



Роль белка Pnut и его функциональных доменов в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*

К.А. Ахметова^{1,2}, Н.В. Дорогова¹, Е.У. Болоболова¹, И.Н. Чесноков², С.А. Федорова^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Университет Алабамы в Бирмингеме, Бирмингем, США

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Белок Pnut дрозофилы принадлежит к семейству септинов – консервативных ГТФаз, участвующих в цитокinesis и других фундаментальных клеточных процессах. В связи с их способностью формировать комплексы, которые могут затем полимеризоваться в филаменты, 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. Ранее нами было показано, что удаление септина, кодируемого геном *peanut* (*pnut*), в соматических тканях приводит к аномалиям митоза. Задачей данной работы было выяснение роли *pnut* в сперматогенезе дрозофилы. Нами была получена плазмидная конструкция для РНК-интерференции *pnut*, позволяющая эктопически подавлять экспрессию данного гена. Был исследован сперматогенез при подавлении экспрессии гена *pnut* при помощи РНК-интерференции. Установлено, что чувствительными к РНК-интерференции гена *pnut* являются генеративные клетки на самых ранних этапах сперматогенеза: снижение уровня экспрессии данного гена в генеративных клетках семенников на этих стадиях приводило к стерильности самцов, причиной которой является неподвижность спермиев. При этом в семенниках таких стерильных самцов не обнаружено сколь-нибудь значимых нарушений мейоза и последующего морфогенеза, структура аксонемы и митохондрий спермиев нормальная. Также проанализирован сперматогенез у мутантов по различным доменам белка Pnut на фоне нуля-аллеля. Показано, что мутации в ГТФазном домене приводят к нарушениям элонгации цист. У мутантов с делецией С-концевого домена обнаруживаются нарушения в морфологии семенника. Для обоих классов мутантов также показаны неподвижность спермиев и стерильность самцов. Таким образом, выявлено участие Pnut в спермиогенезе – заключительных этапах сперматогенеза, на которых происходит изменение морфологии сперматоцитов.

Ключевые слова: дрозофила; РНК-интерференция; сперматогенез; септины; *peanut*; Pnut.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ахметова К.А., Дорогова Н.В., Болоболова Е.У., Чесноков И.Н., Федорова С.А. Роль белка Pnut и его функциональных доменов в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):65-71. DOI 10.18699/VJ16.104

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Akhmetova K.A., Dorogova N.D., Bolobolova E.U., Chesnokov I.N., Fedorova S.A. The role of Pnut and its functional domains in *Drosophila* spermatogenesis. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):65-71. DOI 10.18699/VJ16.104

УДК 575.164:576.31

Поступила в редакцию 06.07.2015 г.

Принята к публикации 17.12.2015 г.

© АВТОРЫ, 2016



e-mail: fsveta@bionet.nsc.ru

The role of Pnut and its functional domains in *Drosophila* spermatogenesis

K.A. Akhmetova^{1,2}, N.D. Dorogova¹,
E.U. Bolobolova¹, I.N. Chesnokov², S.A. Fedorova^{1,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² University of Alabama at Birmingham, Birmingham, USA

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Drosophila Pnut protein belongs to the family of septins, conservative GTPases participating in cytokinesis and many more other fundamental cellular processes. Because of their filamentous appearance, membrane association and functions, septins are considered as the fourth component of the cytoskeleton, along with actin, microtubules and intermediate filaments. However, septins are much less studied than the other cytoskeleton elements. We had previously demonstrated that deletion of the *peanut* (*pnut*) gene leads to mitotic abnormalities in somatic cells. The goal of this work was to study the role of *pnut* in *Drosophila* spermatogenesis. We designed a construct for *pnut* RNA interference allowing *pnut* expression to be suppressed ectopically. We analyzed the effect of *pnut* RNA interference on *Drosophila* spermatogenesis. The most sensitive to Pnut depletion were germ line cells at the earliest stages of spermatogenesis: the suppression of *pnut* expression at these stages leads to male sterility as a result of immotile sperm. Testes of those sterile males did not show any significant meiotic defects; axonemes and mitochondria were normal. We also analyzed the effect of mutations in Pnut conservative domains on *Drosophila* spermatogenesis. Mutations in the GTPase domain resulted in cyst elongation defects. Deletions of the C-terminal domain led to abnormal testis morphology. Both GTPase domain and C-terminal domain mutant males were sterile and produced immotile sperm. To summarize, we showed that Pnut participates in spermiogenesis, that is, late stages of spermatogenesis, when major morphological changes in spermatocytes occur.

Key words: *Drosophila*; RNA interference; spermatogenesis; septin; *peanut*; Pnut.

Септины представляют собой группу консервативных ГТФ-связывающих белков, встречающихся у всех эукариот, за исключением высших растений (Сао et al., 2007). Биологическая функция септинов связана с их способностью образовывать друг с другом гетероолигомерные комплексы, которые в свою очередь формируют длинные полимеры (филаменты) (Sirajuddin et al., 2007; McMuray et al., 2011). Септины участвуют в цитокинезе, установлении и поддержании внутриклеточной полярности, функционировании микротрубочкового и актинового цитоскелета, клеточном движении, везикулярном транспорте, экзоцитозе, нейрогенезе и других процессах (Saarikangas, Barral, 2011; Mostowy, Cossart, 2012). Для септинов характерно наличие консервативного ГТФазного домена, который, как показывают последние исследования, играет важную роль в динамике септиновых структур внутри клетки (Sirajuddin et al., 2009; Zent, Wittinghofer, 2014; Akhmetova et al., 2015). На С-конце септинов в большинстве случаев располагается биспиральный домен, ответственный за белок-белковые взаимодействия. В связи с филаментной организацией и выполняемыми функциями в последние годы септины стали рассматривать как новый компонент цитоскелета (Mostowy, Cossart, 2012).

У дрозофилы известно пять представителей данного семейства, Pnut, Sep1, Sep2, Sep4 и Sep5. Ранее было показано, что септин, кодируемый геном *peanut* (*pnut*), участвует в цитокинезе соматических клеток (Neufeld, Rubin, 1994). Мы показали, что мутации по данному гену, помимо дефектов цитокинеза, также вызывают нарушения сегрегации хромосом, что приводит к аномалиям плоидности в соматических клетках, однако пролиферация генеративных клеток у мутантов остается незатронутой (Ахметова, Федорова, 2011). В данной работе изучено влияние продукта гена *pnut* и его функциональных доменов на сперматогенез дрозофилы.

Материалы и методы

В работе использовали линию *Drosophila melanogaster* дикого типа *Hikone AW* из фонда сектора генетики клеточного цикла ИЦиГ СО РАН. Линия *w;T4+/CyO;bam-Gal4/VP16* была любезно предоставлена П.П. Лактионовым из ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Остальные линии были получены из стокового центра Блумингтон (Bloomington Drosophila Stock Center), США: № 5687: *pnut^{XP}/T(2;3)SM6a-TM6B,Tb¹* – нуль-аллель гена *peanut*;

№ 4414: *y¹w^{*};P{Act5C-GAL4}25FOI/CyO,y⁺* – повсеместный драйвер *Actin5C-GAL4*;

№ 5138: *yw^{*};P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7/TM3,Sb¹Ser¹* – повсеместный драйвер *tubulin-GAL4*;

№ 4937: *w¹¹¹⁸;P{GAL4::VP16-nos.UTR}CG6325^{MVD1}* – драйвер *nanos-GAL4*, специфический для генеративных клеток;

№ 13134: *w¹¹¹⁸;P{GTI}chif^{BG02820a}/CyO* – драйвер *chif-GAL4*.

Линии, экспрессирующие полноразмерную копию гена *pnut* дикого типа, а также мутантные формы гена (табл. 1) были любезно предоставлены д-р Чесноковым (г. Бирмингем, США) и описаны в статье Ахметовой с коллегами (Akhmetova et al., 2015). Все конструкторы встроены под

1,7 кб 5' UTR *pnut* (предполагаемый промотор) и содержат FLAG-эпитоп на 5'-конце. Наличие экспрессии Pnut было проверено для всех линий при помощи Вестерн-блота с использованием антител на Pnut и FLAG-эпитоп.

Получение плазмидной конструкции и трансгенной линии мух для проведения РНК-интерференции гена *pnut* описано ранее (Ахметова и др., 2015).

Препараты для иммуногистохимического окрашивания и электронно-микроскопического анализа готовили по Pertceva et al. (2010). В работе использовали первичные антитела: rabbit anti-Pnut (1 : 1000) (Huijbregts et al., 2009); вторичные антитела: goat anti-rabbit Alexa 488 fluor (Molecular Probes®, США, 1 : 1000). Микроскопический анализ проводили в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН на микроскопе Axioscope 2 plus (Zeiss). Ультроструктурный анализ проводили на микроскопе TEM Libra120 (Zeiss).

Результаты

Анализ нарушений сперматогенеза при эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut*

Гомозиготы, несущие нуль-аллель по гену *pnut*, гибнут на стадии куколки, поэтому для изучения функции этого гена в сперматогенезе нами ранее была создана плазмидная конструкция *pUASP-pnut_RNAi* для проведения РНК-интерференции гена *pnut* и получены соответствующие трансгенные линии дрозофилы (Ахметова и др., 2015). Для анализа экспрессии гена *pnut* в норме и при подавлении экспрессии данного гена при помощи созданной нами РНК-интерференционной плазмиды использовали метод вестерн-блоттинга с применением антител на белок Pnut, а также антител на β-тубулин для контроля загрузки. На рис. 1 показано, что при запуске при помощи повсеместного драйвера *tubulin-Gal4* РНК-интерференция *pnut* приводила к снижению количества продукта гена в семенниках, тогда как количество контрольного белка (β-тубулин) оставалось неизменным. Таким образом, созданная нами плазмидная конструкция является функциональной.

Был проведен цитологический и морфологический анализ сперматогенеза дрозофилы в норме и при подавлении экспрессии, запускаемой повсеместными драйверами *Actin5C-GAL4*, *tubulin-GAL4*, а также специфичными для генеративных клеток драйверами *nanos-GAL4* и *bam-GAL4*. При подавлении экспрессии драйверами *Actin5C-GAL4*, *tubulin-GAL4* и *nanos-GAL4*, экспрессирующимися на всех стадиях сперматогенеза, включая самые ранние, наблюдали идентичный эффект: примерно в 60 % семенных пузырьков сперматозоиды были неподвижны (табл. 2). 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 в поздних стадиях, в ходе спермиогенеза, выражаясь в неподвижности спермиев.

Таблица 1. Трансгенные линии мух, использованные в работе

Линия	Характеристика
<i>FLAG-pnutWT</i>	Полноразмерная копия Pnut (1–539 аминокислот)
<i>FLAG-pnut(1–427)</i>	Укороченная копия Pnut (1–427 аминокислот)
<i>FLAG-pnut(1–460)</i>	Укороченная копия Pnut (1–460 аминокислот)
<i>FLAG-pnut(G4)</i>	Pnut с мутацией в G4 мотиве ГТФазного домена
<i>FLAG-pnut(G1, G3, G4)</i>	Pnut с мутациями в G1, G3 и G4 мотивах ГТФазного домена

Цитологические аномалии сперматогенеза при проведении РНК-интерференции *pnut* встречались с низкой частотой и не могли быть причиной стерильности спермиев. Чтобы выяснить причины неподвижности спермиев при эктопическом подавлении экспрессии гена *pnut*, был проведен электронно-микроскопический анализ семенников, выделенных из стерильных самцов. Для подвижности сперматозоида наиболее важны аксонема, митохондрии и базальное тело. Мы показали, что структура аксонемы и митохондрий у мутантов не отличалась от нормы. Однако структура базального тела у мутантов и дикого типа отличалась. 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 центриольным придатком (centriolar adjunct). Он напоминает перичентриольный материал centrosом, однако функции этой структуры до сих пор не выяснены. На рис. 2 видно, что центриольный придаток у мутантов имеет больше лопастей (похож на фейерверк), причем его реструктуризация к более поздним стадиям развития сперматиды (в норме он постепенно принимает округлую форму и вакуолизируется) запаздывает. На стадиях спермиогенеза, когда ядро имеет вытянутую форму, у мутантов по гену *pnut* центриольный придаток продолжает быть вытянутым (рис. 2, б).

Изучение роли функциональных доменов Pnut

РНК-интерференция подавляет экспрессию гена, но не позволяет получить данные о функциональных доменах продукта данного гена. Для выявления вклада различных доменов Pnut использовали мутантов по консервативным мотивам и участкам белка (рис. 3). В работе исследовали одиночную мутацию в консервативном мотиве G4 ГТФазного домена белка Pnut(G4), а также тройной мутант *Pnut(G1, G3, G4)*, при этом консервативные аминокислоты были заменены на аланины. Кроме того, анализировали делеционные формы белка Pnut, Pnut(1–427) и Pnut(1–460), с нарушенным С-концевым доменом.

Ранее было показано, что экспрессия трансгена *FLAG-pnutWT*, несущего копию гена *pnut* дикого типа, восстанавливает жизнеспособность нуль-аллеля *pnut^{XP}*, летального в третьем личиночном возрасте. Введение трансгенов *FLAG-pnut(1–427)* или *FLAG-pnut(1–460)*, содержащих делецию С-концевого участка белка, а также трансгенных копий гена *pnut*, (*FLAG-pnut(G4)* и *FLAG-pnut(G1, G3, G4)*), мутантных по ГТФазному домену, не

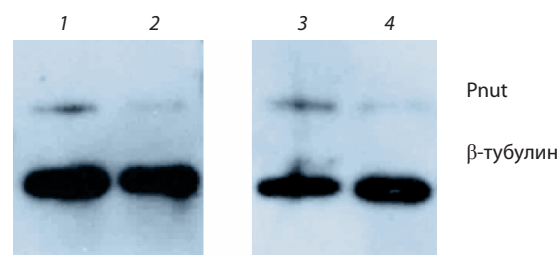


Рис. 1. Проверка уровня экспрессии *pnut* при проведении РНК-интерференции.

Показаны результаты Вестерн-блота экстракта семенников. Используются антитела на Pnut (Huijbregts et al., 2009), а также на β-тубулин (E7, DSHB) для контроля загрузки.

1 – контроль: *tubulin-GAL4/Sb*; 2 – *pUASP-W-pnut_RNAi/tubulin-GAL4*; 3 – контроль: *pUASP-W-pnut_RNAi/Sb*; 4 – *pUASP-W-pnut_RNAi/tubulin-GAL4*.

спасало делецию *pnut^{XP}* до стадии имаго (Akhmetova et al., 2015). Описанные эксперименты по спасению фенотипа летальной мутации *pnut^{XP}* проводили непосредственно после первой балансировки только что полученных трансгенных встроек, и 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, которые в первоначальном эксперименте (Akhmetova et al., 2015) не удалось спасти, стало появляться незначительное количество мух, доживающих до стадии поздней куколки и даже имаго, но с сильно ослабленной жизнеспособностью. Это позволило нам изучить эффект данных мутаций на процесс сперматогенеза дрозофилы.

С использованием антител на Pnut была исследована локализация белка Pnut в мутантных семенниках. В норме, а также при спасении нуль-аллеля *pnut^{XP}* трансгеном дикого типа *FLAG-pnutWT* Pnut локализуется кортикально, формируя пунктирный паттерн (рис. 4, а). Обе укороченные формы Pnut с делецией С-концевого домена имели тенденцию формировать «агрегаты», которые не обнаруживали характерного паттерна локализации, как показано на примере *FLAG-pnut(1–427)* (рис. 4, б). Мутации в ГТФазном домене Pnut также нарушали правильную локализацию белка, при этом специфическая пунктирная мембранная окраска отсутствовала и обнаруживалась диффузная окраска по всей цитоплазме клеток семенников (рис. 4, в, а также Akhmetova et al., 2015). Таким образом, можно заключить, что как С-концевой, так и ГТФазный

Таблица 2. Анализ на подвижность спермиев при 24 °C

Генотип	Просмотрено самцов	Сперма		
		подвижная	неподвижная	частично подвижная + примечания
<i>nanos-GAL4/pnut-RNAi</i>	46	17	5	24, один семенной пузырь с подвижной спермой, другой – с неподвижной
<i>bam-GAL4/pnut-RNAi</i>	13	10	1	2, один семенной пузырь с подвижной спермой, другой – с неподвижной
<i>chif-GAL4/pnut-RNAi</i>	10	8	1	1, один семенной пузырь с подвижной спермой, другой – с неподвижной
<i>Actin5C-GAL4/pnut-RNAi</i>	30	12	–	8, один семенной пузырь с подвижной спермой, другой – с неподвижной 10, частично подвижные спермии
<i>tubulin-GAL4/pnut-RNAi</i>	22	8	2	12, один семенной пузырь с подвижной спермой, другой – с неподвижной
<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

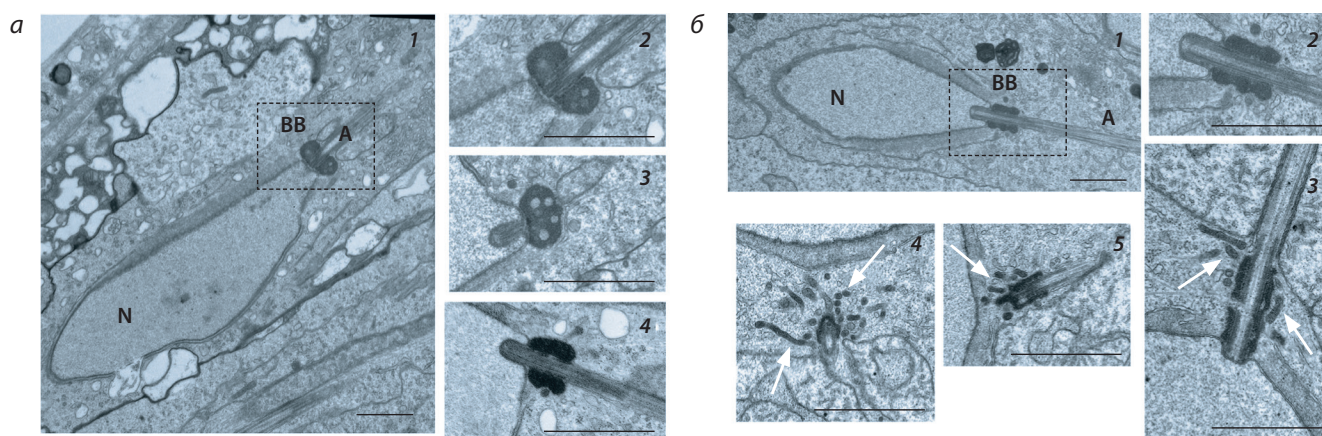


Рис. 2. Электронно-микроскопический (ЭМ) анализ базального тела сперматид.

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 участка 1, выделенного пунктиром); 3 – срез сильно по касательной к аксонеме; 4 – продольный аксонеме срез, стадия сперматиды чуть более ранняя, чем на 1–3. Структура центриольного придатка, окружающего базальное тельце, округлая, внутри видны вакуоли. Чем более продвинутая стадия сперматиды, тем более округлым выглядит центриольный 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. Центриольный придаток сильно вытянут, неровной формы, вокруг него множество включений (стрелки). Масштаб: 1 мкм.

домены важны для правильной локализации белка *in vivo* в семенниках дрозофилы.

Генетические тесты на стерильность показали, что самцы *pnut^{XP}*, экспрессирующие трансгены 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. 2). Нарушения цитокinesis 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)*, а также *FLAG-pnut(1–460)*, помимо непод-

вижных спермиев, ярким нарушением была форма семенников, которые в 70–80 % случаев были недоразвиты и выглядели как личиночные, при этом они не контактировали с семенными пузырьками (рис. 5). Однако в этих шаро- и грибообразных семенниках шли все процессы, характерные для сперматогенеза: генеративные клетки делились, вступали в мейоз, после чего начинался спермиогенез, завершающийся образованием нормальных на вид сперматозоидов, которые никуда затем не двигались. Подвижность этих сперматозоидов оценить не удалось, так как для анализа подвижности используется сперма из семенного пузырька, а в случае мутантов он часто был пустым из-за отсутствия контакта с остальной частью

семенника. В сперматогенезе этих мутантов встречаются также нарушения цитокинеза, но они не являются существенными и значимыми для фертильности.

В сперматогенезе у тройного ГТФазного мутанта *pnut^{XP};FLAG-pnut(G1, G3, G4)* также проявляются нарушения цитокинеза, однако они не критичны. Самые значительные нарушения происходили на пост-мейотических стадиях во время элонгации сперматид. У мутантов часто была нарушена элонгация и/или поляризация цист, что приводило к формированию цист с хаотично разброшенными ядрами.

Обсуждение

Запуская РНК-интерференцию гена *pnut* с помощью драйвера *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. При использовании других драйверов было также выявлено, что чувствительными к РНК-интерференции гена *pnut* являются генеративные клетки на ранних этапах сперматогенеза, возможно, затронуты первые митотические деления. Однако эффект снижения экспрессии гена *pnut* проявляется гораздо позже, в спермиогенезе, и выражается в неподвижности спермиев.

Аналогичные исследования проводились на млекопитающих. Было показано, что у млекопитающих белки SEPT4 и SEPT7 (гомолог Pnut) необходимы для формирования особой кольцеподобной мембранной структуры – аннулуса, которая разделяет хвост на различающиеся компартменты. У нокаутных по *SEPT4* мышей наблюдались аномальное формирование или отсутствие аннулуса, нарушение ультраструктурной организации митохондрий, приводящие к неподвижности спермиев и стерильности (Kissel et al., 2005; Lhuillier et al., 2009). Однако в сперматозоидах дрозофилы структуры, подобной аннулусу, не наблюдается. Более того, мы обнаружили, что при подавлении экспрессии *pnut* у дрозофилы ультраструктура митохондрий и аксономы

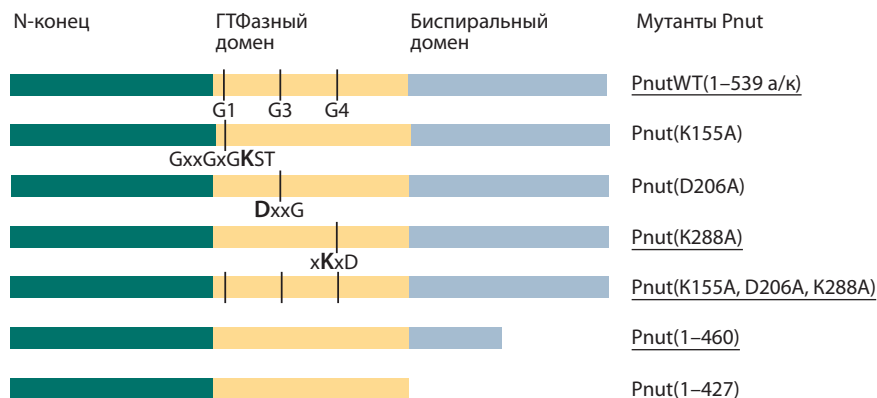


Рис. 3. Доменная структура белка Pnut.

Слева – схематическое изображение доменной структуры Pnut; справа – мутации в консервативных доменах. Консервативные аминокислоты в G1, G3 и G4 мотивах ГТФазного домена (выделены) были заменены на аланины. Мутанты, использованные в работе, подчеркнуты.

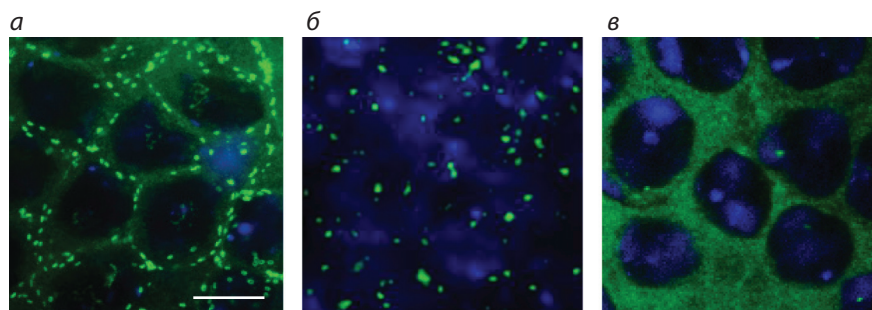


Рис. 4. Мутации в функциональных доменах Pnut нарушают правильную локализацию белка *in vivo*: а – пунктирное кортикальное распределение белка в семенниках дикого типа, окрашенных антителами на Pnut; б – нарушения локализации и распределения белка Pnut у мутантов с делецией C-концевого домена Pnut (*pnut^{XP};FLAG-pnut(1-427)*); в – диффузная локализация Pnut в семенниках мутантов по ГТФ-связывающему домену (*pnut^{XP};FLAG-pnut(G4)*). Зеленый – окраска на Pnut, синий – окраска ДНК DAPI. Масштаб: 10 мкм.

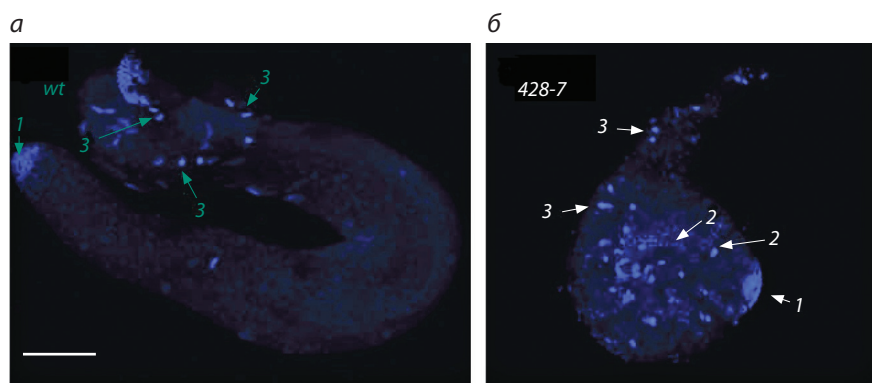


Рис. 5. Нарушения сперматогенеза у мутантов с делецией C-концевого домена Pnut: а – семенники взрослых самцов дикого типа; б – шаровидные семенники мутантных взрослых самцов *pnut^{XP};FLAG-pnut(1-427)*, не контактирующие с семенными пузырьками. Стрелками отмечены митотические деления генеративных клеток (стрелка 1), мейоз (стрелка 2), спермиогенез, завершающийся образованием сперматозоидов (стрелка 3). ДНК окрашена DAPI. Масштаб: 100 мкм.

(основных компонентов, отвечающих за подвижность спермиев) оставалась интактной. Помимо митохондрий и аксоны, в обеспечении подвижности сперматозоида принимает участие базальное тело, которое представляет собой модифицированную центриоль. После мейоза каждая гаплоидная сперматид 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 аксоны 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 центриолярным придатком (centriolar adjunct), которая напоминает перичентриолярный материал центросом. Центриолярный придаток представляет собой очень динамичную структуру, которая по мере удлинения ядра сокращается и принимает форму круглого воротничка, а затем исчезает. 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 сперматогенеза. 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.

Интересным фенотипом обладают мутанты с С-концевой делецией Pnut. Семенники у таких самцов недоразвиты и имеют шаро- или грибообразную форму, напоминая личиночные семенники, и при этом не контактируют с семенными пузырьками. В литературе есть много сведений о взаимодействии соматических клеток ниши с генеративными, подробно изучено распределение морфогенов и слоев в генитальных дисках, но нет ничего о том, как эти составные части семенника состыковываются в позднем эмбриогенезе или на стадии ранней личинки. Скорее всего, для этого нужны клеточные контакты и сигнальные молекулы. Мы полагаем, что в данных процессах могут участвовать белки кадгерина. С-концевой домен Pnut содержит биспиральный участок, вовлеченный во взаимодействие с другими белками, поэтому нарушение локализации Pnut может приводить к неправильной локализации белков-партнеров данного септина. Поскольку Pnut в клетках семенников располагается кортикально, белками-партнерами могут быть различные компоненты клеточных контактов, а также рецепторы.

У мутантов по ГТФазному домену Pnut нарушена поляризация цисты. Изначально циста, состоящая из 64 круглых гаплоидных сперматид, не поляризована. Однако к ранним стадиям элонгации кольцевые каналы группируются возле актин-богатых областей кортикальной мембраны на дистальном (растущем) конце элонгирующих сперматид, т. е. происходит поляризация цисты. Мы полагаем, что Pnut участвует в поляризации

цист в сперматогенезе за счет изменения уровня фосфолипидов. 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 значительным дефектам поляризации цист. Для большинства септинов было показано взаимодействие с фосфолипидами мембран (Casamayor, Snyder, 2003). Также было показано, что септиновый комплекс человека SEPT2-SEPT6-SEPT7 способен модифицировать морфологию гигантских липосом, содержащих фосфоинозитиды (Tanaka-Takiguchi et al., 2009). Предложенную нами гипотезу подтверждает тот факт, что у мутанта по ГТФазному домену Pnut отсутствуют специфические пунтирные структуры в кортикальной области. Возможно, такие мутантные формы белка не способны взаимодействовать с мембраной и, как следствие, не могут участвовать в процессах модификации уровня фосфолипидов.

Таким образом, показано участие Pnut в спермиогенезе – заключительных этапах сперматогенеза, на которых происходит изменение морфологии сперматоцитов. Характерной особенностью мутантов по Pnut является стерильность, вызванная неподвижностью спермы. На основе данных 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 на его участие в клеточном сигналинге, а также в поляризации цист.

Благодарности

Работа поддержана грантами ОПТЕК № 41/2014/51-Nvs «The role of septin Pnut and its functional domains in *Drosophila* spermatogenesis» и РФФИ № 14-04-31289-мол_а., а также бюджетным финансированием по государственному заданию (проект № 0324-2015-0003).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- 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; 51(9):991-999.
- 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;15(4): 653-660.
- 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;26(1):15-28. DOI 10.1091/mbc.E14-02-0734
- 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;581:5526-5532. DOI 10.1016/j.febslet.2007.10.032
- Casamayor A., Snyder M. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and

- function. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23(8):2762-2777. DOI 10.1128/MCB.23.8.2762-2777.2003
- Fabian L., Wei H.C., Rollins J., Noguchi T., Blankenship J.T., Belamkonda 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;21(9):1546-1555. DOI 10.1091/mbc.E09-07-0582
- Huijbregts R.P., 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;20:270-281. DOI 10.1091/mbc.E08-07-0754
- 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;8:353-364. DOI 10.1016/j.devcel.2005.01.021
- 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;24(6):1296-1303. DOI 10.1093/humrep/dep020
- McMurray M.A., Bertin A., Garcia G., Lam L., Nogales E., Thorner J. Septin filament formation is essential in budding yeast. *Dev. Cell.* 2011;20(4):540-549. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.02.004>
- Mostowy S., Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13(3):183-194. DOI 10.1038/nrm3284
- 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;77:371-379. DOI 10.1016/0092-8674(94)90152-X
- Pertceva J.A., Dorogova N.V., Bolobolova E.U., Nerusheva O.O., Fedorova S.A., Omelyanchuk L.V. The role of *Drosophila hyperplastic discs* gene in spermatogenesis. *Cell Biol. Int.* 2010;10:991-996. DOI 10.1042/CBI20100105
- Saarikangas J., Barral Y. The emerging functions of septins in metazoans. *EMBO Rep.* 2011;12(11):1118-1126. DOI 10.1038/embor.2011.193
- 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;449:311-315. DOI 10.1038/nature06052
- Sirajuddin M., Farkasovsky M., Zent E., Wittinghofer A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009;106(39):16592-16597. DOI 10.1073/pnas.0902858106
- Tanaka-Takiguchi Y., Kinoshita M., Takiguchi K. Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr. Biol.* 2009;19(2):140-145. DOI 10.1016/j.cub.2008.12.030
- Zent E., Wittinghofer A. Human septin isoforms and the GDP-GTP cycle. *Biol. Chem.* 2014;395:169-180. DOI 10.1515/hsz-2013-0268