

На правах рукописи



Мариловцева Екатерина Викторовна

**Клеточная локализация и функция белка везикулярного трафика Hrs в
сперматогенезе и развитии крыла
*Drosophila melanogaster***

03.01.07 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2015

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

Научный руководитель:

Омельянчук Леонид Владимирович

доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетики клеточного цикла, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты:

Высоцкая Людмила Васильевна

доктор биологических наук, профессор кафедры цитологии и генетики ФЕН Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск

Огиенко Анна Сергеевна

кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории механизмов клеточной дифференцировки, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт цитологии РАН**, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «___» декабря 2015 г. в 10-00 на заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, по защите на соискание ученой степени доктора наук в ИМКБ СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 8/2, тел. 373-02-49, факс (383) 363-90-78. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН www.mcb.nsc.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Е.Б. Кокоза

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одним из важнейших процессов, необходимых для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки и организма в целом, является везикулярный трафик. Разнообразие функций системы везикулярного трафика, включающей эндо- и экзоцитоз, процессы внутриклеточного обмена белковыми молекулами органелл и так далее, делает ее участницей многочисленных клеточных процессов, таких как поддержание активности сигнальных путей (reviewed in Seto et al., 2002), акросомогенез (reviewed in Berruti, Paiardi, 2011), цитокинез (Carlton, Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007) и многие другие.

Известно, что везикулярный трафик наиболее активен в клетках нервной системы, а также в сперматогенезе. Наличие же в сперматоцитах и сперматиде крупных органелл (облегчающих изучение внутриклеточной локализации белков) делает сперматогенез удобной моделью исследования данного биологического процесса.

Одним из ключевых участников везикулярного трафика является Hrs (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate), консервативный белок эукариот, член Vps (vacuolar protein sorting) семейства вакуолярных сортировочных белков, основной функцией которого является направление белковых молекул, поглощенных в ходе эндоцитоза и меченных единичной молекулой убиквитина, на деградацию в лизосомах, что определяет его способность оказывать влияние на активность некоторых сигнальных путей. Благодаря своему мультидоменному строению молекула Hrs способна связываться со множеством разнообразных белков.

Мутации *Hrs* (в частности, нонсенс-мутация *Hrs*^{D28} у дрозофилы) в гомозиготе приводит к тяжелым нарушениям гастрюляции и вентрального фолдинга и гибели эмбрионов на ранней стадии (Komada, Soriano, 1999). Более детальное изучение Hrs показало, что он способен принимать участие в регуляции некоторых сигнальных путей, к числу которых относятся EGFR, Wg (Seto, Bellen, 2006), Notch (Vaccari, 2008) и некоторые другие сигнальные пути, однако только в случае с EGFR проводились детальные исследования влияния на него Hrs (показано для эмбриональных фибробластов мыши (Kanazawa et al., 2003) и для эмбрионов и имгинальных дисков плодовой мушки (Chanut-Delalande et al., 2010)).

Кроме того, эксперименты на млекопитающих показали, что белок Hrs является партнером шванномина, опухолевого супрессора нейрофиброматоза 2 (имеет 55% гомологии с Merlin дрозофилы) (Scoles et al., 2000; Scoles et al., 2002; Gutmann, 2001), необходимым для поддержания его функции. Более того, согласно данным (Sun et al., 2002), Hrs млекопитающих самостоятельно способен выполнять функцию опухолевого супрессора. Поэтому уточнение

функций гена *Hrs* может играть роль в вопросах изучения регуляции опухолевого роста и разработки противоракковой терапии.

Основная цель – изучение клеточной локализации белка *Hrs* в сперматогенезе дрозофилы и выявление функций гена *Hrs* в развитии крыла *Drosophila melanogaster*.

Задачи данного исследования:

1. Получить линии *D. melanogaster*, содержащие встройки последовательностей, кодирующих полноразмерную и различные усеченные формы гена *Hrs*, в векторе pUASp-GFP, позволяющем экспрессировать трансген в клетках зародышевой линии. С помощью полученных линий изучить локализацию белка в сперматогенезе *D. melanogaster*.
2. Проанализировать способность *Hrs* к участию в регуляции цитокинеза в сперматогенезе *D. melanogaster*.
3. Исследовать спектр экспрессии различных изоформ *Hrs* (*Hrs-RA*, *Hrs-RB* и *Hrs-RC*), анонсированных в базе данных FlyBase, в крыловых имажинальных дисках, ганглиях и семенниках *D. melanogaster*.
4. Изучить локализацию отличных от *Hrs* маркеров эндосом в сперматогенезе *D. melanogaster*.
5. Исследовать эффекты эктопической экспрессии и сайленсинга (посредством РНК-интерференции) гена *Hrs* в развитии крыла *D. melanogaster* и выявить ранее неизвестные точки воздействия *Hrs* на сигнальные пути, задействованные в данном процессе. Исследовать влияние *Hrs* на процесс формирования эктопического глаза на крыле *D. melanogaster*.

Научная новизна работы. Изучен спектр транскриптов гена *Hrs* в соматических тканях (крыловых имажинальных дисках и ганглиях) и семенниках самцов дрозофилы, показано, наличие изоформ (*Hrs-RA* и *Hrs-RC*), специфичных для сперматогенеза *D. melanogaster*. В работе получены химерные белки, содержащие фрагменты белка *Hrs*, маркированные GFP, что позволило выявить локализацию *Hrs* на фузомах (межклеточных цитоплазматических мостиках, объединяющих сперматоциты в синцитии). Установлено, что за указанную локализацию белка ответственен мотив, расположенный между 383 и 472 аминокислотными остатками молекулы *Hrs*. Установлено, что маркеры эндосом, отличные от *Hrs*, – *Rab4*, *Rab7*, *Rab11* – локализуются в области акросомы, а *Rab4* и *Rab7* также на фузомах. Показано, что негативное влияние *Hrs* на активность сигнального пути *Wg* в крыле опосредовано влиянием *Hrs* на формирование паттерна экспрессии *Cut* в крыловом имажинальном диске. Выявлена роль *Hrs* в поддержании А/Р границы крылового имажинального диска на поздних личиночных стадиях. Показано существование ранее неизвестной функции гена *Hrs* в процессе развития крыла

дрозофилы – участие в процессе сужения про-жилок (vein refinement) и синхронизации развития поверхностей крыла.

Научно-практическая значимость исследования. Результаты данного исследования вносят вклад в фундаментальные знания о процессах, лежащих в основе регуляции сигнальных путей, участвующих в индивидуального развития организма. В данной работе впервые получены новые маркеры эндосом – фрагменты гена *Hrs*, маркированные GFP, которые далее были встроены в геном дрозифилы. Подобные маркеры позволяют проводить прижизненное наблюдение деталей поведения эндосом в клетке и изучать клеточные структуры, родственные эндосомам.

Научные положения, выносимые на защиту. Ген *Hrs* экспрессируется на ранних стадиях сперматогенеза дрозифилы и его белковый продукт ассоциируется с фузомами сперматоцитов за счет сайта связывания, расположенного между аминокислотными остатками 383 и 472. *Hrs* влияет на активность сигнального пути Wg на уровне формирования паттернов экспрессии *Cut*, *Wg* и поддержания границ паттерна экспрессии *Ap*, и таким образом участвует в поддержании D/V границы крылового имагинального диска. *Hrs* также участвует в поддержании A/P границы крылового имагинального диска и в процессе формирования границ жилок крыла на стадии куколки.

Личный вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Все работы молекулярно-биологического и цитологического характера проводились автором. Получение трансгенных линий дрозифилы проводилось при участии н.с. Т.Д. Дубатовой. Эксперименты по изучению трансдетерминации проводились при участии к.б.н. С.А. Копыла.

Апробация работы. Результаты работы представлены на конференции «Хромосома-2012» (09.2012, г. Новосибирск) и на III Съезде Общества клеточной биологии (10.2012, г. Санкт-Петербург).

Публикации. Содержание диссертации должным образом отражено в автореферате и изложено в 7 публикациях: в 5 статьях, опубликованных в изданиях Перечня ВАК, и в 2 публикациях в виде тезисов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, а также выводов и списка цитируемой литературы, в который входит 212 ссылок. Работа изложена на 140 страницах печатного текста, содержит 39 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии мух. В работе использовались линии мух, полученные из Bloomington Stock Center, описанные в базе данных FlyBase (<http://flybase.org/>), а также линии *P{UAS-Hrs.L}* (синоним *P{UAS-Hrs}12*) (лаборатория Н.Д.

Bellen, USA), $P\{wg-Gal4\}$ и $P\{PZ\}ap^{rK568}$ (лаборатория G. Morata, Spain), uw ; $UAS-GFP(S65T)$ (лаборатория C. Lehner, Germany), $P\{lArB\}neur^{A101}$ (лаборатория J. Mattila, Finland), uw^* ; $CyO/Tft;P\{Bam-Gal4\}$ (лаборатория геномики ИМКБ СО РАН), uw и $uw;If/CyO;Sb/Tb$ (лаборатория популяционной генетики ИЦиГ СО РАН), y^1 , $Df(1)w^{67c23}$; $\Delta 2-3$, $Ki p^p$ (лаборатория молекулярной цитогенетики ИМКБ СО РАН).

Выделение геномной ДНК и молекулярное клонирование. Выделение геномной ДНК производили с использованием калий-ацетатного (Bender et al., 1983) и фенол-хлороформного методов. Фрагменты гена *Hrs* вводили в промежуточную вектор pTZ57R/T (#1214, Fermentas) посредством молекулярного клонирования, проведенного в соответствии с инструкцией, предоставленной производителем. Из полученных плазмид фрагменты гена извлекали посредством рестрикции эндонуклеазами *EcoRI* и *BamHI* и вводились в вектор pUASp-GFP. Полученные плазмиды анализировали путем секвенирования в центре секвенирования ДНК ИМКБ СО РАН и использовали для трансформации клеток зародышевого пути дрозофилы.

ОТ-ПЦР анализ. Тотальную РНК из органов и тканей дрозофилы экстрагировали с использованием реагента Trizol® Reagent. Синтез первой цепи кДНК с РНК производили с использованием набора реактивов «Реверта-Л» или «SuperScript II ® First Single Strand synthesis system» (Invitrogen) в соответствии с инструкцией, предоставленной производителем. Для идентификации транскриптов *Hrs* применяли метод ОТ-ПЦР с использованием комбинаций праймеров #2 и #3 для *Hrs*-RA, #1 и #2 для *Hrs*-RB и #4 и #5 для *Hrs*-RC (#1: TCCTCCTGCTATTCCCTCCT, #2: CGGTTGGTGAAGGTGAACTC, #3: ATGAGCTCGGAGGAGGAACT, #4: CATCTGGCAGCACTGTAAGG, #5: GGAGGGAATAGCAGGAGGAG).

Приготовление препаратов семенников имаго. Семенники дрозофилы извлекали в растворе Хенкса, фиксировали 3,7% растворе формальдегида в 1x PBS 10 минут, промывали 1x PBS 3 раза по 5 минут, обрабатывали 1x раствором DAPI 5 минут и снова промывали 1x PBS 2 раза по 5 минут. Обработанные семенники заключали в для заливки препаратов (25% глицерин, 10% Mowiol, 5% DABCO, 0,2 M Tris-HCl. pH 8,5).

Детектирование активности репортера β-галактозидазы в крыловых имагинальных дисках. Имагинальные диски фиксировали в течение 20 минут в 0,75% глутаральдегиде (на 0.1M какодилате натрия), промывали 3 раза по 5 минут 1xPBS, и инкубировали в растворе для окрашивания (10mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.2; 150mM NaCl; 1mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.3% Triton X-100; 3.1mM $\text{K}[\text{FeII}(\text{CN})_6]$; 3.1mM $\text{K}_3[\text{FeIII}(\text{CN})_6]$; 0.2% X-gal) в течение ночи.

***in situ* гибридизация мРНК.** РНК-зонды для *in situ* гибридизации мРНК *Hrs* и *Cut* синтезировали с использованием набора реактивов DIG RNA labeling kit (Sp6/T7) (Roche #11175025910) в соответствии с инструкцией, предоставленной производителем. *In situ* гибридизацию мРНК проводили в соответствии с протоколами «Simultaneous detection of RNA and proteins by *in situ* hybridization and immunological staining» (Nagaso et al., 2001) и «*In situ* protocol for imaginal discs and pupal wings» (Sturtevant, Bier). В анализ брали семенники мух линии *uw* и крыловые имажинальные диски личинок 3 возраста линий *uw*, *1096-GAL4/uw* и *1096-GAL4>UAST-Hrs*. Личинок фиксировали в ФБ (фиксирующий буфер: 4% формальдегид, 100мМ Hepes, 2мМ MgSO₄, 1мМ ЭГТА) при 4°C в течение 24 часов, семенники – при комнатной температуре в течение 30 минут. Объекты отмывали последовательно этанолом и метанолом, обрабатывали смесью ксилола и этанола (1:1), снова отмывали, повторно фиксировали и отмывали. Диски извлекали из личинок, отмывали РВТ и обрабатывали раствором протеиназы К (20 мкг/мл) в течение 7-10 минут, после чего инактивировали фермент раствором глицина (2мг/мл). Семенники обрабатывали 80% ацетоном в течение при -20°C в течение 10 минут. Органы отмывали и подвергали, последовательно, предгибридации (при +65°C, 24 часа) и гибридизации (+65°C, 20 часов). Конечная концентрация комплиментарных и некомплементарным зондов к *Hrs* и *Cut* составляла 2нг/мкл. Органы после гибридизации отмывали, блокировали в 2% BSA и обрабатывали антителами против диоксигенина, конъюгированными с щелочной фосфатазой. Сигнал мРНК визуализировали посредством обработки образцов раствором NBT (4,5мкл) и BCIP (3,5мкл) в течение 20-30 минут при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Внутриклеточная локализация белка Hrs в сперматогенезе дрозофилы. В семенниках мух линий, полученных в ходе работы, осуществляли эктопическую экспрессию полноразмерной и усеченных форм *Hrs*, меченных GFP, под драйвером *bam-GAL4*. Цитологическое исследование семенников показало, что формы HrsB, Hrs4, Hrs8 и Hrs9 локализуются на эндосомах и фузомах сперматоцитов (Рис.1). Формы Hrs1 (Рис. 2А) и Hrs2 (Рис. 2Б) не были обнаружены на фузомах, но локализовались в ядрах сперматоцитов и сперматид. Исследование локализации в сперматогенезе GFP (Рис. 2В) и GFP.nls (Рис. 2Г) показало, что ядерная локализация Hrs1 и Hrs2 неспецифична. В то же время, поскольку GFP не обнаруживается на фузомах, мы считаем локализацию форм HrsB, Hrs4, Hrs8 и Hrs9 на указанных органеллах специфичной. Результаты исследования позволили локализовать сайт

связывания Hrs с фузой между аминокислотными остатками 383 и 472 (Рис. 3).

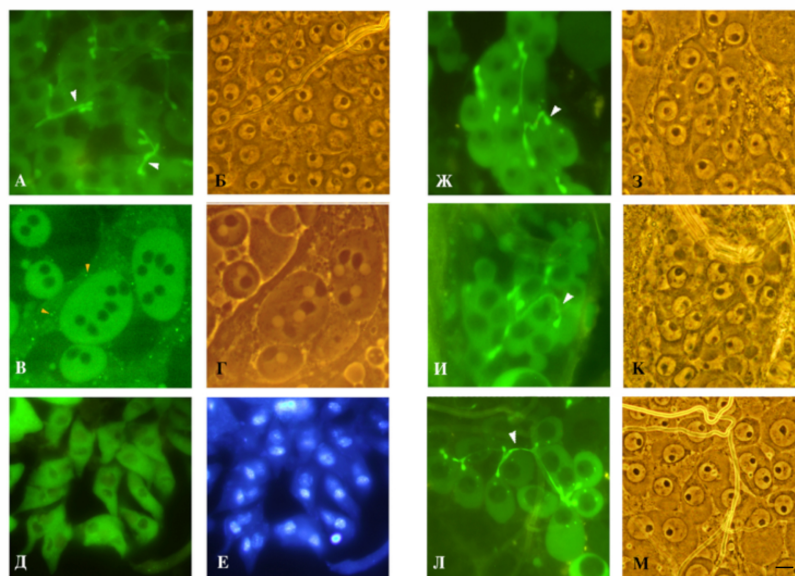


Рисунок 1. Локализация полноразмерной и усеченных форм белка Hrs, маркированных GFP, в сперматогенезе дрозофилы. Локализация полноразмерной формы HrsV в сперматоцитах (А, Б) и сперматиде на стадии «луковицы» (В, Г) и на стадии «листа» (Д, Е). Локализация Hrs4 (Ж, З), Hrs8 (И, К) и Hrs9 (Л, М) в сперматоцитах. Белыми стрелками показана локализация указанных форм на фузомах, оранжевыми стрелками – на эндосомах. Масштаб – 10 микрон.

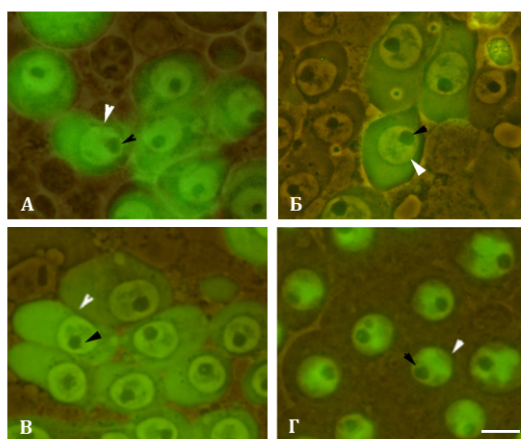


Рисунок 2. Локализация Hrs1 (А) и Hrs2 (Б), маркированных GFP. Обе формы локализуются в ядре (указано белыми стрелками), но не в ядрышковом организаторе (указано черными стрелками) сперматоцитов. GFP (В) и GFP.nls (Г). также локализуются в ядре (отмечено белыми стрелками), но не в ядрышковом организаторе (отмечено черными стрелками) сперматоцитов, что указывает на неспецифичность ядерной локализации Hrs1 и Hrs2. Масштаб – 10 микрон.

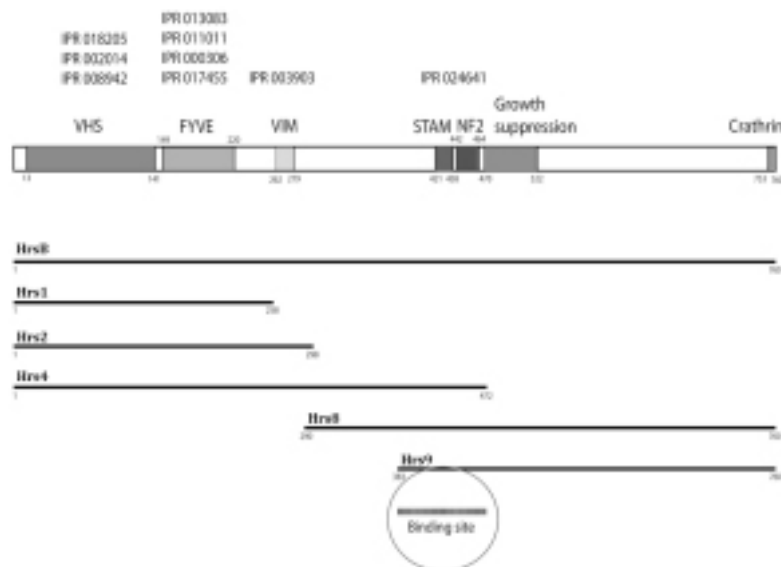


Рисунок 3. Локализация сайта связывания белка Hrs с фузомами сперматоцитов и ранних сперматид в сперматогенезе дрозофилы. STAM, NF2 и Growth suppression домены являются частями доменов Pro/Glu и coiled-coil.

Мутация и РНК-интерференция гена *Hrs* не вызывают нарушений цитокинеза в премейотических митозах и мейозах. Известно, что некоторые белки комплексов ESCRT принимают участие в цитокинезе (Carlton, Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007). Поскольку Hrs – член комплекса ESCRT-0, мы исследовали его роль в цитокинезе. Цитологический анализ семенников личинок, гомозиготных по *Hrs*^{D28}, семенников имаго линии *bam-GAL4>UAS-RNAi-Hrs* и мозаичных клонов линии *hs-FLP; Hrs*^{D28} *FRT/Ubi-GFP* не показал наличия в них полиплоидных сперматоцитов, являющихся показателем нарушений цитокинеза премейотических митозов. (Рис. 4). Таким образом, согласно результатам трех независимых экспериментов ни мутация, ни РНК-интерференция *Hrs* не нарушают цитокинеза премейотических митозов и мейозов.

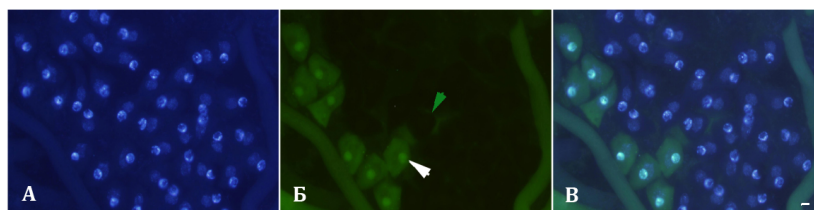


Рисунок 4. Анализ мозаичных клонов (линия *hs-FLP;Hrs*^{D28} *FRT/Ubi-GFP*). Окраска DAPI (А); сигнал GFP (локализация сигнала показана белой стрелкой) (Б); наложение изображений (В). Зеленой стрелкой отмечены клетки *hs-FLP; Hrs*^{D28} *FRT*, белой – клетки *hs-FLP; Ubi-GFP*. Масштаб – 10 микрон.

Спектр экспрессии изоформ транскриптов гена *Hrs* в семенниках, крыловых имагинальных дисках и ганглиях. Согласно базе данных Flybase, существуют 3 изоформы *Hrs*: *Hrs-RA*, *Hrs-RB* и *Hrs-RC* (Рис. 5А). Результаты ОТ-ПЦР анализ семенников, крыловых имагинальных дисков и ганглиев

дрозофилы (Рис. 5Б) показали, что изоформа *Hrs-RB* присутствует во всех исследованных тканях, в то время, как изоформы *Hrs-RA* и *Hrs-RC* оказались специфичными для семенников. РНК *Hrs-RC* отличается от РНК *Hrs-RB* только 5'-НТО; таким образом, трансляция *Hrs* может специфически регулироваться в ходе сперматогенеза. *RA* изоформе *Hrs* соответствует полученная в данной работе форма *Hrs δ* , в которой также отсутствуют домены, необходимые для заякоривания Hrs на эндосомах, но присутствует сайт связывания фузомах. Это может свидетельствовать о роли белковой формы Hrs-A в формировании и/или поддержании функции фузома в ходе сперматогенеза у дрозоды. Результаты *in situ* гибридизации мРНК *Hrs* в семенниках показывают, что экспрессия *Hrs* имеет место в раннем сперматогенезе, что коррелирует с нашими данными о том, что Hrs играет роль именно на стадии сперматоцитов (Рис. 6).

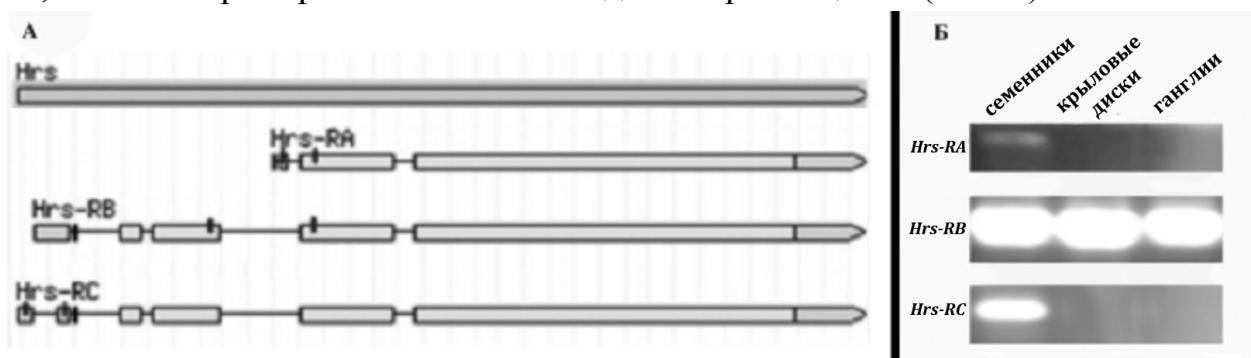


Рисунок 5. Спектр изоформ транскриптов гена *Hrs* в семенниках, крыловых имагинальных дисках и ганглиях дрозоды. (А) Экзонная структура изоформ *Hrs*; вертикальными штрихами показаны сайты посадки праймеров, использованных в ОТ-ПЦР анализе. (Б) Результаты ОТ-ПЦР: изоформы *Hrs-RA*, *Hrs-RB* и *Hrs-RC* обнаружены в семенниках; в крыловых имагинальных дисках и ганглиях обнаружена только изоформа *Hrs-RB* (Б).

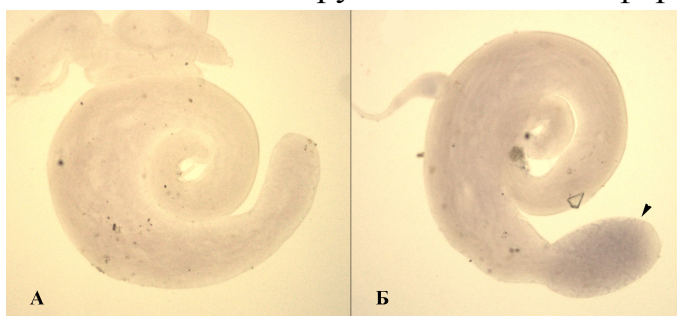


Рисунок 6. *In situ* гиридизация мРНК *Hrs* в семенниках дрозоды с использованием некомплементарного (отрицательный контроль) (А) и комплементарного (Б) зондов, меченных диоксибенинином. Стрелкой показана область локализации зонда.

Внутриклеточная локализация маркеров эндосом Rab4, Rab7 и Rab11 в сперматогенезе дрозоды. Исследуя локализацию Hrs в сперматогенезе дрозоды, мы ожидали обнаружить белок в области акросомы, однако Hrs обнаруживался только на эндосомах и фузомах.

Поскольку природа акросомогенеза не до конца изучена, мы провели анализ локализации маркеров разных типов эндосом Rab4, Rab7 и Rab11 в сперматогенезе дрозофилы. Оказалось, что все три исследованных белка локализуются в области формирующейся акросомы в сперматидях и на акросомах спермиев, что подтверждает гипотезу эндосомальной природы акросомы. Кроме того, было показано, что как и Hrs, Rab4 и Rab7 локализуются на фузомах сперматоцитов (Рис. 7).

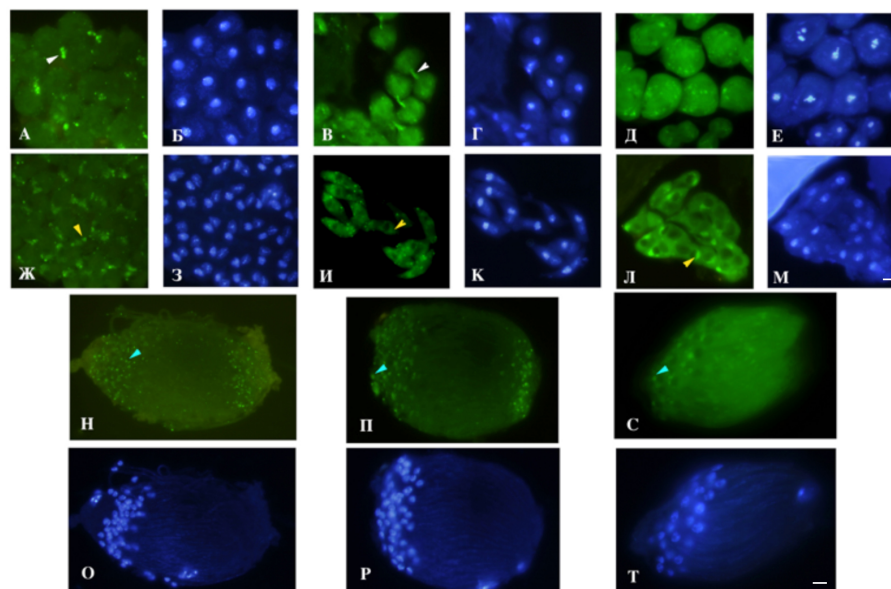


Рисунок 7. Локализация маркеров эндосом Rab4, Rab7 и Rab11 в сперматогенезе дрозофилы. В сперматоцитах Rab4 (А, Б) и Rab7 (В, Г) обнаруживаются на фузомах (показано белыми стрелками), в то время как Rab11 располагается на эндосомах в цитоплазме (Д, Е). На более поздних стадиях локализация Rab4, Rab7 и Rab11 изменяется: в сперматидях все три белка локализуются на эндосомах, формирующих акробласт (Ж-М; показано желтыми стрелками); в спермиях белки концентрируются на акросоме (Н-Т; показано голубыми стрелками). Масштаб – 10 микрон.

Влияние гена *Hrs* на поддержание D/V границы крылового имагинального диска. Эктопическая экспрессия гена *Hrs* под контролем драйверов *1096-GAL4* и *8609-GAL4* вызывает изменение формы, размеров и распределения жилочного материала крыла (Рис. 8). Также эктопическая экспрессия *Hrs* в крыле приводит к исчезновению крайних рядов сенсорных щетинок переднего края крыла (Рис. 9), что является следствием нарушения формирования и/или поддержания D/V границы крылового диска. Исчезновение сенсорных щетинок проявляется на уровне диска исчезновением паттерна экспрессии *Neuralized*, гена-мишени сигнального пути Wg, что свидетельствует о негативном воздействии эктопической экспрессии *Hrs* на активность сигнального пути Wg (Рис. 10). Данный феномен был показан также в работах других авторов (Seto, Bellen, 2006), однако в настоящее время механизм действия *Hrs* на сигнальный путь Wg не изучен.

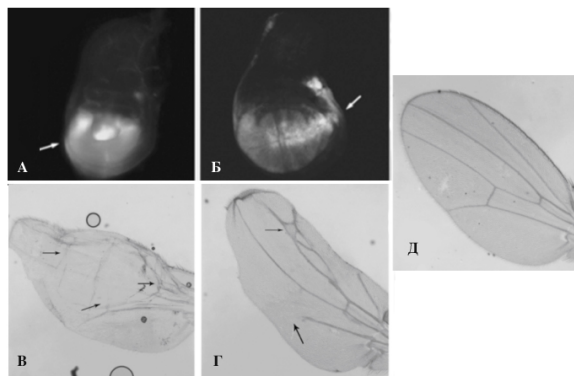


Рисунок 8. Фенотипические проявления эктопической экспрессии гена *Hrs* в крыле дрозофилы под контролем драйверов *1096-GAL4* (В) и *8609-GAL4* (Г) в сравнении с контролем (*UAST-Hrs* без драйверов) (Д). (А, Б) – паттерны экспрессии *1096-GAL4* и *8609-GAL4* в крыловом диске, соответственно.

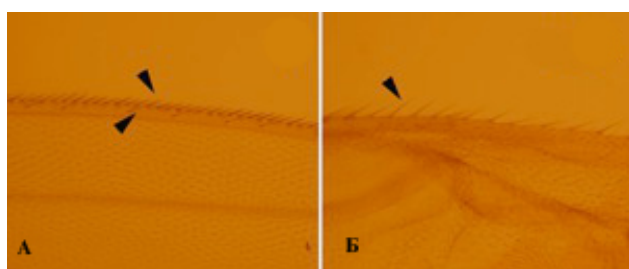


Рисунок 9. Влияние эктопической экспрессии гена *Hrs* под контролем драйвера *1096-GAL4* на формирование сенсорных щетинок переднего края крыла дрозофилы. По сравнению с контролем (линия *uw*) (А) у особей *1096-GAL4>UAST-Hrs* наблюдается частичное исчезновение сенсорных щетинок *triple-row* (Б).

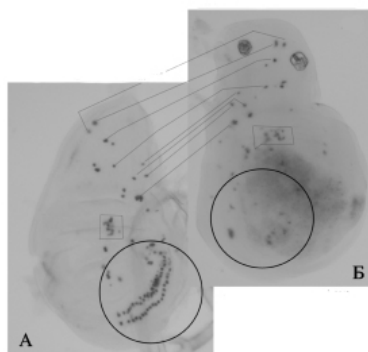


Рисунок 10. Влияние эктопической экспрессии гена *Hrs* под контролем драйвера *1096-GAL4* на экспрессию гена *Neuralized* в области D/V границы крылового имажинального диска дрозофилы. Кругом отмечен нормальный паттерн экспрессии гена *Neur* в районе подушки крыла (А). В дисках особей *1096-GAL4>UAST-Hrs>neur-LacZ* наблюдается исчезновение паттерна экспрессии гена *Neur* в области подушки крыла (Б).

В работе *Buceta et al.* (Buceta et al., 2007) важная роль в формировании D/V границы имажинального крылового диска отводится гену *Cut*, поддерживающему транскрипционную активность гена *Wg* и, одновременно,

снижающему активность сигнального пути *Wg* за счет транскрипционной регуляции гена *Armadillo* на D/V границе. С помощью иммуноокрашивания антителами против *Cut* и *in situ* гибридизации мРНК *Cut* дисков личинок *1096-GAL4>UAST-Hrs* мы показали, что эктопическая экспрессия гена *Hrs* вызывает изменения паттерна экспрессии *Cut*: в области экспрессии драйвера *1096-GAL4* мРНК и белок *Cut* распределены диффузно по всей почке крыла (Рис. 11). Изменение паттерна экспрессии *Cut* проявляется также аналогичным искажением паттерна экспрессии гена *Wg* (Рис. 12).

Поскольку *Cut* – ген-мишень сигнального пути *Notch*, можно предположить, что искажение паттерна его экспрессии является следствием изменения паттерна активности сигнального пути *Notch*. Из рисунка 13 видно, что эктопическая экспрессия *Hrs* в крыловом диске приводит к искажению паттерна экспрессии *Ap*, активность которого, как известно, необходима для поддержания экспрессии *Notch*. В то же время, негативное влияние на активность экспрессии *Ap* оказывает сигнальный путь *Wg*, который, таким образом, ограничивает паттерн *Ap* дорзальным компартментом крылового диска.

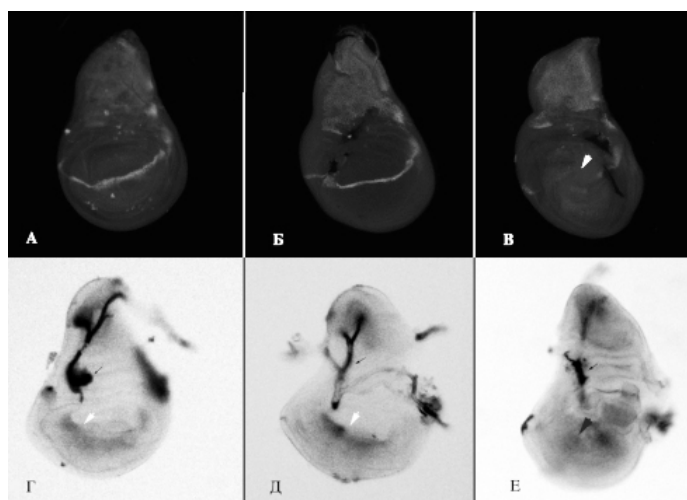


Рисунок 11. При эктопической экспрессии *Hrs* в почке крыла (В, Е) паттерн экспрессии *Cut* в диске искажается в сравнении с контролем (*yw* (А, Г) и *yw/1096-GAL4* (Б, Д)). (А-В) – иммунокрашивание крыловых дисков антителами к белку *Cut*; (Г-Е) – *in situ* гибридизация комплиментарного РНК-зонда DIG-*Cut* на мРНК *Cut* в крыловых дисках. Белыми стрелками (Г, Д) показан паттерн распределения мРНК *Cut* в норме; черной стрелкой (Е) показано искажение паттерна распределения мРНК *Cut*; тонкими черными стрелками показаны неспецифичные сигналы в трахее.

Таким образом, основываясь на результатах проведенных нами экспериментов, можно сделать вывод, что эктопическая экспрессия *Hrs* под драйвером *1096-GAL4* приводит к формированию эктопического паттерна экспрессии *Cut* в области, соответствующей экспрессии драйвера. Это может являться следствием положительного влияния *Hrs* на активность сигнального

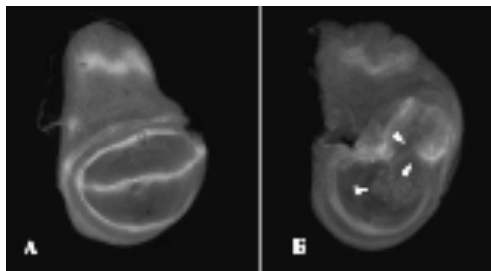


Рисунок 12. При эктопической экспрессии *Hrs* в почке крыла (Б) паттерн экспрессии *Wg* в диске искажается в сравнении с контролем (*yw*) (А). Стрелкой показано искажение паттерна экспрессии *Wg*.

пути Notch (Halder et al., 2006; Knoblich, Gallagher, 2006). В свою очередь эктопическая экспрессия *Cut* приводит к снижению активности сигнального пути *Wg* и, следовательно, к снижению транскрипционной активности генов *Ser* и *Dl* и *Ac* и *Sc*, что приводит к исчезновению маргинальных щетинок, и эктопической активации гена *Ap* в вентральном компартменте крылового диска (Рис. 13), за счёт чего осуществляется положительная обратная связь между сигнальными путями Notch и *Wg* (Рис. 14).

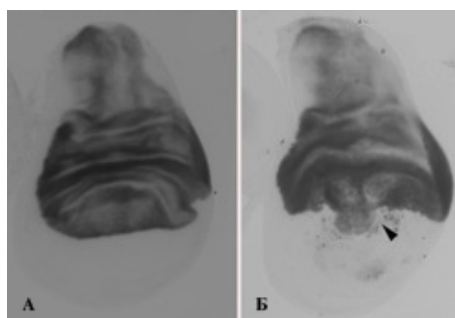


Рисунок 13. Влияние эктопической экспрессии гена *Hrs* под контролем драйвера *1096-GAL4* на паттерн экспрессии гена *Ap* в крыловом имажинальном диске дрозофилы. В норме ген *Ap* экспрессируется в дорзальном компартменте диска (А). В дисках особей линии *1096-GAL4>UAST-Hrs>ap-LacZ* наблюдается искажение паттерна экспрессии гена *Ap* на D/V границе (Б).

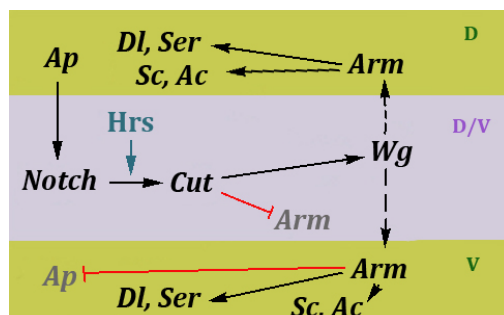


Рисунок 14. Путь воздействия *Hrs* на активность сигнального пути *Wg* в крыловом имажинальном диске дрозофилы. D/V – D/V граница, D и V – соответственно, дорзальный и вентральный компартменты крылового диска. Серым обозначены неактивные гены; голубым обозначен *Hrs* и его предполагаемая точка воздействия на сигнальный путь Notch; чёрными

стрелками показана положительная регуляция активности экспрессии генов, красными затуплёнными стрелками показана негативная регуляция активности экспрессии генов, пунктирной стрелкой схематично обозначено действие сигнального пути Wg.

Влияние гена *Hrs* на поддержание А/Р границы крылового имагинального диска. Как уже было сказано, одним из проявлений снижения активности сигнального пути Wg при эктопической экспрессии *Hrs* является экспансия паттерна экспрессии *Ap* в вентральную область крылового диска (Рис. 13). Вместе с тем, повышенная активность гена в области пересечения D/V и А/Р границ указывает на влияние *Hrs* на формирование или поддержание А/Р границы. Данное наблюдение было отмечено нами в работе 2012 года. В статье (Fan et al., 2014) было показано, что *Hrs*, связывая молекулу Smothened, оказывает негативное воздействие на сигнальный путь Nn на ранних этапах формирования крылового диска и таким образом влияет на формирование А/Р границы. Наш эксперимент (Рис. 15) показал, что в условиях эктопической экспрессии *Hrs* размеры области локализации *Ptc* в диске увеличиваются. Поскольку в эксперимент был взят драйвер *1096-GAL4*, активизирующийся в конце 2 личиночной стадии, эффект на паттерн *Ptc* *Hrs* указывает на участие последнего в поддержании А/Р границы крылового диска.

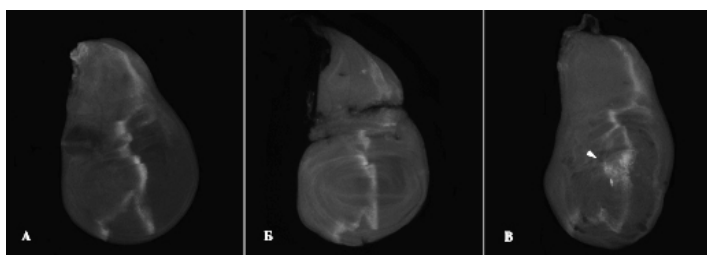


Рисунок 15. Распределение белка *Ptc* в имагинальных крыловых дисках контрольных линий *uw* (А) и *1096-GAL4* (Б) и при эктопической экспрессии гена *Hrs* под контролем драйвера *1096-GAL4* (В). Размеры области локализации белка *Ptc* в зоне повышенной экспрессии гена *Hrs* увеличена по сравнению с контролем (белая стрелка).

Роль гена *Hrs* на поздних этапах развития крыла. Эктопическая экспрессия трансгена *UAS-RNAi-Hrs* под контролем драйверов *1096-GAL4*, *7405-GAL4*, *8609-GAL4* и *3041-GAL4* фенотипически проявлялась существенным утолщением продольных жилок, что может свидетельствовать о снижении активности сигнального пути Notch, поддерживающего статус клеток межжилок, и/или увеличении активности сигнального пути EGFR, необходимого для формирования жилок. Поскольку *Hrs* характеризуется высокой стабильностью и сильным материнским эффектом (Lloyd et al., 2002), эффект РНК-интерференции, наблюдаемый данным эксперименте, проявляется на стадии куколки, что свидетельствует об участии *Hrs* в регуляции процесса

сужения про-жилок крыла. Кроме того, РНК-интерференция проявляется уменьшением размеров крыла и, в некоторых случаях, изгибанием крыла (7405-GAL4, 8609-GAL4) или разобщение вентральной и дорзальной поверхностей крыла (3041-GAL4), что может указывать на нарушение синхронизации развития противоположных поверхностей органа (Рис. 16).

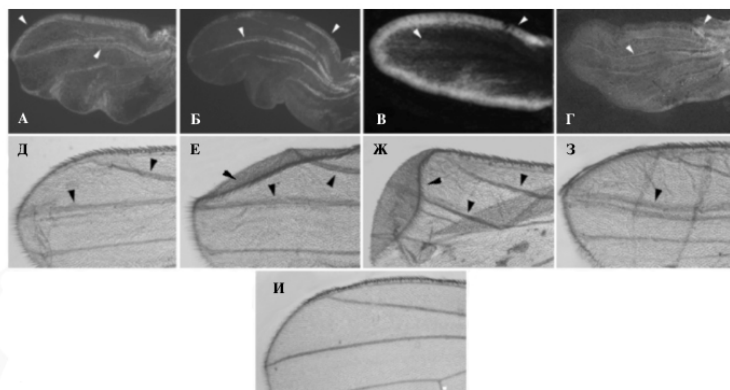


Рисунок 16. Фенотипические проявления РНК-интерференции гена *Hrs* в крыле дрозофилы при экспрессии *UAST-RNAi-Hrs* под контролем драйверов 1096-GAL4 (Д), 7405-GAL4 (Е), 8609-GAL4 (Ж) и 3041-GAL4 (З) по сравнению с контролем (*yw;UAST-RNAi-Hrs*) (И). Крылья располагаются вентральной поверхностью вверх. Стрелками указаны аномалии (утолщения жилок, эктопический жилочный материал); также в (Е, Ж) наблюдается искажение формы крыловой пластинки, в (З) – разобщение дорзальной и вентральной поверхностей крыла. (А-Г) – паттерн экспрессии драйверов 1096-GAL4 (А), 7405-GAL4 (Б), 8609-GAL4 (В), 3041-GAL4 (Г) в крыле куколки.

Эктопическая экспрессия гена *Hrs* усиливает эффект трансдетерминации клеток крыла дрозофилы. Эктопическая экспрессия гена *Eyeless* в крыловом имагинальном диске стимулирует процесс трансдетерминации (Halder et al., 1995) и формирование эктопического глаза (Рис. 17А). На уровне развивающегося диска клетки, подвергающиеся трансдетерминации, можно идентифицировать по экспрессии гена *Elav*. (Рис. 17В). Наши эксперименты показали, что ко-экспрессия *Hrs* и *Eu* под контролем драйвера 1096-GAL4 приводит к более явному искажению паттерна экспрессии *Wg* (Рис. 17Д), образованию более многочисленных, по сравнению с особями 1096-GAL4>*UAST-Eu*, скоплений *Elav*-положительных клеток (Рис. 17Е) и увеличению эктопического глаза (Рис. 17Г). Из литературных данных следует, что при развитии нормального глаза *Wg* и *Eu* действуют антогонистически (Lee, Treisman, 2001). Таким образом, влияние эктопической экспрессии *Hrs* на активность процесса трансдетерминации клеток крыла в клетки глаза дополнительно подтверждает влияния *Hrs* на активность сигнального пути *Wg*.

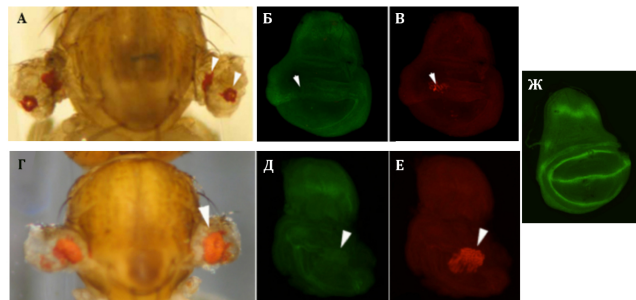


Рисунок 17. Эктопическая экспрессия гена *Eya* под контролем драйвера *1096-GAL4* приводит к формированию тканей глаза в области крыла (А), при этом в крыловом имагинальном диске искажается паттерн экспрессии гена *Wg* (Б), и активируется экспрессия гена *Elav* (В). Эктопическая ко-экспрессия *Eya* и *Hrs* под контролем драйвера *1096-GAL4* приводит к видимому увеличению размеров эктопических глаз (Г). Искажение паттерна экспрессии *Wg* ярко выражено, а область эктопической экспрессии *Elav* увеличивается в размерах (Е). (Ж) – паттерн экспрессии *Wg* в контроле (линия *uw*).

ВЫВОДЫ

1. Получены линии *D. melanogaster* с геномными встройками, кодирующими полноразмерную форму и 5 усеченных форм гена *Hrs*, маркированные GFP и экспрессирующиеся под контролем регуляторного элемента UASp. Исследование полученных линий показало, что химерный белок GFP-Hrs локализуется в процессе сперматогенеза на фузомах сперматоцитов, но не на акросомах, как ожидалось исходя из исследований акросомогенеза млекопитающих (Berruti, Paiardi, 2011). Сайт связывания Hrs с фузой локализован между 383 и 472 аминокислотными остатками.
2. Показано что Hrs не принимает участие в регуляции цитокинеза в сперматогенезе *D. melanogaster*.
3. Показано, что ген Hrs экспрессируется на ранних этапах сперматогенеза, причем, для генеративных тканей самцов дрозофилы характерно наличие всех изоформ РНК гена *Hrs*, анонсированных в базе данных FlyBase. Поскольку изоформа Hrs-RA, для которой характерно отсутствие N-концевых доменов, вовлеченных в связывание белка с эндосомами, практически идентична полученной в данной работе усеченной форме Hrs8, на основании полученных данных было выдвинуто предположение, что белковый продукт Hrs-RA играет специфическую роль в поддержании структуры и/или функции фузом сперматоцитов.
4. Обнаружено, что маркеры эндосом Rab4, Rab7 и Rab11 локализуются в области акросомы, что является подтверждением эндосомальной теории акросомогенеза. Кроме того, на ранних стадиях сперматогенеза Rab4 и Rab7 подобно Hrs обнаруживаются на фузомах.

5. Показано, что *Hrs* оказывает негативное действие на активность сигнального пути Wg опосредованно через формирование паттерна экспрессии гена *Cut*, и таким образом влияет на поддержание D/V границы крылового имагинального диска, причем данный эффект обнаруживается не только в процессе нормального развития клеток крылового диска, но и в процессе трансдетерминации клеток крыла в клетки глаза. Выявлена роль *Hrs* в поддержании A/P границы на поздних этапах развития крылового диска. Также обнаружено, что *Hrs* имеет функцию на более поздних этапах развития крыла в процессе сужения жилок крыла (vein refinement) и, возможно, поддержания синхронности формирования дорзальной и вентральной поверхностей крыла.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи:

1. Копыл С.А., Дубатолова Т.Д., Волкова Е.И., **Мариловцева Е.В.**, Омелянчук Л.В. Влияние морфогена Wg на формирование эктопического глаза у *Drosophila melanogaster*. Генетика, 2011, том 47, № 8, с.1026–1031
2. **Мариловцева Е.В.**, Омелянчук Л.В. Р-элемент как инструмент анализа генома и протеома *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2011, том 15, № 2, с.585-595.
3. Копыл С.А., Дубатолова Т.Д., **Мариловцева Е.В.**, Омелянчук Л.В. Роль гена Hrs в формировании крыла *Drosophila melanogaster*. Генетика, 2012, том 48, № 9, с.1039-1045.
4. **Мариловцева Е.В.**, Омелянчук Л.В. О роли гена Hrs в поддержании границ компартментов крылового имагинального диска *Drosophila melanogaster*. Генетика, 2015, том 51, № 10, с.1207-1211.
5. **Мариловцева Е.В.**, Дубатолова Т.Д., Галимова Ю.А., Копыл С.А., Омелянчук Л.В. Исследование клеточной локализации HRS и других маркеров эндосом в сперматогенезе *Drosophila melanogaster* с помощью химерных GFP конструкторов. Цитология, 2015, том 57, №7, с. 509-517.

Тезисы конференций:

6. **Мариловцева Е.В.**, Копыл С.А., Дубатолова Т.Д., Омелянчук Л.В. Роль гена *Hrs* в развитии *Drosophila melanogaster*. Сборник трудов международной конференции «Хромосома 2012». 2-7 сентября, 2012, Новосибирск, с. 135.
7. Копыл С.А., Дубатолова Т.Д., **Мариловцева Е.В.**, Омелянчук Л.В. “Роль гена *Hrs* в формировании крыла *Drosophila melanogaster*». Сборник трудов III Съезда Общества Клеточной Биологии. 16-18 октября, 2012, Санкт-Петербург, с. 11.