

**ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ Hrs
И ДРУГИХ МАРКЕРОВ ЭНДОСОМ В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*
С ПОМОЩЬЮ ХИМЕРНЫХ GFP-КОНСТРУКТОВ**

© E. B. Мариловцева,¹ Т. Д. Дубатолова,¹ Ю. А. Галимова,¹
С. А. Копыл,¹ Л. В. Омельянчук^{1, 2}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090,

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090;

² электронный адрес: ome@mcb.nsc.ru

Акросома — специализированная органелла сперматозоидов, необходимая для оплодотворения ооцита, формирующаяся, согласно разным теориям, либо из везикул аппарата Гольджи, либо из эндосом и лизосом. Hrs (hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) — мультидоменный белок комплекса ESCRT-0, принимающий участие в сортировке поглощенных в ходе эндоцитоза белков. Для млекопитающих показана способность Hgs (гомолога Hrs) связываться с акросомой, однако аналогичная способность Hrs дрозофилы не была изучена. Мы показали, что в семенниках экспрессируются две белковые формы Hrs: более длинная форма Hrs-B и укороченная форма Hrs-A, в которой отсутствуют домен VHS и часть домена FYVE, принимающие непосредственное участие в за jakiоривании Hrs на эндосомах. Мы также обнаружили, что в отличие от Hrs млекопитающих изоформа Hrs-B и почти полностью идентичная ей усеченная форма Hrs8 ([290—760]) локализуются не на акросомах, а на фьюзомах сперматоцитов. Данная локализация требует наличия в молекуле белка участка, расположенного между аминокислотными остатками 383 и 472, предположительно соответствующего NF2- и (или) STAM-связывающему доменам. *In situ*-гибридизация мРНК Hrs показала, что ген *hrs* экспрессируется в раннем сперматогенезе, и это подтверждает данные о связывании Hrs с фьюзомами сперматоцитов и отсутствии белка Hrs в позднем сперматогенезе. Кроме того, мы показали, что Hrs не принимает участия в регуляции и осуществлении цитокинеза. Наконец, несмотря на отсутствие Hrs на акросоме дрозофилы, мы детектировали на органелле маркеры эндомемом Rab4, Rab7 и Rab11, что свидетельствует в пользу эндосомальной гипотезы акросомогенеза.

Ключевые слова: vesicular traffic, endosome, endocytosis, spermatogenesis, acrosome, fusome.

Принятые сокращения: МВТ — мультивезикулярные тельца, ESCRT — endosomal sorting complex required for transport, STAM — signal-transducing adaptor molecule.

Акросома — специализированная органелла зрелых сперматозоидов, играющая важную роль в процессе оплодотворения ооцита (Fuller, 1993). Однако, несмотря на значимость акросомы, в настоящее время не существует общей теории относительно ее происхождения. Некоторые авторы считают предшественником акросомы аппарат Гольджи (Tang et al., 1982; Burgos, Gutierrez, 1986; Moreno et al., 2000, 2006); в то же время другие авторы считают акросому продуктом эндосомального происхождения (Martinez et al., 1996; Sun-Wada et al., 2002; Moreno, Alvarado, 2006). Поскольку на акрососме были обнаружены маркеры цитоплазматической мембранны, эндосом и лизосом (Li Y. et al., 2006; Li S. et al., 2009; Zhu et al., 2009), логично предположить, что в формировании акросомы принимают участие различные везикулярные структуры, в норме присутствующие в диплоидной клетке.

Hrs — белок комплекса ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) — известный маркер ранних эндосом и мультивезикулярных телец (МВТ), которые образуются внутри ранних эндосом. В процессе эн-

доцитоза Hrs за jakiоривается на мембранах ранних эндосом, связывает маркированные убиквитином белки, направляемые на деградацию в лизосомах, и в составе гетеромерного комплекса со STAM (signal-transducing adaptor molecule) или STAM-2/Hbp (Hrs-binding protein) принимает непосредственное участие в формировании МВТ (Takata et al., 2000). Как и некоторые другие белки, Hgs (гомолог Hrs млекопитающих) локализуется на ранних эндосомах сперматоцитов и сперматид, а также — в комплексе со STAM — на формирующихся акросомах (Berruti et al., 2010). Тем не менее способность Hrs локализоваться на акросоме и принимать участие в акросомогенезе у дрозофилы не была изучена.

В молекуле белка Hrs были выделены некоторые функциональные домены. Первый из них — N-концевой VHS-домен (рис. 1), который также обнаруживается у белка Vps27 и STAM в и который принимает участие в распознавании «грузов» в циркуляторных процессах транс-компартмента аппарата Гольджи (Lohi et al., 2002). Этот домен также обнаружен у белков, вовлеченных в

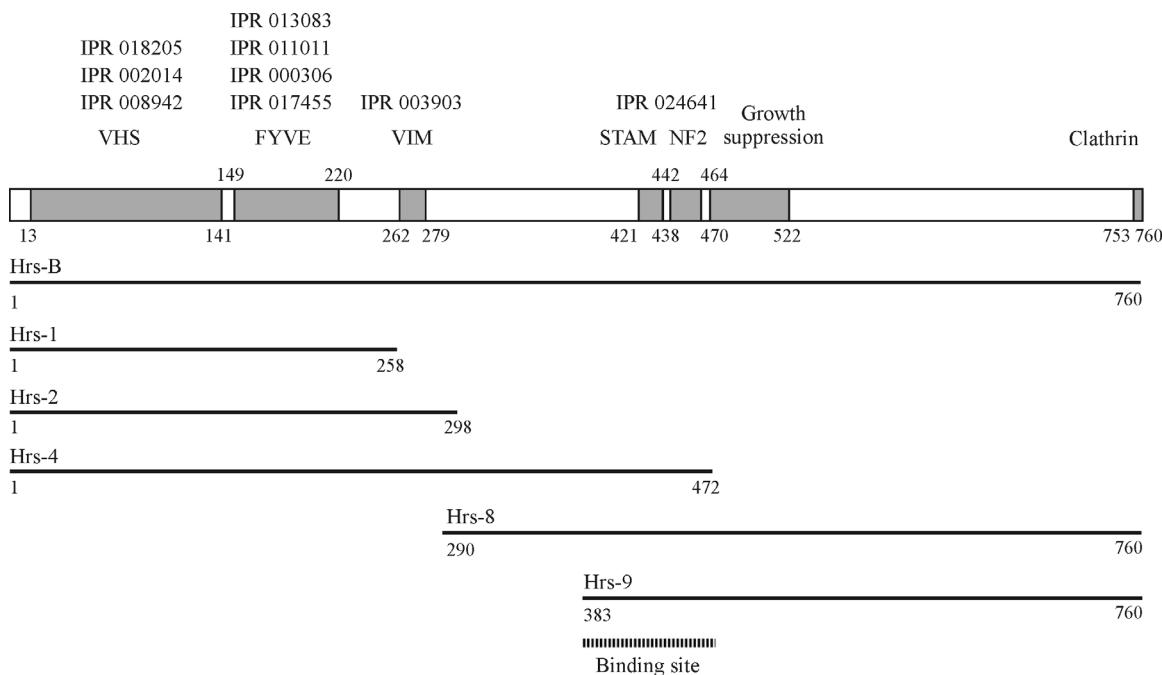


Рис. 1. Белок Hrs и его функциональные домены (показаны серым цветом).

VHS-, FYVE- и VIM-домены названы в соответствии с аннотацией, представленной в базе данных ExPasy. Полноразмерная и усеченные формы Hrs использованы в эксперименте с GFP. Hrs-B — полноразмерная форма (она же изоформа B); Hrs-1, Hrs-2 и Hrs-4 — N-концевые усеченные формы, содержащие аминокислотные остатки 1—258, 1—298 и 1—472 соответственно; Hrs-8 и Hrs-9 — C-концевые усеченные формы, содержащие аминокислотные остатки 290—760 и 383—760 соответственно. Сайт связывания фьюзомы показан штрихами.

процесс регуляции передачи сигнала от рецепторов факторов роста (например, EGFR), таких как белок EAST (Lohi, Lehto, 1998). FYVE-домен (рис. 1), домен типа «цинковый палец», впервые был обнаружен у белков Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 и EEA1. Домен FYVE обеспечивает способность Hrs связывать фосфатидилинозитол-3-фосфат (ФИЗФ) клеточных мембран (Stenmark, Aasland, 1999). Убиквитинсвязывающий мотив (УМ) (рис. 1), изначально описанный для 26S-протеосомной субъединицы PSD4/RPN (Lohi, Lehto, 1998; Young et al., 1998), представлен во многих белках, вовлеченных в события эндоцитоза и вакуолярной сортировки белков (Hofmann, Falquet, 2001). STAM-связывающий домен HRS вовлечен в связывание не только STAM (Asao et al., 1997; Takeshita et al., 1997), но и других белков системы везикулярного трафика, таких, как например SNAP-25 (Raiborg et al., 2001).

В соответствии с данными базы Flybase, существуют три изоформы Hrs — Hrs-A, Hrs-B и Hrs-C. Поскольку некоторые изоформы Hrs (B и C) имеют лишь незначительные различия в последовательности 5'-нетранслируемой области мРНК и полногеномные данные Flybase могут оказаться неточными, мы провели идентификацию транскриптов Hrs в различных тканях *Drosophila* с помощью метода обратной транскрипции с последующей ПЦР.

Малые ГТФазы (Rabs) играют важную роль в организации отдельных этапов везикулярного транспорта, включая селекцию молекулярных грузов, отпочковывание, движение, слияние, заякоривание и направление везикул. Как и Hrs, белки Rab4, Rab7 и Rab11 локализуются на эндосомах (Zhang et al., 2007).

В настоящей работе мы провели сравнительный анализ локализации Hrs и Rab4, Rab7 и Rab11 в сперматогенезе *Drosophila*. Биохимический состав акросомы дрозофилы значительно менее изучен, чем состав акросомы

млекопитающих: в настоящее время только один белок, Sneaky, был идентифицирован как белок акросомы дрозофилы (Wilson et al., 2006). Экспрессия Sneaky начинается в первичных сперматоцитах, где белок распределен диффузно в цитоплазме, однако на стадии сперматиды молекулы Sneaky собираются в гранулы, локализованные на внешней апикальной стороне ядра в области локализации акробласта (ранней стадии формирования акросомы). В то же время не существует доказательств вовлеченности гомологов Sneaky в процесс формирования акросомы у других видов. Например, белок SPE-42 *Caenorhabditis elegans* участвует в процессе оплодотворения, но неизвестно, является ли он белком именно акросомы.

Таким образом, в настоящее время неизвестно, насколько схож белковый состав акросом у разных видов. Задача настоящей работы — выяснить, участвует ли эндосомный белок Hrs в образовании акросомы, подобно тому как это происходит у млекопитающих.

Известно, что белки ESCRT-I и ESCRT-II вовлечены в процесс цитокинеза (Carlton, Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007). Для дрозофилы также показано участие одного белка ESCRT-III, Snf7, в цитокинезе на стадии абциссии клеток (Capalbo et al., 2012). В сперматогенезе в ходе премейотических митозов и мейозов образуются цисты, содержащие сперматиды, соединенные между собой кольцевыми канальцами, исчезающими в процессе индивидуализации клеток по достижении сперматидами каудального конца цисты. Возможно, белки комплекса ESCRT участвуют в сперматогенезе в процессе цитокинеза в премейотических митозах и мейозах. Другой возможной функцией белков ESCRT-0 в сперматогенезе может быть участие в формировании кольцевых канальцев. В настоящей работе мы предприняли попытку уточнить функцию белков ESCRT-0 в сперматогенезе на примере Hrs.

Материал и методика

Линии мух *yw; hrs^{D28}/CyO; hs-Hrs и yw; P{w[+mC]=UAS-Hrs}12* были любезно предоставлены д-ром Хьюго Белленом (США). Линия драйвера *Bam-Gal4* была представлена Лабораторией геномики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Линия *yw; Ki, Delta2-3* была предоставлена Лабораторией цитогенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Линии *y^lw**; *P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab4}09*, *y^lw**; *P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab7}21/SM5*, *y^lw**; *P{w[+mC]=UASp-YFP.Rab11}sra³²/TM3, Sb^l*, *P{UAS-GFP.nls}8* и драйвер *da-Gal4, P{hsFLP}12, y^lw**; *Hrs^{D28} P{neoFRT}40A/In(2LR)Gla, wg^{Gla-1} Bc^l and w¹¹¹⁸*; *P{w[+mC]=Ubi-GFP(S65T)nls}2L P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A/CyO*, линии, содержащие РНК и конструкты против гена *hrs* *y[1] v[1]*; *P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02858}attP2* и *y[1] sc[*] v[1]*; *P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00840}attP2* были получены из Bloomington Stock Center. Линия *yw; UAS-GFP(S65T)* была любезно предоставлена д-ром К. Лехнер (University Bayreuth, Германия). Тепловой шок проводили инкубацией пробирок при 37 °C в течение 1 ч на водяной бане.

Молекулярное клонирование. Полноразмерную форму *Hrs* с отсутствующими инtronами амплифицировали с использованием геномной ДНК линии *P{UAST-Hrs}12*, любезно предоставленной д-ром Хьюго Белленом (США) в качестве матрицы, и праймеров GCAGCATAAAAGAAAACAGAATTCTATGTT и GGAA-TAACATCCCTAGGATTAATCAAAGC. Ампликон лигировали в векторную плазмиду pTZ57R/T (Fermentas, Литва). Поскольку каждый содержал сайт рестрикции на 5'-конце (EcoRI и BamHI для прямого и обратного праймеров соответственно), проводили дальнейшую рестрикцию полученной промежуточной плазмиды pTZ5R/T-HRS и векторной плазмиды pUASp-GFP, любезно предоставленной Л. Ш. Чангом (Университет Огайо, США). Таким же образом клонировали усеченные формы *Hrs* с использованием плазмиды pTZ5R/T-HRS в качестве матрицы. Амплификацию усеченных форм *Hrs* проводили с использованием комбинации одного из основных праймеров (GCAGCATAAAAGAAAACAGAATTCTATGTT или GGAATAACATCCCTAGGATTAATCAAAGC) с одним из следующих праймеров:

TCCTTCCTAGGTTACTCGGTCTTGC (для *hrs1*),
GGACTCCTAGGTTAGGATTGCAGC (для *hrs2*),
CATCTGTCGCCCTAGGTTACTGCTCCTC (для *hrs4*),
CACCCGCTGCGAATTCTATGCAG (для *hrs8*),
GCCGCCAAGAATTCTATGCAGGTG (для *hrs9*).

Схема клонирования представлена в Приложении на рис. П1 (Приложение к статье размещено по адресу: <https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZGVmYXVsdGRvbWFpbnxoeWRwcm90ZWlufGd4Ojc1NDIYTNmODAxZTRINzY>).

Трансформация эмбрионов *Drosophila*. В эмбрионы, несущие генетическую конструкцию *yw; Ki Delta2-3*, содержащие эндогенную транспозазу *Delta2-3*, инъиковали ДНК-конструкции pUASP-GFP-hrsB (полноразмерная форма) или pUASP-GFP-hrs* (усеченные формы). После развития имаго проводили скрещивание

полученных особей с мухами линии *yw*. Полученных в результате скрещиваний мух, несущих генетический маркер *w⁺*, изолировали и скрещивали между собой для получения линии, несущей соответствующий транспозон.

Флуоресцентная микроскопия. Семенники изолировали посредством диссекции самцов имаго дрозофилы в растворе Хенкса, располагали на покровном стекле, предварительно покрытом полилизином, фиксировали в 7%-ном растворе формальдегида в фосфатном буфере (pH 7.2) в течение 20 мин при комнатной температуре и промывали фосфатным буфером 2 раза по 10 мин. Ядра визуализировали с использованием DAPI (2 мг/мл). Препараторы промывали фосфатным буфером 2 раза и заключали в Mowiol с 10%-ным DABCO (Sigma). Анализ препаратов проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus (Германия).

РТ-ПЦР-анализ. Семенники, крыловые имагинальные диски и личиночные ганглии извлекали из имаго и личинок линии *yw* соответственно посредством диссекции. РНК экстрагировали с использованием тризол-хлороформного метода и обрабатывали ДНКазой, свободной от РНКаз (Promega, США). кДНК синтезировали с использованием набора реактивов SuperScript II kit (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией, предоставленной фирмой-производителем. Полученную кДНК использовали для ПЦР-анализа в качестве матрицы. Для проведения ПЦР использовали следующие комбинации праймеров:

ATGAGCTCGGAGGAGGAACТ и
GCAGTTCCGGCAGTGGTGCT (для *Hrs-RA*),

TCCTCCTGCTATTCCCTCCT и
GCAGTTCCGGCAGTGGTGCT (для *Hrs-RB*),

CATCTGGCAGCACTGTAAGG и
GGAGGGAATAGCAGGAGGAG (для *Hrs-RC*).

Ампликоны анализировали посредством электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле.

In situ-гибридизация мРНК цельных семенников. ДНК *hrs* амплифицировали с использованием праймеров

AGCATAAAAGAAAACAGAATTCTATGTT
(*Hrs-F-EcoRI*) и

GGAATAAACATCCCTAGGATTAATCAAAGC
(*Hrs-R-BamHI*)

и лигировали в векторную плазмиду pGem-T-easy (Promega, США). РНК-зонды, меченные дигоксигенином, синтезировали с использованием плазмиды pGem-T-easy-*hrs*, подвергнутой рестрикции эндонуклеазой SacI (для комплементарного зонда) или BamHI (для некомплементарного зонда), и набора реактивов DIG RNA labeling kit (Sp6/T7) (Roche, США, № 11175025910) в соответствии с инструкцией, предоставленной фирмой-производителем. In situ-гибридизацию мРНК проводили в соответствии с описанным протоколом (Nagaso et al., 2001).

Семенники извлекали из самцов имаго линии *yw* посредством диссекции в фосфатном буфере и фиксировали в ФБ (фиксирующем буфере: 4 % формальдегида, 100 мМ Нерес, 2 мМ MgSO₄ и 1 мМ ЭГТА) в течение 30 мин при комнатной температуре. После двукратной отмычки 100%-ным этианолом образцы обрабатывали смесью кси-

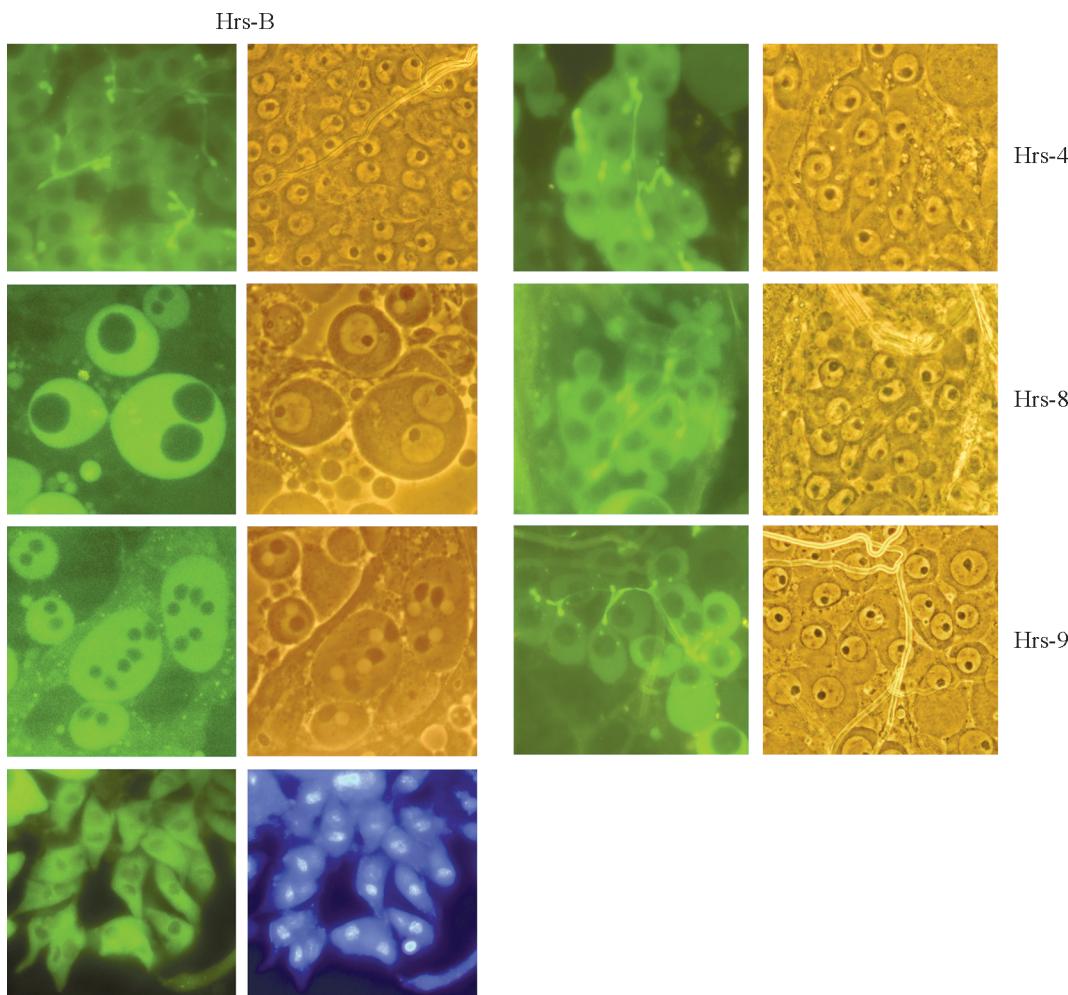


Рис. 2. Внутриклеточная локализация полноразмерной формы Hrs-B и усеченных форм Hrs-4, Hrs-8 и Hrs-9 в сперматогенезе.

Изображения для нефиксированных препаратов, полученные при визуализации сигнала GFP в фазовом контрасте, даны для сперматоцитов и сперматид на стадии «луковицы». Стадия «листа» показана для фиксированных препаратов: представлены изображения, полученные при визуализации сигналов GFP и DAPI (синий цвет).

лена и этанола (1 : 1, в течение 1 ч при комнатной температуре), сполоскивали этанолом (4 раза) и регидратировали в градиенте разведенений метанола (80, 50 и 25 %) и в воде. Затем обрабатывали ацетоном (80 %) в течение 10 мин при -20 °C. Образцы промывали фосфатным буфером, содержащим 0,1 % Tween-20 (PBT), повторно фиксировали и снова промывали PBT. Далее проводили предгибридизацию в ГБ (гибридизационном буфере: 50 % формамида, 5-кратный цитратный буфер, 0,1 % Tween-20, тРНК, гепарин и ДНК пуповинной крови человека) в течение 2 ч при 65 °C и последующую гибридизацию с комплементарным и некомплементарным зондами на Hrs (2 нг/мкл) в течение 20 ч при 65 °C. Образцы промывали ГБ 6 раз по 30 мин при 65 °C. Формамид удаляли из образцов посредством промывания смесью ГБ с PBT (4 : 1, 3 : 2, 2 : 3 и 1 : 4) и PBT. Далее образцы блокировали в 2%-ном растворе БСА в PBT в течение 40 мин при комнатной температуре, окрашивали антителами против дигоксигенина, конъюгированными со щелочной фосфатазой (Roche, № 11093274980) (антитела предварительно адсорбировали на фиксированных яичниках самок дрозофилы), в течение 16 ч при 4 °C и отмывали PBT и ЩБ (щелочным буфером: 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ и 0,1 % Tween-20). Сигнал мРНК ви-

зуализировали посредством обработки образцов раствором хлорида нитросинего тетразолия (4,5 мкл) и 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфата (3,5 мкл) в ЩБ в течение 20—30 мин при комнатной температуре.

Результаты

Внутриклеточная локализация HRS в сперматогенезе *D. melanogaster*. UAS-конструкты, кодирующие полноразмерную форму и различные усеченные формы Hrs, маркованные GFP, экспрессировали в генеративной ткани самцов под контролем драйвера *Bam-Gal4* (Chen, McKearin, 2003). Мы показали, что полноразмерная форма Hrs (Hrs-B) и N-концевая форма Hrs4 локализуются на фьюзомах — цитоплазматических мостиках, соединяющих сперматоциты. Аналогичную локализацию мы показали для усеченных C-концевой форм GFP-Hrs-8 и GFP-Hrs-9 (рис. 2).

Внутриклеточное распределение N-концевых форм Hrs-1 и Hrs-2 различается: не было обнаружено ассоциации указанных усеченных форм Hrs с цитоплазматическими мостиками, в то время как обе формы обнаруживались в ядре, но не в ядрышковом организаторе спермато-

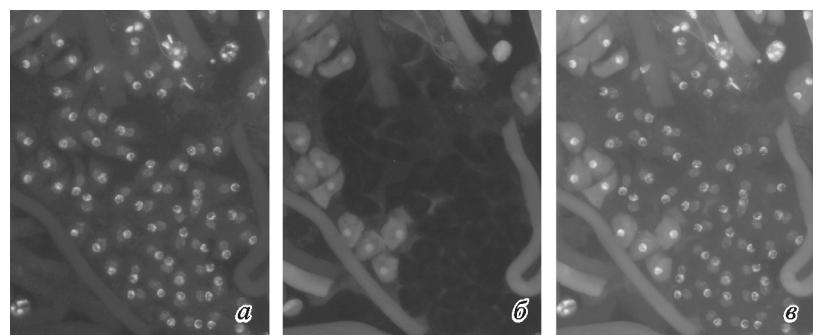


Рис. 3. Отсутствие дефектов цитокинеза в сперматогенезе мутантов Hrs^{D28} .

a — клетки окрашены DAPI: видно, что все сперматиды студии «луковицы» имеют по одному ядру и одному небенкерну; *б* — в клетках мутантов отсутствует сигнал GFP; *в* — совмещенные изображения.

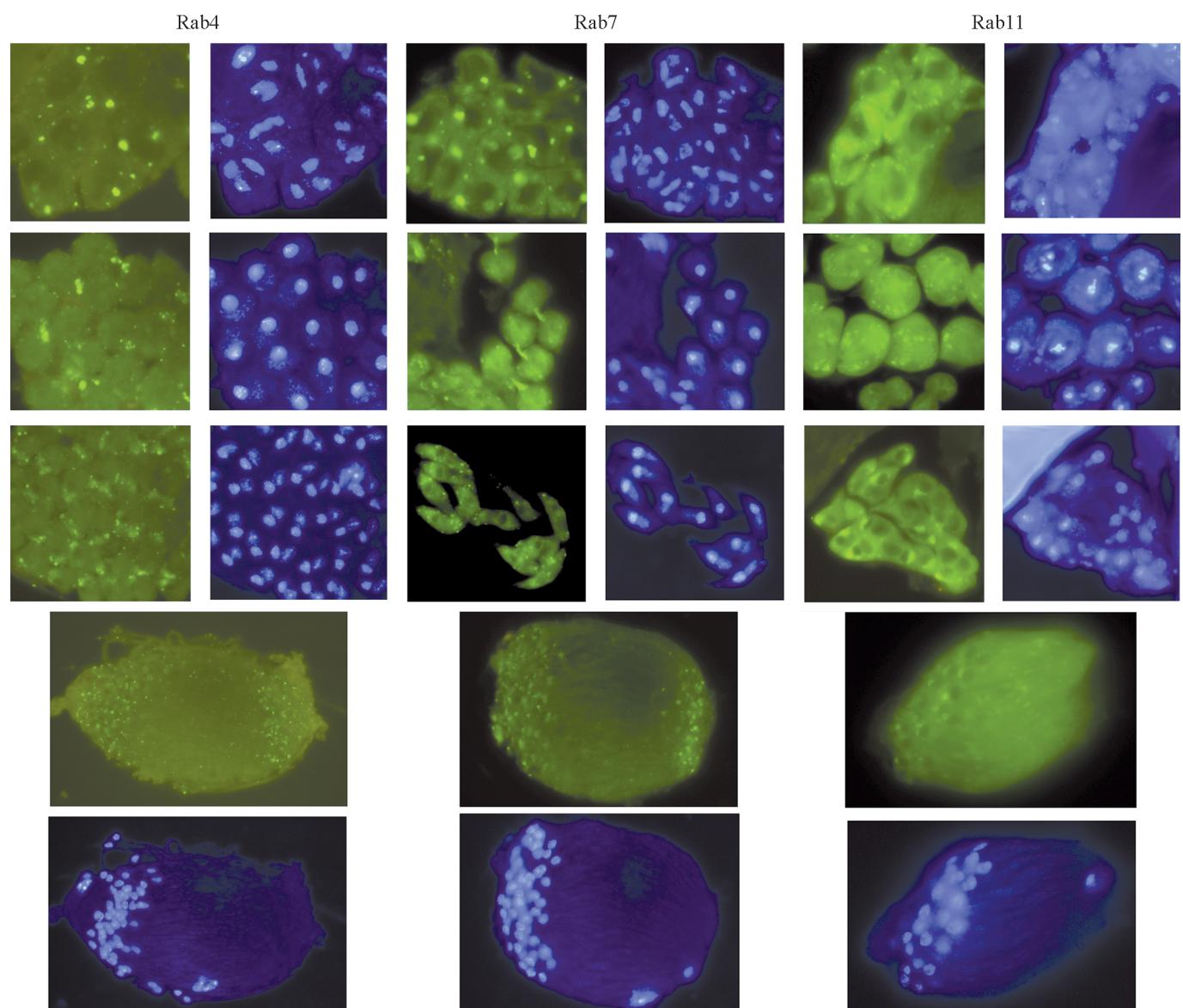


Рис. 4. Внутриклеточная локализация маркеров эндосом Rab4, Rab7 и Rab11 в сперматогенезе.

Изображения для GFP и DAPI представлены для сперматоцитов, мейотических клеток и сперматид на стадии «листа». Внизу представлены изображения цист на стадии поляризации.

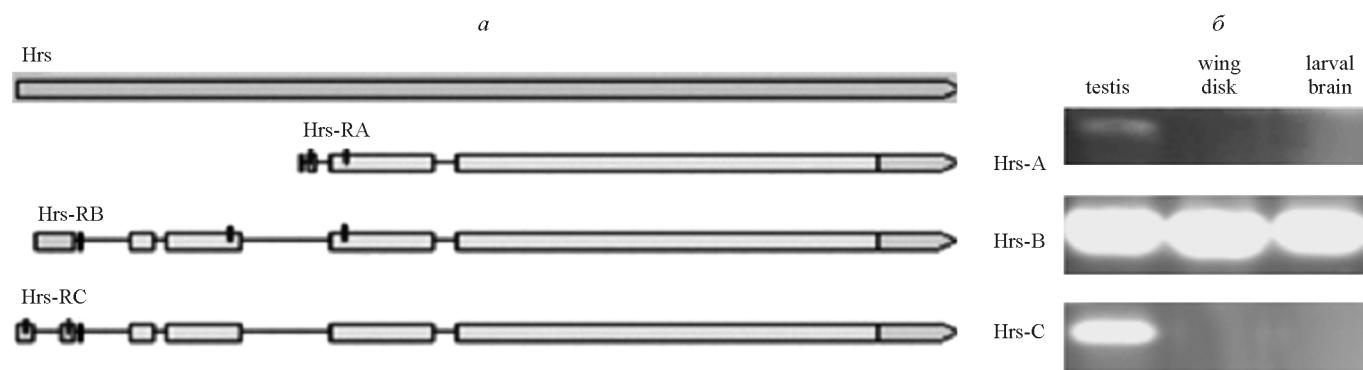


Рис. 5. Схематическое изображение трех изоформ, известных для Hrs, согласно аннотации базы данных Flybase (б) и спектр экспрессии изоформ Hrs в семенниках, крыловых имагинальных дисках и личиночных ганглиях дрозофилы, полученный в результате RT-ПЦР-анализа (б).

а — прямоугольники соответствуют экзонам; маленькими черными полосками отмечены сайты связывания праймеров, использованных для RT-ПЦР-анализа.

цитов (рис. П2, см. Приложение). Та же картина наблюдалась на стадии «клуковицы» (рис. П2, см. Приложение). Локализация химерных белков Hrs-1 и Hrs-2 в ядре оказалась отличной от таковой для полноразмерной и С-концевой форм белка, поэтому для исключения возможности паразитной локализации белков в ядре за счет GFP мы провели контрольное сравнение локализации Hrs-1 и Hrs-2, а также GFP и GFP.nls (несущим сигнал ядерной локализации). Оказалось, что ядерная локализация Hrs-1 и Hrs-2 аналогична локализации GFP-белков (см. Приложение), однако, поскольку для других форм Hrs, меченных GFP, не было показано ядерной локализации, мы считаем ядерную локализацию форм Hrs1 и Hrs2 специфичной.

Ни для одного из GFP-Hrs-белков не была показана акросомная локализация, в то время как некоторые из них обнаружили способность связываться с фьюзомой сперматоцитов. Таким образом, фьюзомы сперматоцитов являются единственной обнаруженной клеточной мишенью для Hrs в сперматогенезе дрозофилы, причем Hrs-B, Hrs4, Hrs-8 и Hrs-9 связываются с данной органеллой, а Hrs-1 и Hrs-2 нет. Данное наблюдение позволяет локализовать сайт Hrs, принимающий участие в связывании фьюзомы. Из данных, представленных на рис. 1, мы сделали вывод о том, что в молекуле белка Hrs сайт связывания фьюзомы локализуется между аминокислотными остатками 383 и 472.

Мутация и РНК-интерференция Hrs не нарушают 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 является членом комплекса ESCRT-0, мы решили исследовать его роль в цитокинезе. Мухи, гомозиготные по мутантной аллели *hrs^{D28}*, нежизнеспособны и умирают на поздней личиночной стадии, поэтому для исследования мы взяли личиночные семенники. Цитологический анализ не показал наличия в указанных органах полиплоидных сперматоцитов, являющихся показателем нарушений цитокинеза премейотических митозов. Цитологический анализ мейоза-1 и мейоза-2 в семенниках имаго линии *Bam-Gal4/UAS-RNAi-hrs* не выявил полиплоидных мейотических метафаз (в 30 образцах). В эксперименте было обнаружено несколько случаев появления клеток, похожих на клетки с двойным веретеном. Сравнение числа мейотических клеток, похожих на клетки с двойным веретеном, в семенниках самцов опытной линии *Bam-Gal4/UAS-RNAi-hrs* и контрольной линии *Bam-Gal4/+* не показало статистической разницы. Это означает, что появление мейотических клеток, похожих на клетки с двойным веретеном, не является результатом появления дефектов цитокинеза премейотических митозов, но, по-видимому, является следствием пространст-

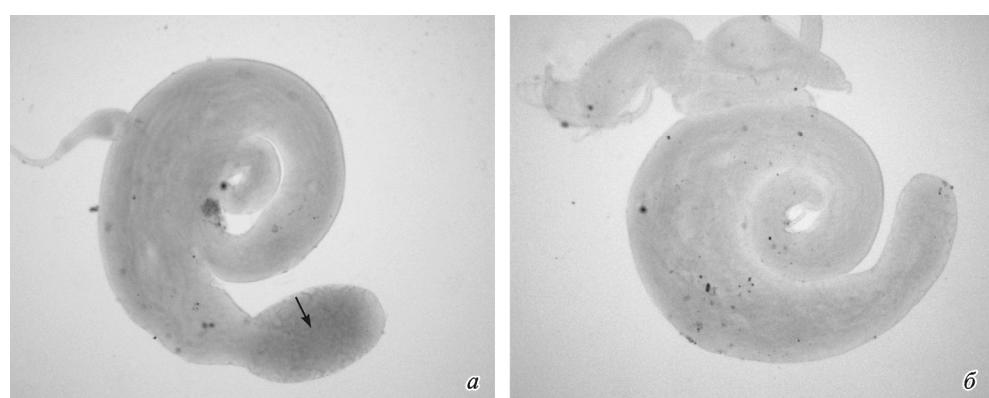


Рис. 6. Паттерн экспрессии гена *hrs* в семенниках дрозофилы.

а — *in situ*-гибридизация комплементарного зонда к мРНК *hrs*; стрелкой отмечен участок гибридизации зонда. б — контроль: *in situ*-гибридизация некомплементарного зонда к мРНК Hrs, сигнал отсутствует.

венного наложения двух клеток друг на друга, неизбежно случающегося при изготовлении препаратов. Наконец, мы индуцировали появление мозаичных клонов, гомозиготных по мутантному аллелю *hrs^{D28}*, в семенниках самцов линии *hs-FLP; hrs^{D28} FRT/Ubi-GFP FRT* посредством теплового шока в течение 1 ч при 37 °C. Анализ 30 мозаичных клонов (пример показан на рис. 3) не выявил полиплоидных сперматоцитов и полиплоидных сперматид на стадии луковицы, что указывает на то, что ни мутации, ни РНК-интерференция *hrs* не нарушают цитокинеза премейотических митозов и мейозов.

Внутриклеточная локализация других маркеров эндосом в сперматогенезе *D. melanogaster*. Помимо Hrs мы также исследовали способность белков Rab4, Rab7 и Rab11 (маркеров ранних, поздних и рециркулирующих эндосом соответственно) связываться с акросомой. Эктопическая экспрессия UAS-конструктов, содержащих *rab4*, *rab7* и *rab11*, маркированных YFP, под контролем драйвера *Bam-Gal4* показала, что указанные белки локализуются в гранулах, концентрирующихся в области формирования будущей акросомы в сперматидах луковицы и на стадии листа (рис. 4). Данное наблюдение подтверждает гипотезу эндосомальной природы акросомы. Кроме того, изучение распределения Rab4, Rab7 и Rab11 на других стадиях сперматогенеза показало, что, подобно Hrs, Rab4 и Rab7 локализуются на фьюзомах в мейотической телофазе.

Спектр экспрессии изоформ Hrs в семенниках. В соответствии с информацией, представленной в базе данных Flybase, существуют три изоформы Hrs — Hrs-A, Hrs-B и Hrs-C (рис. 5, а). Мы использовали РТ-ПЦР-анализ для изучения различий в спектрах экспрессии изоформ Hrs в некоторых тканях дрозофилы. Как и ожидалось, изоформа Hrs-B была обнаружена во всех исследованных тканях (в данной работе Hrs-B соответствует полноразмерной форме Hrs), в то время как изоформы А и С оказались специфичными для семенников (рис. 5, б). РНК изоформы Hrs-C отличается от РНК Hrs-B только 5'-нетранслируемой областью; таким образом, трансляция Hrs может специфически регулироваться в ходе сперматогенеза. Форме Hrs-A практически полностью соответствует усеченная форма Hrs8, в которой также отсутствуют домены, необходимые для заякоривания Hrs на эндосомах.

Результаты *in situ*-гибридизации мРНК Hrs в целых семенниках, представленные на рис. 6, показывают, что экспрессия *hrs* имеет место в раннем сперматогенезе, что хорошо коррелирует с нашими данными о том, что белок Hrs играет роль именно на стадии сперматоцитов.

Обсуждение

В настоящей работе мы изучили внутриклеточную локализацию различных форм белка-участника везикулярного трафика Hrs в генеративной ткани самцов *Drosophila melanogaster*. Для достижения цели мы сконструировали серию ДНК-конструктов, содержащих полноразмерную и различные усеченные формы Hrs, маркированные GFP. Экспрессируя полноразмерную форму Hrs (Hrs-B) под контролем драйвера *Bam-Gal4*, мы обнаружили, что белок локализуется на фьюзомах — цитоплазматических мостиках, соединяющих сперматоциты. Аналогичную локализацию мы показали для С-концевых усеченных форм Hrs-8 ([290—760]) и Hrs-9 ([383—760]),

а также для длинной N-концевой формы Hrs-4 ([1—472]), экспрессированных при тех же условиях. В то же время внутриклеточная локализация укороченных N-концевых форм Hrs-1 ([1—258]) и Hrs-2 ([1—298]) была совершенно иной: белки были обнаружены в ядре. Хотя подобная локализация Hrs-1 и Hrs-2 практически не отличается от таковой чистого белка GFP, мы все же считаем ее специфичной для указанных форм Hrs, поскольку других форм Hrs, также маркированных GFP, не обнаружено в ядре.

Таким образом, мы показали, что Hrs локализуется не на акросомах, как мы ожидали, а на фьюзомах, что может свидетельствовать о специфической роли Hrs в поддержании структуры фьюзом или молекулярного обмена внутри синцития.

Ранее мы изучили эволюционный консерватизм различных доменов Hrs (Omelyanchuk et al., 2009). Используя гомологичное выравнивание белкового семейства и некоторые другие экспериментальные данные, мы обнаружили, что так называемый coiled-coil-домен в свою очередь состоит из NF2-связывающего, STAM-связывающего и опухолесупрессирующего доменов. На рис. 1 видно, что сайт связывания фьюзомы соответствует участку, включающему в себя NF2-связывающий и STAM-связывающий домены. Нами показано (Omelyanchuk et al., 2009), что в процессе эволюции NF2-связывающий домен сформировался в момент появления многоклеточности. Более того, NF2-связывающий домен содержит остаток серина, который у одноклеточных эукариот может подвергаться фосфорилированию. В многоклеточных организмах этот серин замещается аспарагиновой кислотой, имитирующей фосфорилированный серин. Таким образом, в процессе возникновения многоклеточных организмов NF2-связывающий домен и остаток аспарагиновой кислоты, имитирующий фосфорилированный серин, возникли одновременно.

Показано (Hayakawa, Kitamura, 2000), что дополнительный сайт связывания эндосом белком Hrs человека локализуется между 503-м и 604-м аминокислотными остатками. Используя гомологичное выравнивание (см.: Omelyanchuk et al., 2009), мы выяснили, что левая граница данного региона точно соответствует левой границе опухолесупрессирующего домена Hrs дрозофилы, расположенного за пределами сайта связывания фьюзомы. Таким образом, связывание эндосом и связывание фьюзом — различные функции Hrs, за которые ответственны разные домены белка. Наиболее вероятно, что сайт связывания фьюзомы соответствует сайту связывания STAM. В работе Беррутти с коллегами (Berruti et al., 2010) было показано, что в сперматогенезе млекопитающих Hrs и STAM локализуются на акросоме. Поскольку в сперматогенезе дрозофилы Hrs локализуется на фьюзомах, можно предположить, что STAM также локализуется на фьюзомах, а не на акросомах.

Ранее мы исследовали дефекты сперматогенеза стерильных мутантов *Mer³* и *Mer⁴* (Merlin — гомолог дрозофилы белка NF2 млекопитающих). Мы показали, что указанные мутации вызывают дефекты мейотического цитокинеза (Dorogova et al., 2008). Кроме того, у мутантов наблюдали дефекты поляризации цист, удлинения ядер и индивидуализацию сперматид. Использование антител против Mer показало, что в сперматогенезе белок перемещается из кортикальной цитоплазмы сперматоцитов в область мейотического веретена телофазы мейоза I. На стадии луковицы белок обнаруживается на небенкерне. Гранулы, содержащие Mer, были обнаружены еще в области акросомы зрелых спермиев. Таким образом, внутри-

клеточное распределение Mer в сперматогенезе дрозофилы отличается от такового Hrs, поэтому можно предположить, что сайт связывания NF2 не принимает участия в связывании Hrs с фьюзомой.

Мы обнаружили также, что маркеры ранних и поздних эндосом Rab4 и Rab7, подобно Hrs, локализуются в раннем сперматогенезе на фьюзомах. Таким образом, как в генеративной ткани самок, так и в генеративной ткани самцов дрозофилы различные белки эндосом участвуют в поддержании функции фьюзом. В отличие от Hrs изученные маркеры эндосом (Rab4, Rab7 и Rab11) локализуются на более поздней стадии листа на акробласте. Тем не менее по сравнению с Rab11 связывание акробласта Rab4 и Rab7 имеет более диффузный характер. Основная схема биогенеза акросомы млекопитающих (Berruti et al., 2010) подразумевает участие эндосом в качестве промежуточных структур в процессе формирования акросомы. Наблюдаемое нами внутриклеточное распределение Rab4 и Rab7 хорошо соответствует данной схеме.

Изучение внутриклеточной локализации Rab4, Rab7 и Rab11 и процессы биогенеза акросом у млекопитающих и дрозофилы сходны между собой. Отметим также, что динамическая релокализация Rab11 с сократительного кольца на акробласт была показана и ранее (Giansanti et al., 2007).

Изучение спектра экспрессии различных изоформ Hrs в тканях дрозофилы показало, что в отличие от соматических тканей в генеративных тканях самцов представлены все три изоформы, причем изоформа А является специфичной для данной ткани. Изоформы В и С кодируют абсолютно идентичные формы белка и отличаются только 5'-нетранслируемой областью (5'-НТО). В то же время изоформа А не только имеет уникальную 5'-НТО, но еще отличается отсутствием в кодирующей белок области участков, кодирующих VHS-домен и часть FYVE-домена, играющих важную роль в заякоривании Hrs на поверхности эндосом. В то же время Hrs-A содержит сайт связывания фьюзомы. Таким образом, можно предположить, что специфическая форма Hrs-A, экспрессируясь в семенниках самцов дрозофилы, обеспечивает поддержание функции фьюзомы, не будучи при этом вовлеченной в выполнение основной функции Hrs в процессе везикулярного транспорта. Данные нашего эксперимента по *in situ*-гибридизации мРНК Hrs в семенниках показывают, что Hrs преимущественно экспрессируется в раннем сперматогенезе, что подтверждает его особую роль в поддержании функции фьюзом сперматоцитов.

В отличие от многих белков ESCRT-комплексов Hrs не имеет функции опухолевого супрессора (Hariharan, Bilder, 2006). Известно, что белки комплексов ESCRT-I и ESCRT-II (Carlton, Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007), а также белки Snf7 ESCRT-III (Capalbo et al., 2012) принимают участие в регуляции цитокинеза в сперматогенезе. Наши данные указывают на то, что, несмотря на особенности своей локализации, Hrs не принимает участия в процессе цитокинеза в сперматогенезе, поскольку ни мутации, ни РНК-интерференции *hrs* не вызывали дефектов цитокинеза. Это наблюдение хорошо согласуется с замечанием (Tognon et al., 2014) о том, что ESCRT-0 возник в процессе эволюции недавно и потому не является необходимым для прохождения цитокинеза.

Заключение. Мы показали, что в семенниках дрозофилы экспрессируются три изоформы Hrs, аннотированные в базе данных FlyBase. Мы обнаружили, что в отличие от Hgs, гомолога Hrs млекопитающих, Hrs (полноразмерная белковая форма Hrs-B) дрозофилы локали-

зуется на фьюзомах сперматоцитов. Такая локализация требует наличия в молекуле белка С-концевого фрагмента, расположенного между 383-м и 472-м аминокислотными остатками. *In situ*-гибридизация мРНК в семенниках показала, что ген экспрессируется в раннем сперматогенезе, что подтверждает наши данные о том, что Hrs присутствует в сперматогенезе на фьюзомах сперматоцитов. Поскольку изоформа Hrs-A, лишенная сайтов связывания эндосом, но имеющая предполагаемый сайт связывания фьюзом, была обнаружена нами только в семенниках, можно сделать вывод о том, что Hrs в сперматогенезе имеет специальную функцию поддержания функциональности фьюзом. Кроме того, мы показали, что Hrs не играет роли в регуляции цитокинеза в сперматогенезе. Наконец, мы показали, что, несмотря на отсутствие Hrs на акросоме дрозофилы, мы детектировали на органелле маркеры эндосом Rab4, Rab7 и Rab11, что свидетельствует в пользу эндосомальной гипотезы акросомогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФБР (проект 14-04-31412) и правительства РФ в рамках государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских научных учреждениях (договор № 14.Z50.31.0005).

Список литературы

- Asao H., Sasaki Y., Arita T., Tanaka N., Endo K., Kasai H., Takeda T., Endo Y., Fujita T., Sugamura K. 1997. HRS is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine induced cell growth. *J. Biol. Chem.* 272 : 32 785—32 791.
- Berruti G., Ripollone M., Ceriani M. 2010. USP8, a regulator of endosomal sorting, is involved in mouse acrosome biogenesis: through interaction with the spermatid ESCRT-0 complex and microtubules. *Biol. Reprod.* 82 : 930—939.
- Burgos M. H., Gutierrez L. S. 1986. The Golgi complex of the early spermatid in guinea pig. *Anat. Rec.* 216 : 139—145.
- Capalbo L., Montembault E., Takeda T., Bassi Z. I., Glover D. M., D'Avino P. P. 2012. The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biol.* 2 : 120 070.
- Carlton J. G., Martin-Serrano J. 2007. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*. 316 : 1908—1912.
- Chen D., McKearin D. M. 2003. A discrete transcriptional silencer in the bam gene determines asymmetric division of the Drosophila germline stem cell. *Development*. 130 : 1159—1210.
- Dorogova N. V., Akhmeteyeva E. M., Kopyl S. A., Gubanova N. V., Yudin O. S., Omelyanchuk L. V., Chang L. S. 2008. The role of Drosophila Merlin in spermatogenesis. *BMC Cell Biol.* 9 : 1.
- Fuller M. 1993. Spermatogenesis. In: *The development of Drosophila melanogaster*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 71—147.
- Giansanti M. G., Belloni G., Gatti M. 2007. Rab11 is required for membrane trafficking and actomyosin ring constriction in meiotic cytokinesis of *Drosophila* males. *Mol. Biol. Cell*. 18 : 5034—5047.
- Hariharan I. K., Bilder D. 2006. Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 40 : 335—361.
- Hayakawa A., Kitamura N. 2000. Early endosomal localization of hrs requires a sequence within the proline- and glutamine-rich region but not the FYVE finger. *J. Biol. Chem.* 275 : 29 636—29 642.
- Hofmann K., Falquet L. 2001. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem. Sci.* 26 : 347—350.

- Li S., Qiao Y., Di Q., Le X., Zhang L., Zhang X., Zhang C., Cheng J., Zong S., Koide S. S., Miao S., Wang L. 2009. Interaction of SH3P13 and DYDC1 protein: a germ cell component that regulates acrosome biogenesis during spermiogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 88 : 509—520.
- Li Y. C., Hu X. Q., Zhang K. Y., Guo J., Hu Z. Y., Tao S. X., Xiao L. J., Wang Q. Z., Han C. S., Liu X. L. 2006. Afaf, a novel vesicle membrane protein, is related to acrosome formation in murine testis. *FEBS Lett.* 5807 : 4266—4273.
- Lohi O., Lehto V. P. 1998. VHS domain marks a group of proteins involved in endocytosis and vesicular trafficking. *FEBS Lett.* 440 : 255—257.
- Lohi O., Poussu A., Mao Y., Quiocho F., Lehto V. P. 2002. VHS domain — a longshoreman of vesicle lines. *FEBS Lett.* 513 : 19—23.
- Martinez M. J., Geuze H. J., Ballesta J. 1996. Evidence for a nonlysosomal origin of the acrosome. *J. Histochem. Cytochem.* 44 : 313—320.
- Moreno R. D., Alvarado C. P. 2006. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol. Reprod. Develop.* 73 : 1430—1434.
- Moreno R. D., Palomino J., Schatten G. 2006. Assembly of spermatid acrosome depends on microtubule organization during mammalian spermiogenesis. *Develop. Biol.* 293 : 218—227.
- Moreno R. D., Ramalho-Santos J., Chan E. K., Wessel G. M., Schatten G. 2000. The Golgi apparatus segregates from the lysosomal/acrosomal vesicle during rhesus spermiogenesis: structural alterations. *Develop. Biol.* 219 : 334—349.
- Morita E., Sandrin V., Chung H.-Y., Morham S. G., Gyg S. P., Rodesch C. K., Sundquist W. I. 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* 26 : 4215—4227.
- Nagaso H., Murat T., Da N., Yokoyam K. 2001. Simultaneous detection of RNA and protein by *in situ* hybridization and immunological staining. *J. Histochem. Cytochem.* 49 : 1177.
- Omelyanchuk L. V., Pertseva J. A., Burns S. S., Chang L. S. 2009. Evolution and origin of HRS, a protein interacting with Merlin, the Neurofibromatosis 2 gene product. *Gene Regul. Syst. Biol.* 3 : 143—157.
- Raiborg C., Bache K. G., Mehlum A., Stenmark H. 2001. Function of HRS in endocytic trafficking and signaling. *Biochem. Soc. Transactions.* 29 : 473—475.
- Stenmark H., Aasland R. 1999. FYVE-finger proteins-effectors of an inositol lipid. *J. Cell Sci.* 112 : 4175—4183.
- Sun-Wada G. H., Imai-Senga Y., Yamamoto A., Murata Y., Hirata T., Wada Y., Futai M. 2002. A proton pump ATPase with testis-specific E1-subunit isoform required for acrosome acidification. *J. Biol. Chem.* 277 : 18 098—18 105.
- Takata H., Kato M., Denda K., Kitamura N. 2000. A hrs binding protein having a Src homology 3 domain is involved in intracellular degradation of growth factors and their receptors. *Genes Cells.* 5 : 57—69.
- Takeshita T., Arita T., Higuchi M., Asao H., Endo K., Kuroda H., Tanaka N., Murata K., Ishii N., Sugamura K. 1997. STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity.* 6 : 449—457.
- Tang X. M., Lalli M. F., Clermont Y. 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *Amer. J. Anat.* 163 : 283—294.
- Tognon E., Wollscheid N., Cortese K., Tacchetti C., Vaccari T. 2014. ESCRT-0 is not required for ectopic Notch activation and tumor suppression in *Drosophila*. *PLoS ONE.* 9 : e93987.
- Wilson K. L., Fitch K. R., Bafus B. T., Wakimoto B. T. 2006. Sperm plasma membrane breakdown during *Drosophila* fertilization requires Sneaky, an acrosomal membrane protein. *Development.* 133 : 4871—4879.
- Young P., Devereaux Q., Beal R. E., Pickart C. M., Rechsteiner M. 1998. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J. Biol. Chem.* 273 : 5461—5467.
- Zhang J., Schulze K. L., Hiesinger P. R., Suyama K., Wang S., Fish M., Acar M., Hoskins R. A., Bellen H. J., Scott M. P. 2007. Thirty-one flavors of *Drosophila* Rab proteins. *Genetics.* 176 : 1307—1322.
- Zhu G., Salazar G., Zlatic S. A., Fiza B., Doucette M. M., Heilman C. J., Levey A. J., Faundez V., L'Hernault S. W. 2009. SPE-39 family proteins interact with the HOPS complex and function in lysosomal delivery. *Mol. Biol. Cell.* 20 : 1223—1240.

Поступила 15 IV 2015

COMPARATIVE STUDY OF Hrs AND OTHER ENDOSOMAL MARKERS CELLULAR
LOCALIZATION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* SPERMATOGENESIS
BY GFP-CHIMERICAL PROTEIN APPROACH

E. V. Marilovtseva,¹ T. D. Dubatolova,¹ J. A. Galimova,¹ S. A. Kopyl,¹ L. V. Omelyanchuk^{1, 2}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology Siberian Branch of RAS, Novosibirsk, 630090,

and ² Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090;

² e-mail: ome@mcb.nsc.ru

Acrosome is a special organelle in spermatozooids necessary for fertilizing oocyte and originates, according to various theories, either from Golgi apparatus, or from endosomes and lysosomes. One of the proteins, found at mammalian acrosome, is Hgs, a homologue of *Drosophila melanogaster* Hrs (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate), a known marker of multivesicular bodies (MVBs). However, although *Drosophila* acrosome was extensively studied, it is yet unknown whether Hrs localizes at acrosome similar to Hgs and, more generally, whether the spectrum of acrosomal proteins in *Drosophila* is the same as in mammals. Hrs (hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) is the multidomain vesicular protein participating in the endosome-lysosome protein sorting. We demonstrated that two protein variants of the *Drosophila* Hrs are expressed in testes: a longer isoform B, and a shorter isoform A, which lacks VHS and FYVE domains that are necessary for anchoring Hrs in endosomes. We found that Hrs isoform B is concentrated at fusoma of spermatocytes in contrast to mammalian Hrs. This localization requires the C-terminus of the protein, starting from the aminoacid residue 383. *In situ* hybridization of *hrs* RNA probe showed that the gene is expressed early in spermatogenesis consistently with Hrs localization in early fusoma. Additionally, we demonstrated that Hrs is dispensable for cytokinesis. Finally, it was found that although *Drosophila* Hrs does not localize at acrosome, the other endosomal markers — Rab4, Rab7, and Rab11 — are detected at the organelle.

Key words: vesicular traffic, endosome, endocytosis, spermatogenesis, acrosome, fusome.