

## СУПРЕССОР ОПУХОЛЕВОГО РОСТА МЕРЛИН КАК ФАКТОР МОРФОГЕНЕЗА МИТОХОНДРИЙ В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© Е. У. Болоболова, О. С. Юдина, Н. В. Дорогова<sup>1</sup>

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

<sup>1</sup> электронный адрес: natdorogova@rambler.ru

С помощью электронной и световой (флуоресцентной) микроскопии исследовали динамику и морфогенез митохондриального аппарата в сперматогенезе дрозофилы на фоне мутаций гена *merlin*. В работе использовали гипоморфный аллель *mer3*, нуль-аллель *mer4* и генетическую конструкцию *Mer+*, кодирующую полноразмерный белок. Детальный анализ аномалий сперматогенеза, вызванных этими мутациями, позволяет сделать вывод о важной роли белка Мерлин в формировании, поддержании структуры и дальнейших преобразованиях митохондриального образования (небенкерна). В работе обсуждаются возможная роль белка Мерлин как мембранны-цитоскелетного адаптора и зависимость его активности от конформационного состояния молекулы.

**Ключевые слова:** сперматогенез, митохондрии, небенкерн, мутация *merlin*, *Drosophila melanogaster*, супрессор опухолевого роста.

Белок дрозофилы Мерлин является ортологом одноименного белка человека и кодируется у человека геном *Neurofibromatosis 2 (Nf2)*, который относится к супрессорам опухолевого роста и участвует в регуляции пролиферативной активности клетки. Утрата функции гена *Nf2* у человека приводит к возникновению заболевания, связанного с развитием опухолей, ассоциированных с центральной нервной системой и в основном поражающих шванновские клетки (Martuza, Eldridge, 1988; Rouleau et al., 1993; Trofatter et al., 1993). Было показано, что у дрозофилы этот ген также выполняет функцию супрессора опухоли: в глазных и крыловых дисках у мутантов происходят избыточная пролиферация клеток и разрастание тканей (Maitra et al., 2006). Нормальное развитие половых клеток дрозофилы в значительной степени зависит от экспрессии гена *merlin*, поэтому нарушение его функций вызывает множественные дефекты как в оогенезе (MacDougall et al., 2001), так и в сперматогенезе (Dorogova et al., 2008), приводя к стерильности самцов и самок.

Ранее, исследуя причины мужской стерильности, мы обнаружили несколько фокусов действия белка Мерлин в сперматогенезе. Мутации *merlin3* и *merlin4* вызывают нарушения цитокинеза, структуры митохондриального аппарата, формы ядер сперматид и поляризации цист (Dorogova et al., 2008). Цитологический анализ с помощью антител к белку Мерлин показал, что его внутриклеточная локализация и динамика полностью совпадают с характером распределения митохондрий на всех стадиях сперматогенеза, начиная с деления гониальных клеток и вплоть до формирования зрелых спермиев (Дорогова и др., 2007; Dorogova et al., 2008). Данная колокализация предполагает значительную роль белка в морфогенезе этой структуры и дает повод для более детальных исследований.

Митохондриальный аппарат претерпевает существенные преобразования в процессе сперматогенеза. После митотических делений, на стадии активного синтеза и интерфазного роста, происходят значительные увеличения количества и размера митохондрий, а также созревание этих структур. Затем в процессе мейоза все клеточные митохондрии перемещаются в перинуклеарную область и вместе с эндоплазматическим ретикулумом образуют единый агломерат вокруг ядерной оболочки. Накануне цитокинеза агломерат митохондрий располагается в средней зоне веретена, где впоследствии клеточной перетяжкой разделяется между дочерними клетками. После мейоза начинается дифференцировка образованных сперматид, и митохондрии мигрируют в определенную область клетки, где объединяются в сферическую структуру, которая на ультратонких срезах напоминает луковицу. Это митохондриальное образование, или так называемый небенкерн (в переводе с немецкого — находящийся около ядра). Небенкерн прикрепляется к аксонеме, вместе с которой затем согласованно удлиняется, формируя хвостовую часть спермиев.

Задачей данной работы было исследование цитологических аспектов морфогенетической связи супрессора опухоли Мерлин и митохондриального аппарата в сперматогенезе дрозофилы. Представленные результаты демонстрируют важную роль белка в формировании и поддержании целостности структуры небенкерна и позволяют рассматривать его цитоплазматическую функцию как мембранны-цитоскелетного адаптора. Результаты работы интерпретируются с учетом структурных особенностей белка и зависимости его активности от внутримолекулярных конформационных переходов.

## Материал и методика

В работе использовали следующие линии *D. melanogaster*: *w Mer3P{neoFRT}19A/FM6*; *y<sup>l</sup> w Mer4 P{ry(+t7.2)=neoFRT}19A/FM7i; P{w(+mC)=ActGFP}JMR3; w<sup>1118</sup>; P{w<sup>+mC</sup>= GAL4::VP16-nos.UTR}MVD1*. Данные линии были получены из Блумингтонского центра линий дрозофилы (Bloomington Stock Center, США). Линия, содержащая кДНК нормального аллеля *Mer<sup>+</sup>* в векторе UASp, была получена и проверена на наличие экспрессии в Лаборатории генетики клеточного цикла института цитологии и генетики СО РАН (Юдина, Галимова, 2008). Эктолическая экспрессия этой конструкции запускалась с помощью тканеспецифичного для зародышевой линии драйвера *nanos-Gal4*. В качестве контроля использовали линию дикого типа *Hikone-AW*.

Для работы с линиями дрозофил использовали специальную обогащенную среду: 18 г дрожжей (сухих), 40 г изюма, 6—12 г агар-агара, 36 г манной крупы, 50 мл пастоки, 0,8 мл пропионовой кислоты, вода — до 1 л. Скрепления проводили в стаканах диаметром 25 мм при 25 °C.

**Электронная микроскопия.** Семенники фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида в 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2) в течение 2 ч, дофиксировали в 1%-ном растворе OsO<sub>4</sub> в 0,1 М какодилатном буфере в течение 1 ч. Задфиксированные образцы инкубировали в 1%-ном водном растворе уранил-ацетата в течение ночи при 4 °C, обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпоксидную смолу Араплит. Ультратонкие срезы контрастировали в растворе цитрата свинца 5 мин. Препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-100 (Jeol, Япония).

Окраска семенников митотрекером красным. Семенники извлекали из однодневных самцов в растворе Хенкса с помощью препаровальной иглы. Затем погружали их на 1 мин в каплю фиксатора (0,25%-ный глутаральдегид в 100 mM какодилатном буфере, pH 7,4). После этого дополнительно фиксировали в 3,7%-ном формальдегиде в 1 M фосфатном буфере, pH 7,4, в течение 2—3 мин. Затем отмывали трижды в фосфатном буфере с добавлением 0,5 % Тритона. Стоковый раствор митотрекера красного (MitoTracker Red, Invitrogen, США) 0,01 M, растворенный в метаноле, разводили в 1000 раз в фосфатном буфере и окрашивали препарат в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего отмывали в фосфатном буфере с добавлением 4 % PIPES в течение 20—30 мин. Далее препарат окрашивали DAPI в течение 5 мин и заключали в глицерин, разбавленный дистиллированной водой (2 : 3). Фотографирование препаратов осуществляли с помощью черно-белой CCD-камеры VC-44 (PCO Computer Optics GmbH, Германия), установленной на эпифлуоресцентный микроскоп «Axioskop» 2 Plus (ZEISS, Германия), оборудованный комплектом интерференционных фильтров (ZEISS, Германия) и пакетом программного обеспечения ISIS3 (MetaSystems GmbH, Германия).

## Результаты

Наиболее детально морфогенез митохондрий в процессе сперматогенеза дрозофилы изучен на ультраструктурном уровне ранее К. Токуясу, Н. Р. Стенли и их коллегами (Stanley et al., 1972; Tokuyasu, 1974, 1975). А обобщенные электронно-микроскопические данные,

воспроизводящие динамику митохондриального аппарата в соответствии со стадиями сперматогенеза, приведены в обзорной работе М. Фуллер (Fuller, 1993). Мы также получили серию ультратонких срезов семенников особей дикого типа для контроля аномалий сперматогенеза, вызванных мутациями гена *merlin*. Результаты ультраструктурного анализа этих срезов не выявили каких-либо отличий или новой информации по сравнению с ранее полученными данными.

**Электронно-микроскопический анализ аномалий сперматогенеза.** Анализ динамики митохондрий в сперматогенезе уместно начинать со стадии первичных сперматоцитов, находящихся в фазе предмейотического роста. На данной стадии происходит значительное увеличение числа этих органелл, оформляются их структура и внутриклеточная локализация. К началу мейоза количество митохондрий становится максимальным, и они равномерно распределяются во внутриклеточном пространстве между ядром и кортикальной областью. Их локализация в основном соответствует расположению мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР). Митохондрии находятся либо в области ЭР, либо в непосредственной близости к нему. Колокализация ЭР и митохондрий имеет характерную морфологию, подобную «бусам на нити» (рис. 1, а).

Анализ сперматогенеза у мутантных особей не выявил на этой стадии отклонений от нормы в морфологии, размерах и количестве митохондрий. Однако часть митохондрий утрачивает видимую связь с мембранными ЭР и располагается в свободном от ЭР пространстве либо в виде отдельных телец, либо группируясь в небольшие островки (рис. 1, б). Данное нарушение не отражается на динамике митохондриального аппарата в следующем за стадией роста мейотическом делении, по завершении которого митохондрии разделяются между дочерними клетками. После двух последовательных делений мейоза, на стадии «луковицы», все клеточные митохондрии мигрируют в определенную область, где объединяются в структуру — так называемый небенкерн. Данная стадия является критической для мутантов *mer3* и *mer4*.

При нормальном сперматогенезе митохондрии сначала сближаются и взаимодействуют на уровне мембран (рис. 2, а). Затем мембранные сливаются, и митохондриальный агломерат трансформируется в небенкерн — структуру, напоминающую срез луковицы (рис. 3, а). Для мутантного фенотипа характерно нарушение процесса агрегации митохондрий из-за недостаточного сближения и как следствие — неправильного их слияния (рис. 2, б). В результате образуются небенкерны с аномальной внутренней структурой и морфологией. Такие небенкерны могут включать в себя посторонние цитоплазматические фрагменты (рис. 3, б). Митохондрии зачастую начинают сливаться до того, как достигают общего центра агрегации. В результате вместо компактной структуры в виде луковицы образуется бесформенная масса с неупорядоченным внутренним содержимым в виде сложноразветвленных мембран (рис. 3, в, г). Аномальная морфология митохондриальных производных сохраняется и на стадии элонгации. В норме удлиняющиеся митохондрии имеют на поперечных срезах бобовидную форму (рис. 4, а), тогда как у мутанта они могут иметь разную форму (часто гантелеобразную) и варьируют в размерах (рис. 4, б).

При эктолической экспрессии гена *Mer<sup>+</sup>* динамика митохондрий не отличается от нормы вплоть до стадии элонгации сперматид. Несмотря на то что формирование

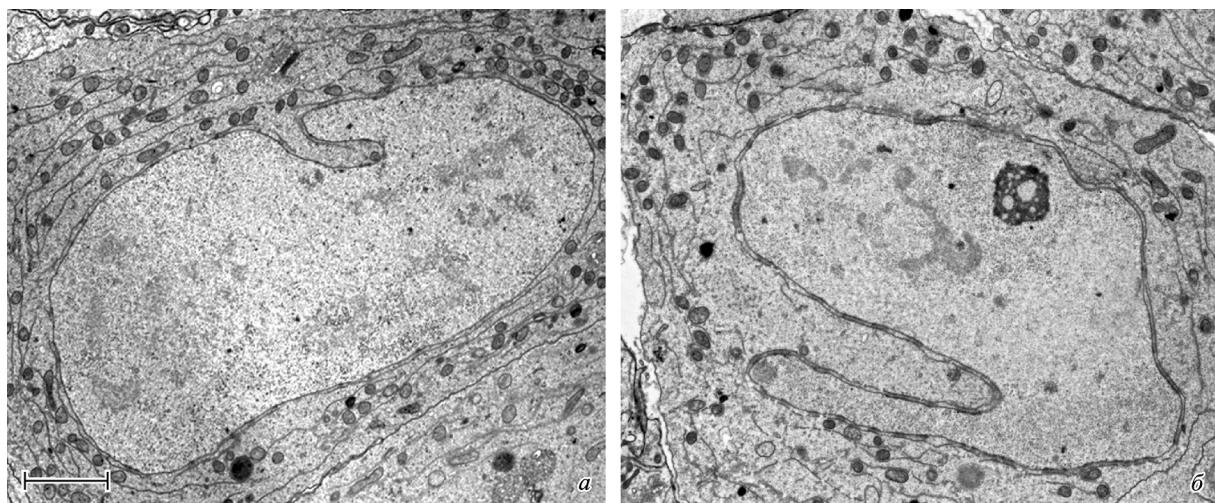


Рис. 1. Ультраструктура сперматоцитов на стадии интерфазы (перед мейозом) в норме и у мутанта *mer4* в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*.

*а* — при нормальном сперматогенезе на этой стадии митохондрии распределются упорядоченно вдоль мембран эндоплазматического ретикулума и ассоциированы с ними; *б* — у мутанта митохондрии располагаются хаотично и иногда в виде отдельных телец, не связанных с ЭР. *Масштабный отрезок* — 1 мкм.

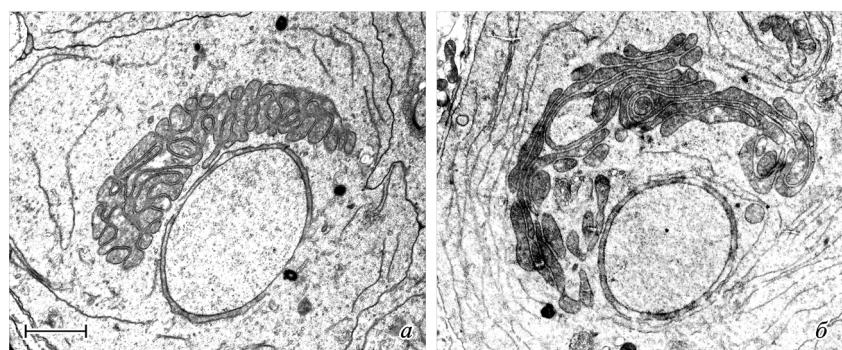


Рис. 2. Начало формирования небенкерна у особей дикого типа и мутанта *mer4*.

*а* — в норме при правильной ассоциации и слиянии митохондрий возле ядра образуется компактная структура в виде полумесяца; *б* — у мутанта данная структура выглядит аморфной в результате неправильной ассоциации и упаковки митохондрий. *Масштабный отрезок* — 2 мкм.

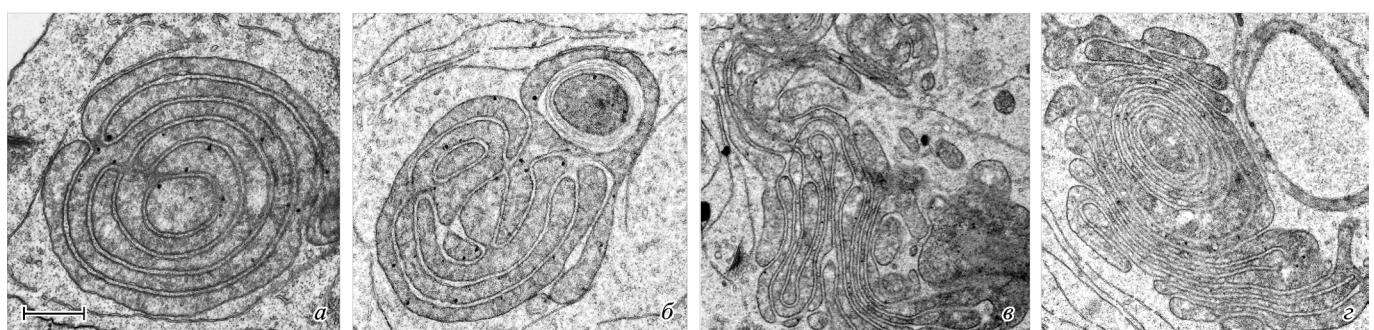


Рис. 3. Ультраструктура поперечного среза небенкерна на стадии «луковицы».

*а* — в норме митохондрии упакованы в плотную сферу, состоящую из слоев мембран; *б* — у мутанта небенкерн имеет аномальную внутреннюю структуру и морфологию. *Масштабный отрезок* — 1.5 мкм.

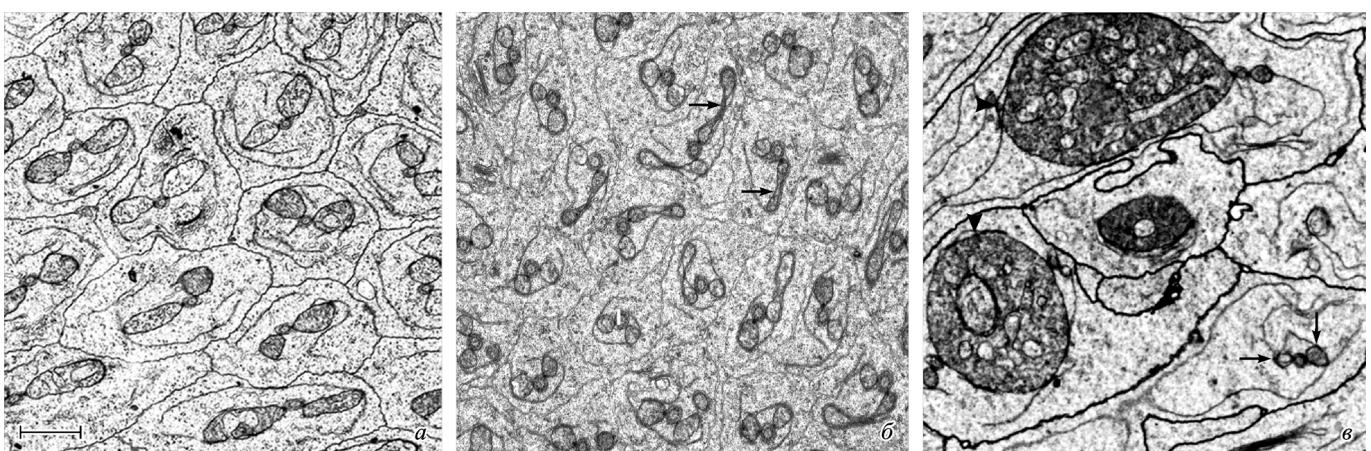


Рис. 4. Электронно-микроскопическая фотография стадии ранней элонгации сперматид. Поперечный срез хвостовой области пучка сперматид.

*a* — в норме удлиняющиеся митохондрии четко разделены на две субъединицы и имеют характерную для этой стадии овальную форму; *б* — у мутанта *mer4* митохондриальные образования искривлены и часто имеют вид гантелеей (*стрелки*); *в* — на одном и том же срезе у мутанта *Mer+* одновременно присутствуют аномально крупные митохондриальные образования (*головки стрелок*) и аномально мелкие (*стрелки*). Масштабный отрезок — 2 мкм.

небенкерна происходит нормально, его дальнейшее удлинение нарушено. На поперечных ультратонких срезах цист на стадии элонгации видно, что митохондриальные образования варьируют по размерам и форме, некоторые из них значительно гипертрофированы по сравнению с диким типом, другие, наоборот, намного мельче. Несоответствие в размерах сохраняется на более поздних стадиях, в наиболее крупных образованиях присутствуют цитоплазматические включения, характерные для более ранних стадий. При этом остальные события, связанные с

морфогенезом митохондрий, протекают нормально: проходит разделение на две субъединицы, прикрепление к аксонеме и формирование паракристаллических телец в области контакта митохондрий и аксонемы (рис. 4, *в*).

Флуоресцентный анализ динамики митохондрий. Визуализация митохондрий с помощью митотрекера хотя и не позволяет исследовать тонкую организацию этих органелл и их колокализацию с другими структурами, но достаточна для анализа их динамики в зависимости от стадий сперматогенеза, особенно если

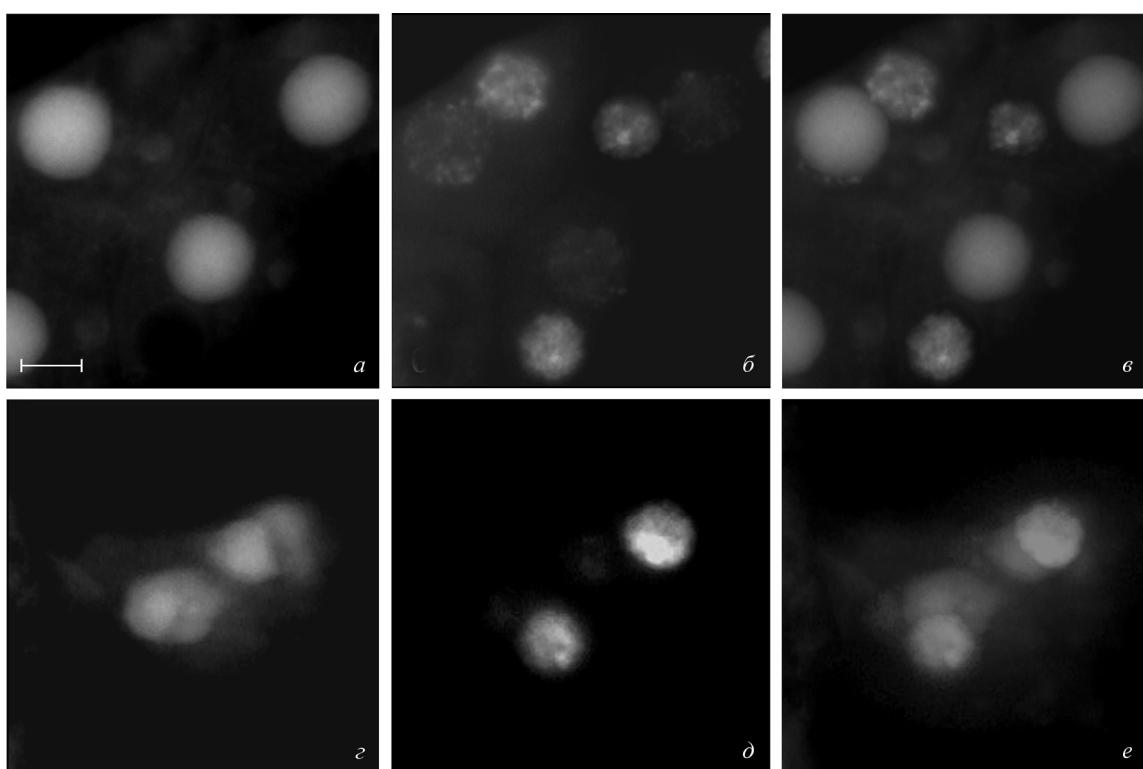


Рис. 5. Визуализация митохондрий на стадии луковицы с помощью митотрекера в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*. *а* — небенкерн в норме имеет характерную форму сферы; *б* — ядра сперматид; *в* — небенкерны и ядра сперматид, совмещенная фотография в норме; *г* — у мутанта *mer4* небенкерны выглядят аморфными, окраска митотрекером неравномерна; *д* — ядра у мутанта не отличаются от нормы; *е* — небенкерны и ядра сперматид у мутанта *mer4*. Митохондрии окрашены митотрекером, ядра — ДАПИ. Масштабный отрезок — 5 мкм.

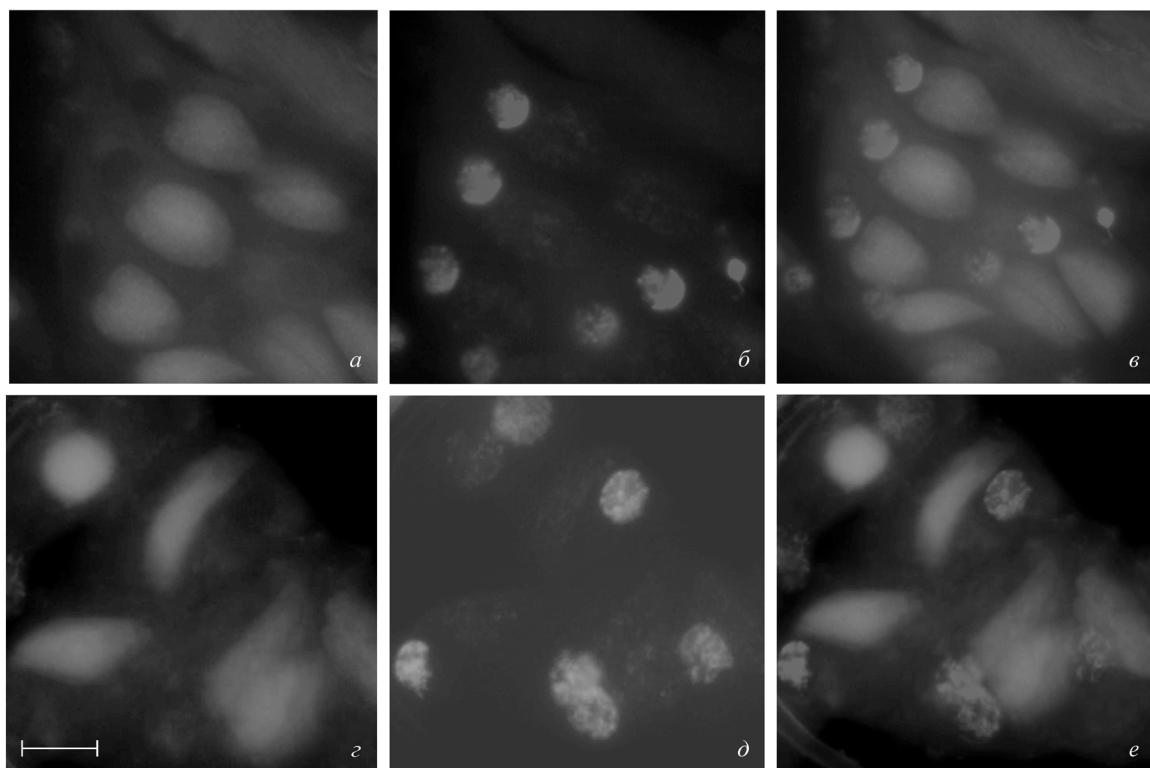


Рис. 6. Начало стадии элонгации сперматид в норме (а—в) и у мутанта *mer4* (г—е).

а — митохондриальные образования имеют форму листа и удлиняются равномерно; б — соответствующая фотография ядер; в — митохондрии находятся в непосредственной близости к ядрам и начинают вытягиваться вдоль оси удлинения цисты; г — неправильная морфология и направление удлинения митохондриальных образований; д — ядра представленных сперматид; е — митохондриальные образования не связаны с ядрами и аномально удлиняются. Митохондрии окрашены митотракером, ядра — ДАПИ. Масштабный отрезок — 5 мкм.

принять во внимание способность митохондрий формировать крупные агломераты, хорошо видимые в световой микроскоп.

Флуоресцентный анализ показал, что до стадии «луковицы» мутации гена *merlin* не влияют на характер распределения и динамику митохондриального аппарата. Однако картина дальнейших структурных преобразований полностью согласуется с электронно-микроскопическими данными. Часть митохондриальных производных (около 20 %) не формирует целостной структуры и сферической формы. В некоторых небенкернах видны участки разной плотности (рис. 5, г—е). Очевидно, что такая морфология митохондриального образования является следствием неправильного слияния митохондрий, обнаруженного нами с помощью электронной микроскопии. Кроме того, мутации нарушают взаимное расположение ядра и

небенкерна и их дальнейшее согласованное удлинение. При нормальном сперматогенезе на стадии луковицы происходят прикрепление небенкерна к одному из участков ядерной оболочки, а также его ассоциация с аксонемой, вследствие чего эти структуры удлиняются согласованно. У мутантов некоторые небенкерны располагаются на отдалении от ядра и удлиняются разнонаправленно (рис. 6, г—е). Все эти нарушения характерны как для мутантов *mer3*, так и *mer4*. Но для мутанта *mer4* характерно еще одно нарушение, связанное с морфогенезом митохондрий. Приблизительно у 10 % цист митохондриальные образования в процессе элонгации теряют свою целостность и диссоциируют на отдельные агрегаты, беспорядочно располагающиеся по телу цисты (рис. 7, б).

При эктопической экспрессии *Mer+* небенкерн формируется нормально и в начале стадии элонгации сперма-

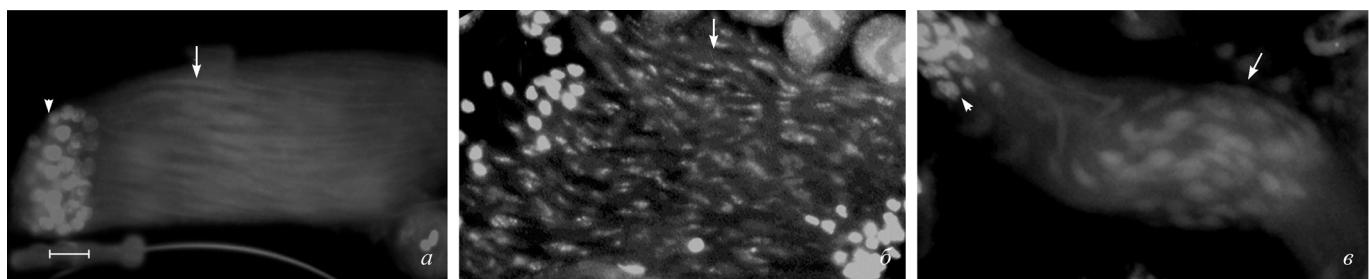


Рис. 7. Общий вид цисты на стадии элонгации сперматид у *Drosophila melanogaster*.

а — в норме митохондриальные образования вытянуты вдоль цисты; б — у мутанта *mer4* они разрушаются и их фрагменты хаотично распределяются по цисте; в — для *Mer+* характерно отсутствие удлинения митохондриальных образований, которые сохраняют морфологию более ранних стадий. Митохондрии окрашены митотракером (стрелки), ядра — ДАПИ (головка стрелки). Масштабный отрезок — 5 мкм.

тид приобретает морфологию листа, так же как у особей дикого типа. Однако эта форма митохондрий сохраняется и на более поздних стадиях элонгации, несмотря на то что сперматиды и цисты в целом удлиняются нормально. Во время удлинения цисты происходит лишь некоторое вытягивание митохондрий: от основной структуры в направлении базального и каудального концов цисты «отрастают» два тонких тяжа, тянущихся вдоль аксонемы. Внутри удлиненных цист наблюдаются скопления митохондриальных производных, задержавшихся на стадии листа (рис. 7, в). Следовательно, избыток полноразмерной копии белка Мерлин препятствует нормальному удлинению этих структур.

Таким образом, супрессор опухоли Мерлин необходим для морфогенеза митохондрий в сперматогенезе *D. melanogaster*. Хотя проведенный ранее иммуно-флуоресцентный анализ показал, что белок локализуется на митохондриях на протяжении всего сперматогенеза (Дорогова и др., 2007; Dorogova et al., 2008), его функциональная активность наиболее важна в процессе спермиогенеза. Детальный анализ аномалий сперматогенеза, вызванных мутациями *mer3* и *mer4*, а также избыточной экспрессией при добавлении генетической конструкции *Mer<sup>+</sup>*, позволяет сделать вывод о важной роли белка Мерлин в образовании и поддержании митохондриальной структуры небенкера.

## Обсуждение

Белок Мерлин был открыт как супрессор опухолевого роста и фактор, контролирующий пролиферацию клеток. Однако анализ структурных особенностей этого белка обнаружил высокую долю гомологии с тремя цитоплазматическими белками — эзрином (Ezrin), радиксином (Radixin) и мозином (Moesin), которые являются мембрально-цитоскелетными адаптерами. Как и перечисленные белки, Мерлин способен связываться одновременно с мембраной и цитоскелетом и часто локализуется в тех клеточных доменах, где мембрально-цитоскелетный комплекс претерпевает перестройку (Rouleau et al., 1993). В сперматогенезе *D. melanogaster* с помощью иммунофлуоресцентного анализа было показано, что белок Мерлин связан с митохондриями на всех стадиях морфогенеза этой структуры. Однако учитывая литературные данные, можно сделать предположение о том, что Мерлин не является структурным белком митохондрий, а осуществляет взаимодействие их мембран с цитоскелетом (Dorogova et al., 2008). Цитологический анализ мутантов, предпринятый в рамках данной работы, подтверждает это предположение. Электронно-микроскопические данные демонстрируют, что ни количество митохондрий, ни внутренняя структура этих органелл не искажаются под влиянием мутаций. Однако возникают нарушения, которые можно трактовать как следствия аномальной перестройки митохондриального аппарата на стадии формирования небенкера и в последующих преобразованиях данной структуры.

Небенкерн представляет собой результат взаимодействия и слияния всех клеточных митохондрий в единый структурный агломерат. Этот процесс носит автономный характер и протекает независимо от основных внутриклеточных событий. Так, было показано, что небенкерн формируется и имеет нормальную морфологию даже при очень значительных нарушениях веретена деления,

расхождения хромосом и цитокинеза. Когда в результате таких нарушений мейоза образуются мелкие бесхромосомные фрагменты цитоплазмы, в них тем не менее формируются правильные сфероподобные митохондриальные образования (Hackstein, 1991; Ichihara et al., 2007). Однако есть отдельный класс цитоплазматических микротрубочек, которые не связаны с центросомно-астральной системой, но в процессе сперматогенеза взаимодействуют с митохондриями. Уже сформированный сферический небенкерн также окружается системой микротрубочек, которые сопровождают его в процессе элонгации (Wilkinson et al., 1974; Aldridge et al., 2007). Удлинение митохондриального образования значительно зависит от роста аксонемы, к которой он прикреплен. Однако при избыточной экспрессии *Mer<sup>+</sup>* прикрепление к аксонеме происходит normally, но впоследствии вытягивается именно тот участок, который связан с аксонемой, а основной массив митохондриального образования остается инертным. Следовательно, одной аксонемы недостаточно, чтобы обеспечить равномерное удлинение митохондрий на стадии элонгации, и, вероятно, цитоплазматические микротрубочки также могут участвовать в этом процессе. Некоторые авторы поддерживают гипотезу о ведущей роли цитоплазматических микротрубочек в элонгации митохондриальных образований (Stanley et al., 1972; Aldridge et al., 2007), но в настоящее время данная гипотеза недостаточно подкреплена экспериментальными данными.

У клеток различных типов зависимые от микротрубочек динамика и порядок распределения митохондрий в цитоплазме требуют участия микротрубочко-ассоциированных моторных белков, таких как кинезины и цитоплазматический динеин (Anesti, Scorrano, 2006). Было показано, что взаимодействие митохондриальной мембраны с компонентами цитоскелета происходит, как правило, опосредованно с привлечением специальных адапторных белков (Aldridge et al., 2007; Detmer, Chan, 2007). Известен белок дрозофилы Милтон, который осуществляет взаимодействие митохондрий с кинезином и проявляет активность как в нейронах, так и в клетках зародышевой линии (Aldridge et al., 2007). По специфике влияния на сперматогенез дрозофилы белок Милтон близок к белку Мерлин. При мутации в гене *milton* происходят нарушения морфогенеза митохондрий: normally сформированный небенкерн впоследствии удлиняется лишь частично, сохраняя до конца стадии элонгации морфологию листа. В случае с геном *merlin* подобный фенотип появляется при его эктопической экспрессии, т. е. при избыточном количестве полноразмерного белка. Таким образом, функции генов *merlin* и *milton* в морфогенезе митохондрий проявляются диаметрально противоположно, но, вероятно, оба гена важны для функционирования цитоскелетного механизма элонгации митохондрий.

Мутации *mer3*, *mer4* и избыток *Mer<sup>+</sup>* имеют разный характер проявления в одном и том же процессе, связанном с морфогенезом митохондриальных производных. *Mer3* вызывает деформацию этих структур во время их удлинения, *mer4* — дезорганизацию и фрагментацию, а избыток *Mer<sup>+</sup>* полностью препятствует их удлинению. Данное обстоятельство может быть следствием зависимости активности белка от доменной структуры его молекулы и способности принимать различную конформацию (Gutmann et al., 2001), зависящую от характера фосфорилирования (Surace et al., 2004). Гипоморфный аллель *mer3* имеет замену метионина на изолейцин в положении 177.

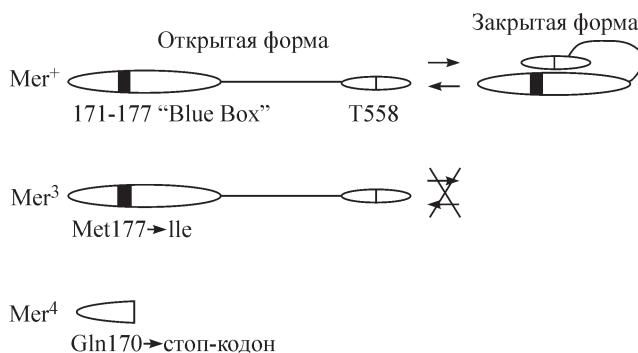


Рис. 8. Доменная структура белка Мерлин и его мутантные формы *mer3* и *mer4*.

Полноразмерный белок Мерлин может быть в открытой и закрытой конформации в зависимости от состояния фосфорилирования аминокислоты треонин в положении 558 (T558). Для формирования закрытой формы белка важен район «Blue Box», который нарушен у мутанта *mer3*. Мутантная форма *mer4* представляет собой неполный N-концевой домен.

Но эта замена происходит в особо важном районе, который называется Blue Box и который имеет значение для образования закрытой конформации белка (LaJeunesse et al., 1998) (рис. 8). Закрытая форма белка выявляется на плазматической мембране и в области контактов клеток (Curto, 2007; Laujainen, 2007), а для связывания с микротрубочками необходима открытая конформация (Muranen et al., 2007). При мутации *mer3* в клетке преобладает белок с закрытой конформацией, который не способен normally связываться с цитоплазматическими микротрубочками, обеспечивающими элонгацию митохондриальных образований.

Мутантная форма *mer4* представляет собой неполный N-концевой домен, на котором отсутствует важный микротрубочко-связывающий участок (рис. 8). Такой белок не может обеспечить нормальное взаимодействие митохондриальной мембраны с цитоскелетом, вследствие чего митохондрии неправильно взаимодействуют и в результате формируют аномальную структуру небенкера, которая разрушается и фрагментируется в процессе элонгации.

При эктопической экспрессии *Mer+* в клетках присутствует полноразмерная копия белка, на которой представлены все необходимые сайты связывания и с мембраной, и с цитоскелетом. Потенциально такая форма может принимать любую конформацию и полноценно обеспечивать все клеточные процессы, зависящие от функционирования белка Мерлин (рис. 8). Однако избыточное количество белка делает невозможным удлинение митохондриальных образований, при том что все остальные процессы, характерные для стадии элонгации, протекают normally. Этот феномен можно объяснить тем, что избыток белка создает препятствие для работы механизма фосфорилирования (дефосфорилирования), который отвечает за внутримолекулярные конформационные переходы. При чрезмерном количестве белка возникает слишком много сайтов для фосфорилирования, для которых просто недостаточно молекулярных ресурсов. Поэтому в клетке накапливается нефосфорилированная форма белка, для которой характерна открытая конформация, доступная для взаимодействия с микротрубочками. Именно поэтому при эктопической экспрессии *Mer+* не происходит нарушений в динамике митохондрий до стадии элонгации. Однако дальнейшее удлинение митохондриальных образова-

ний, вероятно, является более сложным процессом и требует равновесия между открытой и закрытой формами белка Мерлин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00075).

## Список литературы

- Дорогова Н. В., Чанг Л. Ч., Омельянчук Л. В. 2007. Изучение клеточной локализации и функции тумор-супрессора Мерлин в сперматогенезе *D. melanogaster*. Цитология. 40 (9) : 741.
- Юдина О. С., Галимова Ю. А. 2008. Структурный анализ супрессора опухолей Merlin с помощью трансгенных конструкций в сперматогенезе *Drosophila*. Информ. вестн. ВОГИС. 12 (3) : 406—411.
- Aldridge A. C., Benson L. P., Siegenthaler M. M., Whigham B. T., Stowers R. S., Hales K. G. 2007. Roles for Drp1, a dynamin-related protein, and Milton, a kinesin-associated protein, in mitochondrial segregation, unfurling and elongation during *Drosophila* spermatogenesis. Fly. 1 (1) : 38—46.
- Anesti V., Scorrano L. 2006. The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton. Biochim. biophys. acta. 1757 : 692—699.
- Detmer S. A., Chan D. C. 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8 : 870—879.
- Dorogova N. V., Akhmadeteva E. M., Kopyl S. A., Gubanova N. V., Yudina O. S., Omelyanchuk L. V., Chang L. S. 2008. The role of *Drosophila* Merlin in spermatogenesis. BMC Cell Biol. 9 : 1—15.
- Curto M., Cole B.K., Lallemand D., Liu C.H., McClatchey A.I. 2007. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by NF2/Merlin. J. Cell Biol. 177 : 893—903.
- Fuller M. T. 1993. Spermatogenesis. In: The development of *Drosophila melanogaster*. New York: Cold Spring Harbor Press. 71—147.
- Gutmann D. H., Haipak C. A., Burke S. P., Sun C. X., Scolles D. R., Pulst S. M. 2001. The NF2 interactor, hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS), associates with merlin in the «open» conformation and suppresses cell growth and motility. Hum. Mol. Genet. 10 : 825—834.
- Hackstein J. H. P. 1991. Spermatogenesis in *Drosophila*. A genetic approach to cellular and subcellular differentiation. Eur. J. Cell Biol. 56 : 151—168.
- Ichihara K., Shimizu H., Taguchi O., Yamaguchi M., Inoue Y. H. 2007. A *Drosophila* orthologue of Larp protein family is required for multiple processes in male meiosis. Cell Struct. Funct. 32 : 89—100.
- LaJeunesse D. R., McCartney B. M., Fehon R. G. 1998. Structural analysis of *Drosophila* merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. J. Cell Biol. 141 : 1589—1599.
- Laujainen M., Muranen T., Carpen O., Gronholm M. 2008. Protein kinase A-mediated phosphorylation of the NF2 tumor suppressor protein merlin at serine 10 affects the actin cytoskeleton. Oncogene. 27 : 3233—3243.
- Mac Dougall N., Lad Y., Wilkie G. S., Francis-Lang H., Sullivan W., Davis I. 2001. Merlin, the *Drosophila* homologue of neurofibromatosis-2, is specifically required in posterior follicle cells for axis formation in the oocyte. Development. 128 : 665—673.
- Maitra S., Kulikauskas R. M., Gavilan H., Fehon R. 2006. The tumor suppressors merlin and expanded function cooperatively to modulate receptor endocytosis and signaling. Curr. Biol. 16 : 702—709.
- Martuza R. L., Eldridge R. 1988. Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). N. Eng. J. Med. 318 : 684—688.
- Muranen T. 2007. The Neurofibromatosis 2 tumor suppressor merlin in cytoskeleton organization and cell cycle regulation. Aca-

- demic dissertation. Helsinki Graduate School in Biotechnology and Molecular Biology.
- Rouleau G. A., Merel P., Lutchman M., Sanson M., Zucman J., Marineau C., Hoang-Xuan K., Demczuk S., Desmaze C., Plougast L. B. 1993. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature*. 363 : 515—521.
- Stanley H. P., Bowman J. T., Romrell L. J., Reed S. C., Wilkinson R. F. 1972. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.* 41 : 433—446.
- Surace E. I., Haipek C. A., Gutmann D. H. 2004. Effect of Merlin phosphorylation on neurofibromatosis 2 (NF2) gene function. *Oncogene*. 23 : 580—587.
- Tokuyasu K. T. 1974. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. *Exp. Cell Res.* 84 : 239—250.
- Tokuyasu K. T. 1975. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VI. Significance of «onion» nebenkern formation. *J. Ultrastruct. Res.* 53 : 93—112.
- Trofatter J. A., MacCollin M. M., Rutter J. L., Murrell J. R. 1993. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell*. 75 : 791—800.
- Wilkinson R. F., Stanley H.P., Bowman J. T. 1974. Genetic control of spermatogenesis in *D. melanogaster*: the effect of abnormal cytoplasmic microtubule population in mutant *ms(3)10R* and its colcemid-induced phenocopy. *J. Ultrastruct. Res.* 48 : 242—258.

Поступила 2 IV 2010

## DROSOPHILA TUMOR SUPPRESSOR MERLIN IS ESSENTIAL FOR MORPHOGENESIS OF MITOCHONDRIA DURING SPERM FORMATION

E. U. Bolobolova, O. S. Yudina, N. V. Dorogova<sup>1</sup>

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk;

<sup>1</sup> e-mail: natdorogova@rambler.ru

Drosophila Merlin, an ortholog of the merlin protein encoded by the human *Neurofibromatosis 2 (NF2)* gene, is important for the regulation of cell proliferation and differentiation in the eye and wing. Also, it has been shown to be involved in male fertility in flies. In the present study, we formation using the comparative light and electron microscopic research of *merlin* mutants (*mer3* and *mer4*) and ectopic expression of the *Mer<sup>+</sup>* construct. Our work defines specific functions for Merlin in the mitochondria association and aggregation during the nebenkern formation and unfurling mitochondrial derivates during spermatid elongation. Possible role of Merlin as an adaptor protein that can link mitochondria with cytoskeleton is discussed.

**Key words:** spermatogenesis, mitochondria, merlin mutants, *Drosophila melanogaster*, tumor suppressor.