовлечен в различные сигнальные пути, контролирующие рост и развитие. Но в каких именно процессах развития клеток зародышевой линии задействован *hyd*, остается неизвестным.

### **Цель и задачи исследования**

Целью данной работы было выявить роль E3 убиквитин-лигазы Hyd в клетках зародышевой линии *Drosophila melanogaster*. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать молекулярную природу мутаций аллелей *hyd*<sup>15</sup> и *hyd*<sup>C017</sup>.
2. Исследовать влияние мутаций *hyd*<sup>15</sup>, *hyd*<sup>C017</sup> на деление и морфогенез клеток зародышевого пути в сперматогенезе и оогенезе *D.melanogaster*.
3. При помощи РНК-интерференции провести эктопическое подавление экспрессии гена *hyd* в соматических и зародышевых клетках семенников и яичников на разных стадиях гонадогенеза, выявить ткани и стадии, чувствительные к недостатку белка Hyd.
4. С помощью трансгенной конструкции, позволяющей экспрессировать полноразмерную копию гена *hyd*, исследовать влияние его эктопической экспрессии на развитие клеток зародышевой линии *D.melanogaster*.

### **Научная новизна**

В данной работе мы впервые определили молекулярную природу мутации *hyd*<sup>15</sup> и показали, что она, как и мутация *hyd*<sup>C017</sup>, приводит к снижению экспрессии гена *hyd*. Впервые описаны неизвестные прежде функции белка Hyd в гонадогенезе дрозофилы: показано, что в оогенезе Hyd необходим для поддержания жизнеспособности клеток зародышевого пути и регуляции их митотических делений, а в сперматогенезе, напротив, мутации Hyd не приводят к избыточной пролиферации клеток зародышевого пути, а влияют на мейоз и дифференцировку сперматид. Показано, что избыток белка Hyd не влияет на развитие клеток зародышевой линии.

## Практическая значимость

Изучение компонентов UPS и, в частности, E3 лигаз, часто невозможно по причине летальности мутантных особей в эмбриогенезе. Благодаря большому набору генетических инструментов, разработанных для дрозофилы, использование ее в качестве модельного объекта позволяет изучать функции генов в различных тканях и на разных стадиях, что особенно актуально для изучения E3 лигаз, так как набор субстратов для них может отличаться в зависимости от контекста. Поскольку белок Hyd является высококонсервативным, то результаты, полученные в данной работе на дрозофиле, помогут в понимании механизмов функционирования его ортолога у млекопитающих - UBR5, являющегося частой причиной рака, а также способствуют лучшему пониманию особенностей убиквитиновой системы в различных тканях.

## Положения, выносимые на защиту

1. Мутация *hyd*<sup>15</sup> вызвана заменой 1545 нуклеотида (G→A) (NCBI Reference Sequence: NM\_079572.4 Reference Release 6.32), что приводит к образованию преждевременного СТОП-кодона и формированию усеченной формы белка, содержащей только убиквитин-связывающий домен UBA. Показано, что мутации *hyd*<sup>15</sup> и *hyd*<sup>C017</sup> вызывают снижение экспрессии мРНК гена *hyd*, что приводит к возникновению мутантного фенотипа.
2. В сперматогенезе дрозофилы эффекты мутаций *hyd*<sup>15</sup> и *hyd*<sup>C017</sup> затрагивают все события и структуры, обеспечивающие деление клеток (формирование центросом, веретена деления, конденсацию и расхождение хромосом, цитокинез), а также вызывают нарушения дифференцировки сперматид. В сперматогенезе мутации *hyd*<sup>15</sup> и *hyd*<sup>C017</sup> не приводят к избыточной пролиферации клеток зародышевого пути и особенность гена как супрессора опухоли здесь не проявляется.
3. В оогенезе дрозофилы белок Hyd необходим для поддержания жизнеспособности клеток зародышевой линии, его недостаток вызывает масштабную гибель яйцевых камер и деградацию яичников. В отличие от сперматогенеза, в оогенезе дрозофилы белок Hyd участвует в регуляции пролиферации клеток зародышевого пути. Подавление экспрессии гена *hyd* в германии приводит к дополнительным раундам митоза зародышевых клеток.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на следующих международных конференциях: 12-й Международной мультikonференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома/Системная биология» (BGRS/SB-2020), Новосибирск, Россия, 2020; Беляевские чтения. Международная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева, Новосибирск, 2017; II международная конференция «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии», Одесса, Украина, 2010.

### **Вклад автора**

Основные результаты получены и проанализированы автором самостоятельно. Цитологический анализ нарушений сперматогенеза и оогенеза дрозофилы проводился совместно с к.б.н. Дороговой Н.В. и к.б.н. Фёдоровой С.А. Электронная микроскопия гонад выполнена к.б.н. Болоболовой Е.У.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 116 страницах текста и состоит из введения, обзора научной литературы, описания использованных материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы, содержащего 211 наименований, и приложения. Работа включает в себя 6 таблиц и 28 рисунков.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использовали линии мух, полученные из Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC). Изучение функций белка Hyd проводили на двух аллелях гена *hyd* – *hyd*<sup>l5</sup> (#3718 BDSC) и *hyd*<sup>C017</sup> (#16256 BDSC), а также с помощью РНК-интерференции (#32352 BDSC). Секвенирование мутаций проводили по стандартной методике на капиллярном секвенаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Приготовление и иммуноокрашивание препаратов гонад проводили по методикам, описанным в Dorogova *et al.*, 2008, Pertseva *et al.*, 2010 и Dorogova *et al.*, 2020.

Молекулярное клонирование и работу с нуклеиновыми кислотами проводили по стандартным протоколам или в соответствии с рекомендациями производителя.

Плаزمида *pUASp-attB-Hyd*<sup>+</sup> для экспрессии полноразмерной копии гена *hyd* в клетках зародышевой линии была сконструирована с помощью переноса

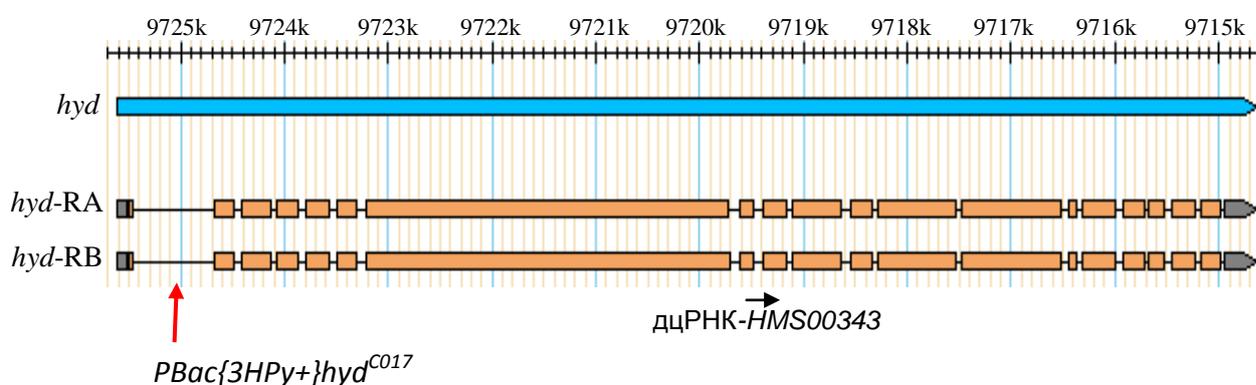
кДНК гена *hyd* из вектора pBS SK- (клон F124602, был получен из Drosophila Genomics Resource Center, США) в вектор *pUASp-attB*.

Трансформация клеток зародышевого пути дрософилы проводилась с использованием оптимизированной системы трансгеноза, основанной на интегразе бактериофага  $\phi$ C31 [Bischof et al., 2007], в эмбрионы линии  $y^1M\{RFP\{3xP3.PB\}GFP\{E.3xP3\}=vas-int.Dm\}ZH-2A \ w^*;M\{3xP3-RFP.attP'\}ZH-51C$  (#24482 BDSC).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика гена *hyd* и его мутаций

Ген *hyd* расположен в позиции 3R:9714623..9725615 района 85E5 третьей хромосомы дрософилы (*dme1\_r6.34*). Он имеет длину 10993 п.н. и состоит из девятнадцати экзонов (Рисунок 1). С гена *hyd* считываются два транскрипта, *hyd-RA* и *hyd-RB*, с которых считываются два уникальных полипептида, *hyd-PA* и *hyd-PB*, длиной 2885 а.к. и 2887 а.к. соответственно. На данный момент неизвестно, есть ли тканеспецифические и временные различия в экспрессии транскриптов *hyd*, а также, выполняют ли два образующихся полипептида какие-либо специфические функции.

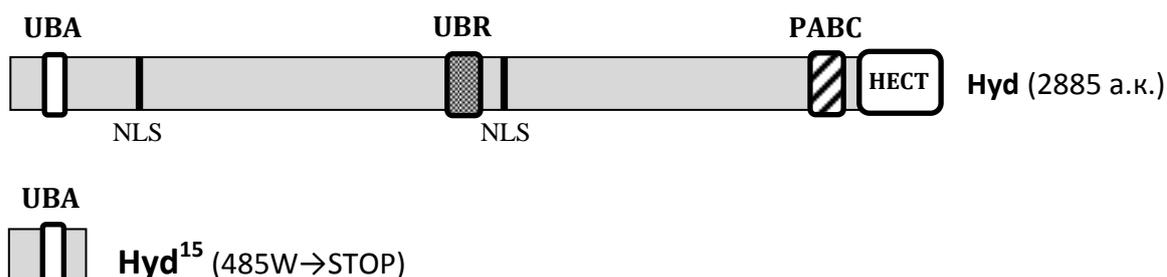


**Рисунок 1. Молекулярная организация гена *hyd*.** Положение гена и его транскриптов на физической карте отмечены голубым и оранжевым цветом соответственно. Красной стрелкой отмечен сайт встройки транспозона *PBac{3HPy+}* при мутации *hyd<sup>C017</sup>*. Черная стрелка – участок, кодирующий двуцепочечную РНК. (С модификациями из FlyBase).

Для гена *hyd* всего известно 42 аллеля [Flybase.org]. В данной работе мы использовали две мутации: *hyd<sup>L5</sup>*, *hyd<sup>C017</sup>*.

*hyd<sup>L5</sup>*. Этот аллель возник в результате точечной мутации, вызванной действием мутагена EMS (ethyl methanesulfonate). Точная локализация этой мутации до сих пор была неизвестна. Особи, гомозиготные по данной мутации, погибают на личиночной стадии.

С помощью секвенирования мы определили последовательность ДНК гена *hyd*, выделенной из личинок, гомозиготных по мутации *hyd*<sup>15</sup>, из линии *kni*<sup>ri-1</sup> *hyd*<sup>15</sup> *e*<sup>1</sup>/*TM3*, *Sb*<sup>1</sup> (#3718 BDSC) и выяснили, что в мРНК мутантов *hyd*<sup>15</sup> произошла замена 1545 нуклеотида (G→A) (NCBI Reference Sequence: NM\_079572.4 Rel.6.32), вследствие чего триптофан в позиции 485 был заменен на стоп-кодон (485W→STOP). Это должно приводить к образованию более короткого и, скорее всего, нефункционального полипептида, который содержит только первый домен - UBA (Ubiquitin-associated domain), отвечающий за связывание с убиквитином (Рисунок 2).



**Рисунок 2. Схема организации полноразмерного белка Hyd и его мутантного варианта Hyd<sup>15</sup>.** UBA (ubiquitin-associated) – отвечает за связывание с убиквитином; NLS – сигнал ядерной локализации; UBR (ubiquitin recognin box) – отвечает за распознавание N-дегронов; HECT (homologous to the E6-AP carboxyl terminus)–отвечает за каталитическую активность; PABC (poly(A)-binding protein C-terminal) – белок-связывающий домен.

Этот усеченный вариант белка можно рассматривать как нуль-аллель, так как в нем отсутствуют все остальные функционально значимые домены, отвечающие как за связывание с субстратами (UBR и PABC), так и за убиквитин-лигазные каталитические функции Hyd.

*hyd*<sup>C017</sup>. Эта мутация представляет собой инсерцию транспозона *PVas{3HPy+}* в первый интрон гена *hyd* (позиция 3R:9 725 098, <http://flybase.org/>, *dme1\_r6.34*) (Рисунок 1). Особи, гомозиготные по данной мутации, в очень редких случаях достигают стадии имаго. Они, как правило, стерильны, хотя иногда наблюдается появление единичных потомков.

С помощью секвенирования геномной ДНК, выделенной из линии *y*<sup>1</sup> *w*<sup>1118</sup>; *PVas{3HPy+}**hyd*<sup>C017</sup>/*TM3*, *Sb*<sup>1</sup> *Ser*<sup>1</sup> (#16256), мы подтвердили наличие встройки транспозона в первый интрон гена *hyd* (позиция 9 725 098, <http://flybase.org/>, *dme1\_r6.34*), а также обнаружили одну несинонимичную замену серина в позиции 294 на пролин, относительно канонической последовательности, представленной в базах FlyBase (FBgn0002431) и UniProt/Swiss-Prot (P51592): 1938T→C (294S→P). Учитывая, что обе эти аминокислоты относятся к группе малых аминокислот, и что серин довольно нейтрален в отношении мутаций и заменяется обычно другими полярными или

малыми аминокислотами, можно предположить, что описанные варианты белка Hyd являются естественным полиморфизмом, и именно встройка транспозона приводит к возникновению мутантного фенотипа.

### Оценка влияния мутаций *hyd* на уровень экспрессии *hyd* мРНК в семенниках и яичниках *D. melanogaster*

Чтобы определить, чем обусловлен эффект мутаций *hyd*<sup>15</sup> и *hyd*<sup>C017</sup> на развитие зародышевой линии самцов и самок дрозофилы, и каким образом наличие встройки транспозона в интрон нарушает функцию гена *hyd*, мы провели ПЦР-анализ в реальном времени РНК, выделенной из семенников и яичников взрослых самцов и самок, гетерозиготных по мутациям *hyd*<sup>15</sup> и *hyd*<sup>C017</sup>, а также несущих гетероаллельную комбинацию *hyd*<sup>15</sup>/*hyd*<sup>C017</sup>. В качестве контроля были использованы мухи линии Oregon R.

Мы обнаружили, что в результате встройки транспозона в первый интрон, вызывающей мутацию *hyd*<sup>C017</sup>, у гетерозиготных особей происходит снижение экспрессии *hyd* мРНК на ~20% по сравнению с контролем в яичниках и на ~30% в семенниках (Рисунок 3).

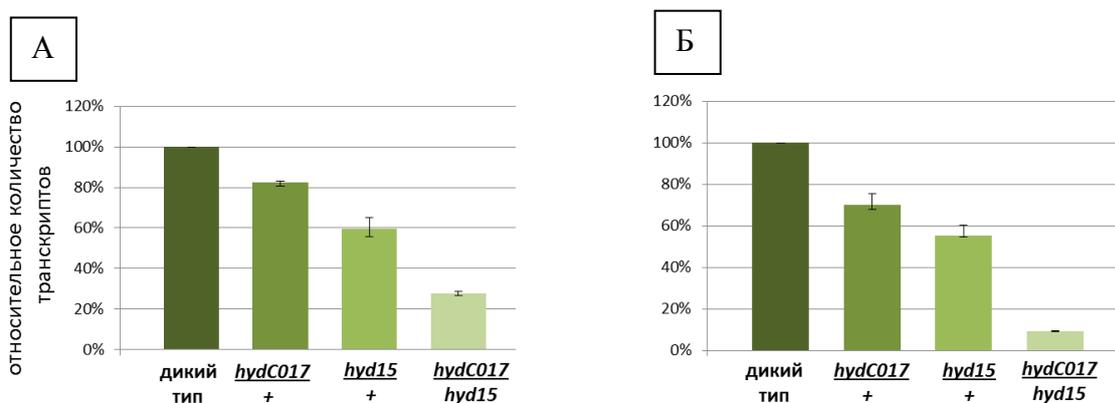


Рисунок 3. Уровень экспрессии *hyd* мРНК у мутантов и в норме.

А – яичники. Б – семенники.

Снижение экспрессии гена в данной линии мух позволяет предполагать, что встройка транспозона произошла в его регуляторную область. Мы проанализировали 1-й интрон на наличие потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов. По информации, представленной в базе данных ModEncode, в области 1-го интрона гена *hyd* выявлены участки связывания транскрипционных факторов Ubx, Twi, Jumu, D1, Med, D. Так как известно, что транскрипционные факторы часто взаимодействуют для регуляции экспрессии гена, то мы полагаем, что встройка транспозона в этот район может или нарушить последовательность сайтов связывания этих

транскрипционных факторов или препятствовать их взаимодействию, что приводит к снижению уровня транскрипции гена *hyd*.

Наличие точечной мутации, приводящей к образованию преждевременного СТОП-кодона у мутантов *hyd<sup>15</sup>*, также вызывает снижение уровня *hyd* мРНК в яичниках и семенниках гетерозигот приблизительно на 40-45% (Рисунок 3). Преждевременный СТОП-кодон, вероятно, запускает механизм нонсенс-опосредованного разрушения мРНК (nonsense-mediated mRNA decay, NMD), что приводит к ее деградации и снижению детектируемой мРНК [Gatfield et al., 2003].

У особей *hyd<sup>15</sup>/hyd<sup>C017</sup>* уровень экспрессии *hyd* мРНК составляет всего около 27% от нормы в яичниках и 9% в семенниках.

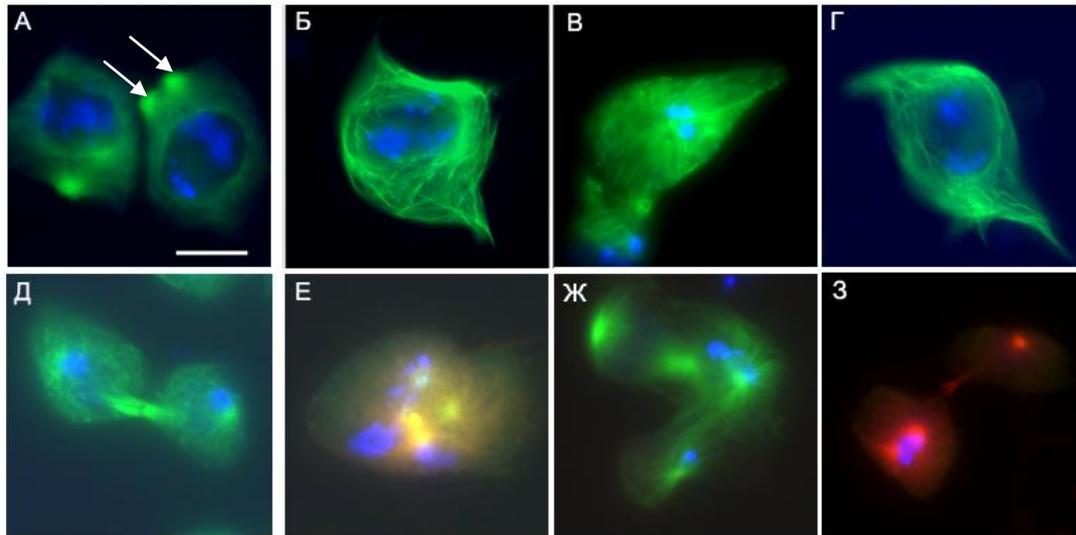
Таким образом, и наличие встройки транспозона, и наличие СТОП-кодона приводят к снижению экспрессии *hyd* мРНК. Следовательно, можно предположить, что нарушения сперматогенеза и оогенеза, идентифицированные у мух *hyd<sup>15</sup>/hyd<sup>C017</sup>* и описанные далее, связаны с недостатком продукта гена *hyd*.

### **Влияние мутаций в гене *hyd* на сперматогенез**

#### ***D. melanogaster***

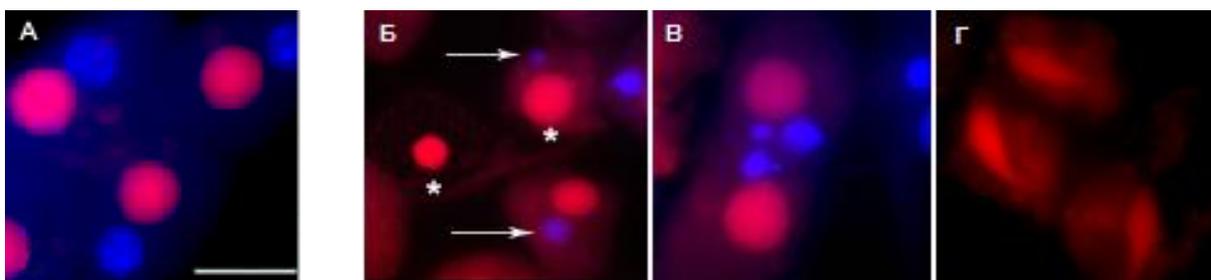
Изучив фенотип гетероаллельной комбинации *hyd<sup>15</sup>/hyd<sup>C017</sup>* в зародышевой линии самцов (особи, гомозиготные по этим мутациям, летальны на личиночной стадии), мы обнаружили, что Нуд принимает участие как в процессе мейоза, так и во время дифференцировки сперматид. В профазе мейоза I в 20 % клеток *hyd<sup>15</sup>/hyd<sup>C017</sup>* центросомы полностью отсутствовали, и не формировалась астральная система микротрубочек, а цитоплазматические микротрубочки хаотично распределялись в объеме цитоплазмы (Рисунок 4 А-Г).

В тех клетках, в которых центросомы сохраняются, может нарушаться их биполярное расхождение (Рисунок 4Е). Мы обнаружили образование двух веретен в одной клетке в мейозе, что указывает на дефекты мейотического цитокинеза (Рисунок 4Ж). Хромосомы при этом не выходят из стадии прометафазы. Нарушается их прикрепление к веретену и, как следствие, нормальное расхождение (Рисунок 4Ж, 3). Подобные нарушения обнаруживаются в 50% цист.



**Рисунок 4. Дефекты формирования веретена деления и расхождения хромосом у самцов *hyd<sup>15</sup>/hyd<sup>C017</sup>*.** (А) Формирующаяся астральная система микротрубочек вокруг centrosом (стрелки) в нормальном мейозе. (Б, В, Г) Мутантные сперматоциты без полюсов, микротрубочки дезинтегрируются и дезориентируются в цитоплазме. (Д) Цитокинез и биполярное расхождение хромосом в норме. (Е) Клетка с четырьмя группами астральных микротрубочек (полюсами веретена) и дезорганизованным веретеном. (Ж) Образование двух веретен в одной клетке во втором делении мейоза. (З) Нарушение расхождения хромосом, отделение клетки без хромосом. ДНК окрашена DAPI (синий),  $\alpha$ -тубулин микротрубочек (зеленый). Шкала 7 мкм.

Вследствие нарушения формирования нормального биполярного веретена в процессе деления происходит неравное распределение клеточных органелл, таких как митохондрии и хромосомы, между дочерними клетками, и, как следствие, образование клеток на стадии «луковицы», имеющих митохондриальные производные (небенкерны) разного размера, разное количество хроматина либо его полное отсутствие (Рисунок 5 Б, Г). Хромосомы заблокированы на стадии прометафазы.



**Рисунок 5. Проявление мутаций *hyd* в сперматогенезе на стадии «луковицы» у самцов *hyd<sup>15</sup>/hyd<sup>C017</sup>*.** (А) Нормальные сперматиды на стадии «луковицы». Каждая сперматида содержит одно ядро округлой формы (синий) и один небенкерн (красный). (Б) Небенкерны разного размера (звездочки) в клетках с микроядрами (стрелки). (В) Два небенкерна в одной клетке, конденсированные хромосомы находятся в стадии прометафазы. (Г) Начало элонгации сперматид. Небенкерны удлиняются в клетках, не содержащих хроматина. Окраска ДНК - DAPI (синий), небенкерн - MitoTracker Red (красный). Шкала 7 мкм.

Во время стадии элонгации сперматиды у мутантов несколько удлиняются, но ядра не преобразуются в нитевидную форму и не мигрируют к базальному концу цисты, оставаясь рассеянными по цисте. В 100 обследованных цистах около 90% ядер и микроядер не достигают правильного полюса цисты.

Ультраструктурный анализ мутантных цист на стадии элонгации показал, что цисты содержали сильно редуцированное количество сперматид, и в некоторых из них отсутствовала аксонема. Также одна аксонема может быть ассоциирована с несколькими митохондриальными производными, и одно митохондриальное производное может быть присоединено к нескольким аксонемам. Поскольку формирование аксонемы зависит от базального тельца - модифицированной центриоли, прикрепленной к мембране ядра сперматиды [Lindsley and Tokuyasu, 1980], такие сперматиды могут быть следствием аномального распределения центросом в мейозе. Нарушение нормального взаимодействия митохондриальных производных с растущей аксонемой или ее отсутствие приводят к асинхронности этого процесса в соседних цистах и формированию фенотипа «разбросанных ядер».

Таким образом, в случае с мутациями гена *hyd* мы обнаружили широкий спектр нарушений, затрагивающий все события и структуры, обеспечивающие деление клеток, а также дифференцировку сперматид. На данный момент мы не можем говорить о существовании какой-то одной специфичной мишени, приводящей к такому разнообразию нарушений. Все они скорее характерны для генов, относящихся к убиквитинового системе деградации и участвующих в активном обороте белков в процессе сперматогенеза.

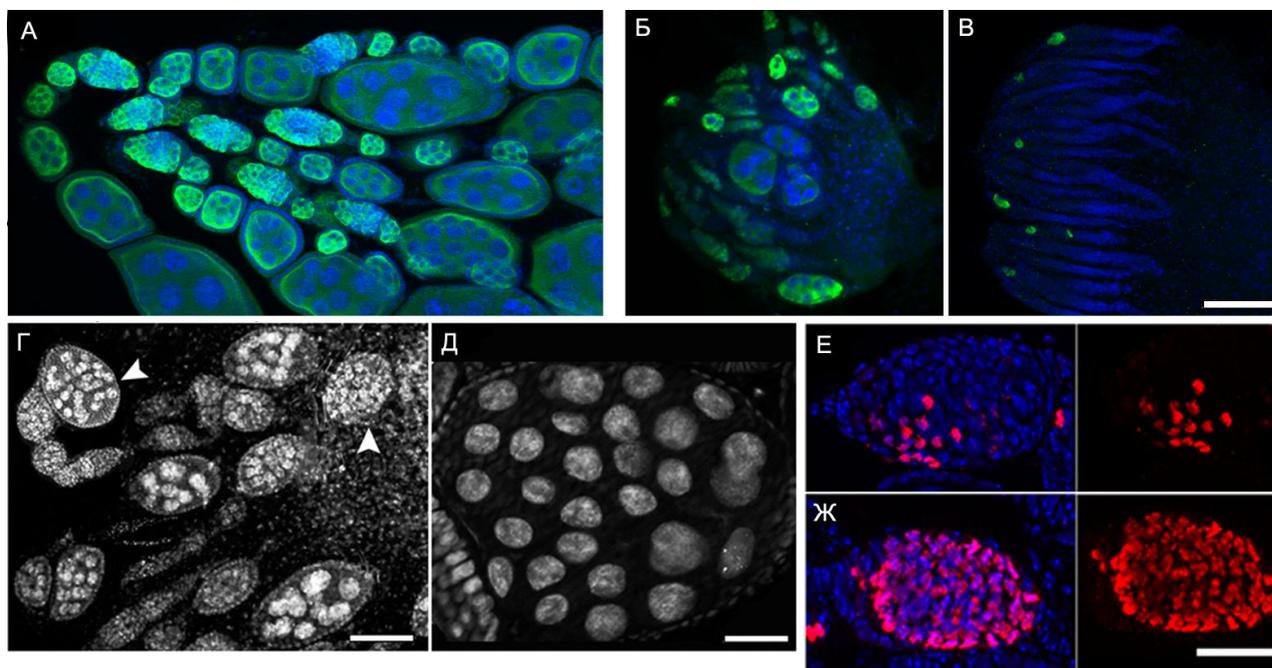
### **Влияние мутаций в гене *hyd* на оогенез *D. melanogaster***

Цитологический анализ влияния мутаций *hyd* на оогенез проводился у самок *hyd*<sup>15</sup>/*hyd*<sup>C017</sup>. В качестве контроля использовались линия дикого типа *Oregon R* и гетерозиготы *hyd*<sup>15</sup> *e*<sup>1</sup> / *TM3, Sb*<sup>1</sup> и *hyd*<sup>C017</sup> / *TM3, Sb*<sup>1</sup>, *Ser*<sup>1</sup>.

Самки *hyd*<sup>C017</sup>/*hyd*<sup>15</sup> были стерильны и откладывали единичные яйца, которые не развивались. Иммуноокрашивание маркера зародышевых клеток, белка *Vasa*, показало, что большая часть яичников *hyd*<sup>C017</sup>/*hyd*<sup>15</sup> были либо полностью лишены клеток зародышевой линии (КЗЛ), либо содержали единичные цисты с КЗЛ (Рисунок 6А-В).

На стадии эмбриона и личинки гонады у мутантов формировались нормально, но на более поздних стадиях их КЗЛ деградировали; лишь некоторые КЗЛ давали начало цистам, которые развивались в нормальные яйцевые камеры. Тем не менее, образовавшиеся яйцевые камеры все равно деградировали в среднем оогенезе: только 1% из них развивались в яйца.

Таким образом, мутация *hyd* влияет на жизнеспособность КЗЛ самок на разных стадиях их развития, что приводит к гибели как ранних КЗЛ (включая стволовые) в личиночных яичниках и гермари, так и дифференцированных КЗЛ в среднем оогенезе.



**Рисунок 6. Аномалии оогенеза у самок *hyd<sup>C017</sup>/hyd<sup>I5</sup>*.**

(А, Б, В) Визуализация зародышевых клеток с помощью окрашивания антителами на Vasa (зеленый). (А) Яичник дикого типа. (Б, В) Потеря зародышевых клеток в яичниках *hyd<sup>C017</sup>/hyd<sup>I5</sup>*. Шкала 10 мкм. (Г) Частично редуцированный яичник самки *hyd<sup>C017</sup>/hyd<sup>I5</sup>*, содержащий яйцевые камеры с избыточным количеством зародышевых клеток (головки стрелок). Шкала 10 мкм. (Д) Яйцевая камера с избыточным количеством зародышевых клеток. Шкала 3 мкм (Е, Ж) Визуализация митотических клеток в зародышевых клетках с помощью окрашивания антителами на pH3 (красный). (Е) Нормальное количество анафазных хромосом в гермари дикого типа. (Ж) Избыточное количество анафаз в гермари *hyd<sup>C017</sup>/hyd<sup>I5</sup>*. Шкала 2 мкм. Окраска ДНК - DAPI (синий).

Помимо редуцированных яйцевых камер, небольшое количество *hyd<sup>C017</sup>/hyd<sup>I5</sup>* яичников также содержали яйцевые камеры с избыточным количеством клеток зародышевой линии (Рисунок 6 Г-Ж). Окрашивание на фосфорилированную форму H3-гистона (маркер митоза) показало, что мутантные цисты содержали значительно большее количество митотических хромосом, чем обычно. В частности, количество метафазных групп внутри одной цисты достигало 16 и 32 (вместо нормальных 8), а количество анафаз достигло 32 и 64 (вместо 16 в норме) (Рисунок 6Е, Ж). В результате и гермари, и яйцевые камеры выглядели аномально увеличенными.

Этот фенотип является следствием дополнительных митозов клеток зародышевой линии и указывает на наличие нарушений в контроле клеточного цикла в результате мутаций *hyd*.

Дополнительные раунды митоза цистобластов, как у мутантов *hyd*, также наблюдаются при нарушении регуляции своевременной деградации

митотических циклинов: Cyclin A, B и E [Lilly et al., 2000; Wang and Lin, 2005; Chen et al., 2009]. Например, оверэкспрессия генов, кодирующих эти белки, или делеция бокса деструкции циклинов *CycA* и *CycB* вызывают один, реже два дополнительных раунда митоза, приводящие к образованию 32- и 64-клеточных цист [Jacobs et. al., 1998; Doronkin et. al., 2003]. Деградация компонентов комплекса Cyclin/Cdk происходит посредством убиквитин-зависимого протеасомного протеолиза, поэтому нарушение его функционирования приводит к фенотипу дополнительных раундов митоза. Возможно, во время делений КЗЛ в германии *Hyd* необходим для подавления циклинов и своевременного прекращения митозов цистобластов.

### Эктопическое подавление экспрессии гена *hyd* с помощью РНК-интерференции.

Для эктопического подавления экспрессии гена *hyd* мы скрещивали мух линии, содержащей конструкт *UASp-hyd-RNAi*, с мухами линий, которые экспрессируют *GAL4* под контролем различных гонадоспецифичных энхансеров (драйверов). Мы использовали драйверы, специфичные как для клеток зародышевой линии, так и для соматических фолликулярных клеток (Таблица 1).

**Таблица 1. GAL4 драйверы, использованные в работе**

	№ линии драйвера	Генотип	Паттерн экспрессии
Зародышевые клетки	4937	<i>nanos-GAL4</i> $w^{1118}; P\{w^{+mC}=GAL4::VP16nos.UTR\}CG6325^{MVD1}$	Примордиальные КЗЛ, стволовые КЗЛ семенников и яичников
	44242	<i>osk-GAL4</i> $w^{1118}; P\{w^{+mC}=osk-GAL4::VP16\}F/TM3, Sb^1$	КЗЛ во втором районе германия
	80579	<i>bam-GAL4</i> $y^1 w^* P\{bam-GAL4:VP16\}1$	Сперматогонии, начиная со стадии 4-х клеточной цисты
Фолликулярные клетки	36287	<i>36287-GAL4</i> $w^*; P\{w^{+mW.hs}=GawB\}GR1.$	Фолликулярные клетки, включая стволовые фолликулярные клетки
	7023	<i>7023-GAL4</i> $y[1] w[*]; P\{w[+mW.hs]=GawB\}109-30/CyO$	Фолликулярные клетки 2-3 районов германия, фолликулярные клетки яйцевых камер на 1 стадии развития, интерфолликулярные клетки
	7024	<i>7024-GAL4</i> $P\{GawB\}109-39$	Интерфолликулярные клетки, фолликулярные клетки яйцевых камер на 1-3 стадиях развития
	<i>tj</i>	<i>traffic jam-GAL4</i>	Соматические клетки эмбриональных гонад, клетки ниши стволовых КЗЛ, цистные клетки, фолликулярные клетки

### ***Ранняя гибель клеток зародышевой линии в гонадах *nanos-GAL4/UAS-hyd-RNAi* и *tj-GAL4/UAS-hyd-RNAi****

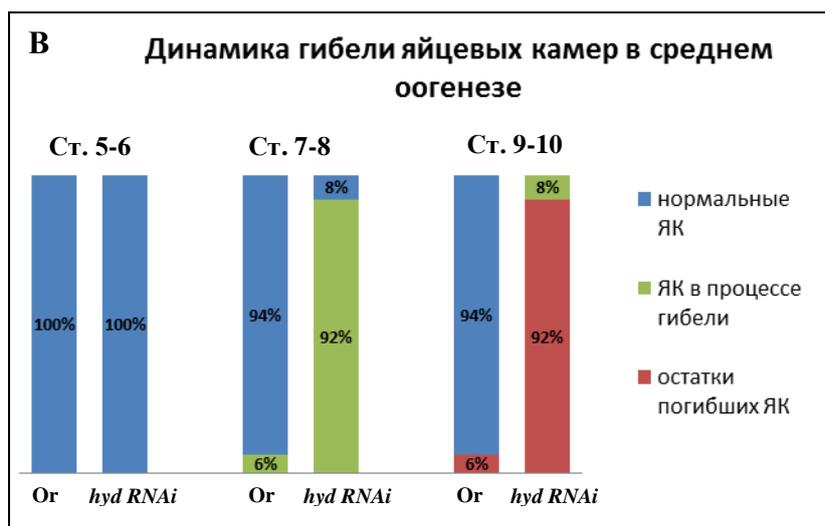
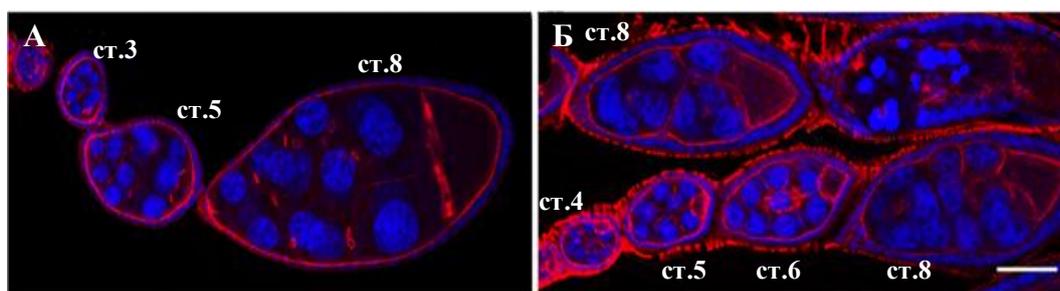
РНК-интерференция *hyd* при индукции драйвером *nanos-GAL4*, который активен в КЗЛ на всех стадиях развития, приводила к формированию редуцированных яичников и семенников, в которых полностью отсутствовали КЗЛ. Следует отметить, что при этом эмбриональные и личиночные гонады формировались, а гибель Нуд-дефицитных КЗЛ в гонадах *nanos-GAL4/UAS-hyd-RNAi* начиналась в конце третьего личиночного возраста. На этой стадии личиночные гонады содержат первичные КЗЛ, которые прекращают деления и специализируются в двух направлениях: несколько клеток взаимодействуют с вновь образованной нишей и становятся стволовыми клетками зародышевой линии, в то время как оставшиеся клетки дифференцируются и превращаются в цистобласты и гониобласты, соответственно [Gancz et al., 2011; Kahney et al., 2019; Ninnant et al., 2020; Базылев и др., 2021]. Мы предполагаем, что наиболее вероятными партнерами Нуд в самом начале гонадогенеза, когда определяется судьба первичных КЗЛ: быть стволовыми клетками или дифференцироваться, является фактор дифференцировки зародышевой линии *Vam* или компоненты *Vam* – сигнального пути. Экспрессия *Vam* подавляется в стволовых клетках (где дифференцировка запрещена) и активируется в цистобластах и гониобластах (где запускается дифференцировка) [Ji et al., 2017; Mathieu and Huynh, 2017; Kahney et al., 2019]. Сверхэкспрессия *Vam* в яичниках личинок на поздней третьей стадии вызывает массовую гибель КЗЛ и образование гонад, состоящих полностью из соматических клеток [Ohlstein and McKearin, 1997; Chen and McKearin, 2003], - фенотип, сходный с наблюдаемым нами при мутировании или РНК-интерференции *hyd*.

В пользу предположения, что в делении и/или дифференцировке стволовых КЗЛ Нуд действует опосредованно через клетки ниши, служит тот факт, что при РНК-интерференции *hyd* в соматических клетках гонад при помощи драйвера *traffic jam-GAL4*, который экспрессируется начиная с соматических клеток зачаточных эмбриональных гонад, мы наблюдали полное отсутствие как КЗЛ, так и соматических клеток гонад, и только в редких случаях – сильно редуцированные мелкие семенники.

### ***Гибель клеток зародышевой линии в среднем оогенезе у самок *oskar-GAL4/UAS-hyd-RNAi****

Драйвер *oskar-GAL4* активируется позднее, чем драйвер *nanos-GAL4*, во втором районе гермария. РНК-интерференция *hyd*, индуцированная драйвером *oskar-GAL4*, вызывала задержку роста яйцевых камер, что приводило к их

полной деградации (100%). Перед гибелью, после 4 или 5 стадии, яйцевые камеры переставали нормально развиваться (Рисунок 7). Несмотря на то, что яйцевые камеры *oskar-GAL4/UAS-hyd-RNAi* все еще продолжали расти, их размер был намного меньше, чем в камерах дикого типа на той же стадии (Рисунок 7А, Б). Медленно растущие яйцевые камеры постепенно накапливались в овариолах, которые становились аномально длинными и состояли из 6–9 яйцевых камер, медленно развивавшихся в основном до восьмой стадии (вместо 4–6 яйцевых камер на разных стадиях развития в нормальных овариолах).



**Рисунок 7. Гибель яйцевых камер в среднем оогенезе у самок *oskar-GAL4/UAS-hyd-RNAi*.**

(А) Нормальная овариола.

(Б) Овариолы *oskar-GAL4/UAS-hyd-RNAi* с деградирующими яйцевыми камерами.

(В) На 5-6 стадии оогенеза яйцевые камеры и у мутантов, и в норме не демонстрируют признаков гибели. Начиная с 7-8 стадии происходит масштабная гибель яйцевых камер в результате РНК-интерференции. Исследовано по 50 яичников каждого типа.

Ст.- стадия, ЯК - яйцевая камера, Or – линия *Oregon R*

Ультраструктурный анализ яичников имаго *oskar-GAL4/UAS-hyd-RNAi* и *hyd<sup>C017</sup>/hyd<sup>15</sup>*, а также цитологический анализ эффекторной каспазы Dcp-1 и лизосомальной активности в деградирующих яйцевых камерах показал, что яйцевые камеры подвергались клеточной гибели на стадиях 7-8/9, как и в диком типе, а их деградация имела признаки как апоптоза, так и аутофагии и морфологически не отличалась от дикого типа [Giorgi and Deri, 1976]. Все эти события являются характерными признаками гибели клеток в середине оогенеза [Giorgi and Deri, 1976].

Существует множество экспериментальных данных, демонстрирующих, что КЗЛ обладают высокой чувствительностью к такому параметру как достаточность/недостаточность энергетических ресурсов. Фенотипические изменения, подобные мутациям *hyd*, возникают в ответ на недостаток питательных веществ или нарушения в инсулин/TOR - зависимом сигнальном пути [Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; Barth et al., 2011; Pritchett and McCall, 2012]. Инсулин/TOR путь передачи сигналов является высококонсервативным механизмом, отвечающим за рост клеток и тканей. Он действует как сенсор, определяющий доступность питательных веществ, необходимых для метаболизма клеток, их роста и пролиферации. В оогенезе дрозофилы он имеет решающее значение для развития зародышевых клеток и созревания ооцитов. При наличии нарушений этого механизма рост яйцевых камер задерживается, они не могут войти в энергоемкий вителлогенез и, как следствие, деградируют [LaFever et al., 2010; Laws and Drummond-Barbosa, 2017; Jeong et. al., 2019]. Мы предполагаем, что Hyd либо взаимодействует с одной из мишеней инсулин/TOR - пути, либо регулирует факторы, ответственные за биосинтез в растущих яйцевых камерах.

### **Спасение мутантного фенотипа с помощью экспрессии полноразмерного белка Hyd.**

В данной работе мы создали трансгенную конструкцию *pUASp-attB-Hyd<sup>+</sup>*, позволяющую с высокой эффективностью экспрессировать полноразмерную копию гена *hyd* в зародышевой линии клеток дрозофилы. Экспрессия этой конструкции с помощью повсеместного драйвера *Ubi-GAL4* в особях, несущих гетероаллельную комбинацию *hyd<sup>C017</sup>/hyd<sup>15</sup>*, привела к полному восстановлению описанного выше мутантного фенотипа в гонадах до нормы, как у самок, так и у самцов. Это подтверждает тот факт, что исследуемые нами нарушения развития зародышевых клеток возникают именно вследствие недостатка продукта гена *hyd*.

### **Влияние эктопической экспрессии гена *hyd* на развитие клеток зародышевого пути**

Как было показано выше, недостаток белка Hyd вследствие мутаций или РНК-интерференции вызывает нарушения мейоза и дифференцировки сперматид у самцов дрозофилы и массовую клеточную гибель вместе с избыточной пролиферацией у самок. Все известные и описанные в литературном обзоре эффекты мутаций *hyd* в соматических тканях дрозофилы также являются следствием снижения количества белка. Вместе с этим, для человеческого ортолога гена *hyd* - *UBR5* – известно, что при раке легких и

яичников очень часто обнаруживается его сверхэкспрессия [Clancy et. al., 2003]. В этой связи возникает вопрос о том, какое влияние оказывает избыток белка Hyd на изучаемые в данной работе процессы.

Чтобы ответить на этот вопрос, мы использовали описанную выше конструкцию, кодирующую полноразмерную копию гена *hyd* – *UASp-attB-Hyd<sup>+</sup>*. Экспрессия этой конструкции под контролем драйвера *nanos-GAL4* на фоне 2-х нормальных копий гена *hyd* в линиях, несущих конструкцию и драйвер, приводит к сверхэкспрессии белка Hyd в клетках зародышевой линии. Анализ гонад самцов и самок *nanos-GAL4/UASp-attB-Hyd<sup>+</sup>* показал отсутствие каких-либо нарушений в развитии клеток зародышевой линии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

E3 убиквитин-лигаза Hyd является одним из ключевых компонентов системы убиквитинирования, которая важна для регуляции активности белков, их клеточных функций и протеасомной деградации. Важным свойством E3 убиквитин-лигаз является то, что в зависимости от клеточного контекста для них может меняться набор субстратов, и, в результате, их функции могут различаться в разных тканях. Ген *hyd* изначально был открыт как опухолевый супрессор, контролирующей деление клеток в соматических тканях. Однако при этом было известно, что его мутации также вызывают стерильность. До проведения настоящей работы причины стерильности детально не исследовались.

Мы провели цитологический анализ фенотипов мутаций *hyd<sup>l5</sup>* и *hyd<sup>C017</sup>*, а также РНК-интерференции гена *hyd* как в генеративных, так и в соматических тканях гонад, и показали, что снижение экспрессии *hyd* приводит к широкому спектру нарушений в сперматогенезе и оогенезе дрозофилы. Недостаток белка Hyd в гонадогенезе приводит к гибели как ранних зародышевых клеток (включая стволовые) в эмбриональных и личиночных гонадах и гермариин, так и дифференцированных зародышевых клеток в среднем оогенезе. Возможным партнером Hyd в самом начале гонадогенеза является Bam или компоненты Bam-сигнального пути, которые регулируют дифференцировку ранних зародышевых клеток. Гибель зародышевых клеток в середине оогенеза, в результате РНК-интерференции под контролем драйвера *oskar-GAL4*, происходила после постепенного замедления развития и роста яйцевых камер. Мы предполагаем, что Hyd либо взаимодействует с одной из мишеней инсулин/TOR - пути, либо регулирует факторы, ответственные за биосинтез в растущих яйцевых камерах.

В оогенезе дрозофилы Hyd необходим также для регуляции количества митотических делений клеток зародышевой линии. Это также может быть

опосредовано взаимодействием с *Vam*. В сперматогенезе мутации *hyd* приводят к разнообразным нарушениям мейоза и дифференцировки сперматид, но сверхпролиферации клеток зародышевой линии при этом не происходит.

Таким образом, помимо общей функции, заключающейся в поддержании жизнеспособности клеток зародышевой линии, *Nud* имеет и специфические для оогенеза и сперматогенеза, в зависимости от набора субстратов. На основе данных, полученных в этой работе, возможно дальнейшее изучение роли *Nud* в развитии клеток зародышевой линии уже с точки зрения его протеолитических и непротеолитических функций и выяснения субстратов и сигнальных путей для каждого случая.

### ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что мутация *hyd*<sup>15</sup> представляет собой точечную замену 1545 нуклеотида мРНК (G→A) (NM\_079572.4 Rel.6.32), что приводит к образованию преждевременного СТОП-кодона и формированию усеченной формы белка, содержащей только убиквитин-связывающий домен UBA. Показано, что мутации *hyd*<sup>15</sup> и *hyd*<sup>C017</sup> вызывают снижение экспрессии мРНК гена *hyd*, что приводит к возникновению мутантного фенотипа.
2. Эффекты мутаций *hyd*<sup>15</sup> и *hyd*<sup>C017</sup> в сперматогенезе дрозофилы затрагивают все события и структуры, обеспечивающие деление клеток зародышевой линии, а также вызывают нарушения дифференцировки сперматид. В сперматогенезе мутаций *hyd*<sup>15</sup> и *hyd*<sup>C017</sup> не приводят к избыточной пролиферации клеток зародышевого пути и особенность гена как супрессора опухоли здесь не проявляется.
3. Впервые показано, что в оогенезе дрозофилы белок *Nud* необходим для поддержания жизнеспособности клеток зародышевой линии, его недостаток вызывает масштабную гибель яйцевых камер и деградацию яичников.
4. В отличие от сперматогенеза, в оогенезе дрозофилы белок *Nud* участвует в регуляции пролиферации клеток зародышевого пути. Подавление экспрессии гена *hyd* в гермарию приводит к дополнительным раундам митоза зародышевых клеток.
5. Эктопическая экспрессия гена *hyd* в гонадах не влияет на деление и развитие клеток зародышевого пути ни в оогенезе, ни в сперматогенезе.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По результатам работы опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. Галимова Ю.А., Дорогова Н.В., Фёдорова С.А. Функции E3-убиквитин-лигазы Hyd в тканях дрозофилы // Молекулярная биология. – 2021. - том 55. - № 3. - с. 355–361.
2. Dorogova N.V., Galimova Y.A., Bolobolova E.U., Baricheva E.M., Fedorova S.A. Loss of *Drosophila* E3 ubiquitin ligase Hyd promotes extra mitosis in germline cysts and massive cell death during oogenesis // Front Cell Dev Biol. - 2020. - V. 8:600868.
3. Pertceva J. A. (Galimova), Dorogova N. V., Bolobolova E.U., Nerusheva O.O., Fedorova S. A. and Leonid Omelyanchuk L.V. The role of *Drosophila hyperplastic discs* gene in spermatogenesis // Cell Biol. Int. – 2010. – V. 34. - № 10. – P. 991-996.

### Публикации по материалам конференций:

1. Galimova Yu., Dorogova N., Fedorova S. Functional roles of the E3 ubiquitin ligase Hyd in *Drosophila* tissues. Тезисы 12-й Международной мультikonференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома/Системная биология» (BGRS/SB-2020), Новосибирск, Россия. С. 28-29.
2. Галимова Ю.А., Дорогова Н.В., Фёдорова С.А. Изучение функций опухолевого супрессора Hyd в клетках зародышевой линии *D. melanogaster*. Беляевские чтения. Тезисы докладов Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева. Новосибирск, 2017. с. 98.
3. Дорогова Н.В., Перцева Ю.А. (Галимова Ю. А), Болоболова Е.У., Омелянчук Л.В. Роль супрессора опухоли Hyd в клетках зародышевого пути *Drosophila melanogaster*. Материалы конференции «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии» Одесса - 2010. С. 45-47.