

Роль гена *pAbp*, кодирующего цитоплазматический поли(А)-связывающий белок, в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*

Е.У. Болоболова , Э.М. Баричева, Н.В. Дорогова

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поли(А)-связывающий белок (PABP) *Drosophila melanogaster* относится к цитоплазматическим PABP, участвующим в контроле инициации и терминации трансляции мРНК, сохранении ее стабильности, цитоплазматическом полиаденилировании/деаденилировании, деградации мРНК. Несмотря на всестороннюю структурную и биохимическую характеристику цитоплазматических PABP, относительно мало известно об их участии в процессах развития и дифференцировки. Вследствие того что большинство генов, кодирующих необходимые для сперматогенеза *Drosophila* белки, транскрибируется в первичных сперматоцитах, предполагают, что развитие сперматид определяется отложенной трансляцией, в регулировании которой участвует белок PABP. Утрата PABP приводит к гибели эмбрионов. Сочетание некоторых мутантных аллелей гена *pAbp D. melanogaster* является тканеспецифичным и приводит к нарушению сперматогенеза и стерильности самцов. Ранее были выявлены и описаны дефекты мейоза и цитокинеза, нарушения структуры небенкерн в сперматогенезе гипоморфных мутантов *pAbp*. Опубликованные данные дают возможность судить о действии мутантных аллелей *pAbp* на отдельные события сперматогенеза, но не охватывают весь процесс. Целью настоящей работы было детальное цитологическое исследование влияния гена *pAbp* на сперматогенез *D. melanogaster* с помощью флуоресцентной световой и электронной микроскопии. Показано, что начальное действие мутации гена *pAbp* на структуру клеток проявилось на стадии первичных сперматоцитов. Первичной структурной мишенью мутации был митохондриальный аппарат клеток. Изменение морфологии митохондрий мутанта *pAbp* включало набухание, уменьшение плотности матрикса и редукцию количества крист. Далее действие мутации проявилось плейотропно, вызвало нарушение формирования и деления небенкерн, образования аксиальных комплексов и привело к остановке сперматогенеза на стадии элонгации цист. На основании результатов проведенных исследований можно сделать вывод, что белок PABP *D. melanogaster* участвует во многих событиях сперматогенеза и играет критически важную роль в структурной дифференцировке гамет в спермиогенезе.

Ключевые слова: дрозофила; сперматогенез; ультраструктура; мутация *pAbp*; цитоплазматический поли(А)-связывающий белок (PABP).

The role of the *pAbp* gene encoding the cytoplasmic poly(A)-binding protein in spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*

E.U. Bolobolova , E.M. Baricheva, N.V. Dorogova

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

The *Drosophila melanogaster pAbp* gene encodes the cytoplasmic poly(A)-binding protein (PABP). Cytoplasmic PABPs participate in the metabolic pathways of the mRNA: translation initiation and termination, cytoplasmic polyadenylation/deadenylation, mRNA stability, mRNA degradation. Despite the extensive biochemical and structural characterization, relatively little is known about the biological roles of PABPs in the processes of cellular development and differentiation. In *Drosophila* spermatogenesis, posttranscriptional mechanisms of gene regulation play an important role, so cytoplasmic PABP can have significant function in this process. Deletion of PABP leads to embryonic lethality. However, some flies carrying combinations of mutant *pAbp* alleles survive but display male sterility and show defects in spermatogenesis. It has previously been shown that hypomorphic *pAbp* mutations cause a number of meiotic defects, abnormalities of Nebenkern formation. These data provide an insight into the effect of *pAbp* mutation on the individual events of spermatogenesis, but they do not cover the entire process. We studied spermatogenesis in *pAbp* allele heterozygotes by transmission electron and fluorescent light microscopy. We showed that cellular mitochondria were the primary structural target of the mutation. Abnormal mitochondria were less structured, swollen, had transparent matrix and depleted cristae. Further mutation had a polymorphous effect and induced anomalies in the ultrastructure of mature spermatocytes, defects in Nebenkern formation and division, axial complex formation, shutdown of spermatogenesis during spermatid elongation. Thus our data show a significant role of PABP in structural transformations of male germ cells during entire spermatogenesis.

Key words: *Drosophila*; spermatogenesis; ultrastructure; *pAbp* mutation; cytoplasmic poly(A)-binding protein (PABP).

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Болоболова Е.У., Баричева Э.М., Дорогова Н.В. Роль гена *pAbp*, кодирующего цитоплазматический поли(А)-связывающий белок, в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):710-716. DOI 10.18699/VJ17.26-0

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Bolobolova E.U., Baricheva E.M., Dorogova N.V. The role of the *pAbp* gene encoding the cytoplasmic poly(A)-binding protein in spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):710-716. DOI 10.18699/VJ17.26-0

Received 21.12.2016
Accepted for publication 16.03.2017
Online 23.06.2017
© AUTHORS, 2017

 e-mail: elbol@bionet.nsc.ru

Поли(А)-связывающие белки (РАВР) эукариот относятся к важному классу регуляторных белков. Они присоединяются к 3'-концевой поли(А)-последовательности мРНК и, не обладая каталитической активностью, обеспечивают скаффолд для присоединения ключевых факторов, контролирующих функцию мРНК. Геномы различных эукариот содержат от одного до нескольких генов *pAbp*. Многолетние исследования показали, что белки семейства РАВР участвуют во всех метаболических путях мРНК. В зависимости от локализации в клетке РАВР разделяют на ядерные и цитоплазматические. РАВР *D. melanogaster* относится к цитоплазматическим белкам. Цитоплазматические РАВР участвуют в контроле инициации и терминации трансляции мРНК, сохранении ее стабильности, цитоплазматическом полиаденилировании/деаденилировании, деградации мРНК (Mangus et al., 2003; Goss, Kleiman, 2013; Gallie, 2014).

В настоящее время мало известно об участии цитоплазматических РАВР в процессах развития и дифференцировки. У *Xenopus laevis* три цитоплазматических РАВР имеют специфичные функции на разных стадиях раннего эмбриогенеза, и нокаут каждого из трех генов этих белков приводит к гибели эмбрионов (Gorgoni et al., 2011). У *Saccharomyces cerevisiae* делеция гена, кодирующего единственный поли(А)-связывающий белок РАВ1, летальна (Sachs et al., 1987), а у *Schizosaccharomyces pombe* поли(А)-связывающий белок spРАВР, гомолог РАВ1 *Saccharomyces cerevisiae*, не является жизненно необходимым (Thakurta et al., 2002). У *Caenorhabditis elegans*, имеющего два цитоплазматических РАВР, две разные мутации гена *pab-1* вызывают похожие дефекты в пролиферации зародышевых клеток, но их влияние на продолжительность жизни мутантных организмов различается (Ko et al., 2010).

Ген *pAbp D. melanogaster* экспрессируется на всех стадиях развития в тканях и органах личинок и взрослых особей и может выполнять специфичную функцию в процессах, в которых важную роль играет трансляционная регуляция экспрессии генов. В оогенезе *D. melanogaster* белок РАВР участвует в пространственной регуляции локализации и трансляции мРНК *gurken*, необходимых для формирования дорсо-вентральной оси яиц и эмбрионов (Clouse et al., 2008). РАВР участвует в постсинаптическом трансляционном контроле долговременной пластичности личиночных нейро-мышечных синапсов *D. melanogaster* (Sigrist et al., 2000). Получена серия мутантных аллелей гена *pAbp*, характеризующихся варьирующей экспрессивностью и плейотропным эффектом в разных тканях *D. melanogaster* (Blagden et al., 2009; Pertceva et al., 2010). Сочетание некоторых мутантных аллелей гена *pAbp* тканеспецифично и приводит к нарушению сперматогенеза.

Сперматогенез – специализированный процесс, состоящий из цепочки последовательных преобразований клеток, приводящих к формированию высокодифференцированных клеток – сперматозоидов. Первичный сперматогоний проходит четыре митотических деления, образуя 16 сперматоцитов, заключенных в цисту. Сперматоциты, пройдя мейоз, образуют 64 сперматиды. После мейоза происходят значительные морфологические изменения, включающие сборку аксоном и перестройку мембран и митохондрий. Дифференцировка предшественников

половых клеток требует координированного действия большого числа генных продуктов. Существуют программы координации регулирования сперматогенеза. Выявлен класс мутаций, нарушающих регулирование транскрипции. У мутантов перед делениями мейоза происходит остановка развития сперматоцитов и далее следует их гибель (White-Cooper, 2010). Гены, участвующие в сперматогенезе, обычно транскрибируются в первичных сперматоцитах. Транскрипты белков хранятся в трансляционно репрессированном состоянии до стадии их функционирования. В ядрах сперматид конденсация хроматина приводит к прекращению транскрипции (Steger, 2001; White-Cooper, 2010). Вследствие этого предполагают, что процессы, происходящие в спермиогенезе, зависят от трансляции, в регулировании которой участвует белок РАВР *D. melanogaster*. Утрата функции гена *pAbp* в сперматогенезе приводит к стерильности самцов, что позволяет использовать зародышевую линию дрозофилы в качестве модели для изучения роли белка в клеточных событиях в процессе сперматогенеза. Анализ распределения в семеннике GFP-*pAbp* химерного белка показал, что в процессе сперматогенеза наибольшая концентрация белка РАВР наблюдается в цитоплазме сперматоцитов, распределение белка неравномерно, участки наибольшей концентрации совпадают с участками локализации эндоплазматического ретикулума (Pertceva et al., 2010). Используя фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию, S.P. Blagden с коллегами (2009) выявили и описали дефекты мейоза и цитокинеза в сперматогенезе мутантов *pAbp*. Кроме того, было показано, что мутации гена *pAbp* влияют на структуру небенкерн (Pertceva et al., 2010). Приведенные данные позволяют судить о действии мутаций на отдельные события сперматогенеза, но они не охватывают весь процесс. Электронная микроскопия дает возможность исследовать структурные нарушения внутриклеточных событий сперматогенеза начиная с ранних стадий.

Цель настоящей работы – детальное цитологическое исследование влияния гена *pAbp* на сперматогенез *D. melanogaster* с помощью флуоресцентной световой и электронной микроскопии.

Материалы и методы

Линии *D. melanogaster*, содержащие мутантные по гену *pAbp* аллели w^{1118} ; $P\{EP\}pAbpEP^{310}(17261)$, y^1w^{67c23} ; $P\{EPgy2\}pAbp^{EY11561}(20684)$, y^1w^{67c23} ; $P\{lacW\}pAbp^{k10109}/CyO(10970)$, получены из Блумингтонского центра (Bloomington Stock Center, США). Из гетероаллельных жизнеспособных мутантов была выбрана комбинация $pAbp^{k10109}/pAbp^{EY11561}$. Данные мутации получены методом инсерционного мутагенеза в результате встройки Р-элемента в некодирующую область гена: для $pAbp^{k10109}$ – 102 п. о. и $pAbp^{EY11561}$ – 762 п. о. перед старт-кодоном. Мутация $pAbp^{k10109}$ в гомозиготе летальна, а гомозиготы по $pAbp^{EY11561}$ жизнеспособны и фертильны. Однако самцы, несущие данную аллельную комбинацию (Blagden et al., 2009), были стерильны и имели наибольшее число нарушений в сперматогенезе. В качестве контроля использовали линию дикого типа *Hikone-AW*.

Условия содержания и работы с линиями дрозофил. Для работы с линиями дрозофил брали специальную

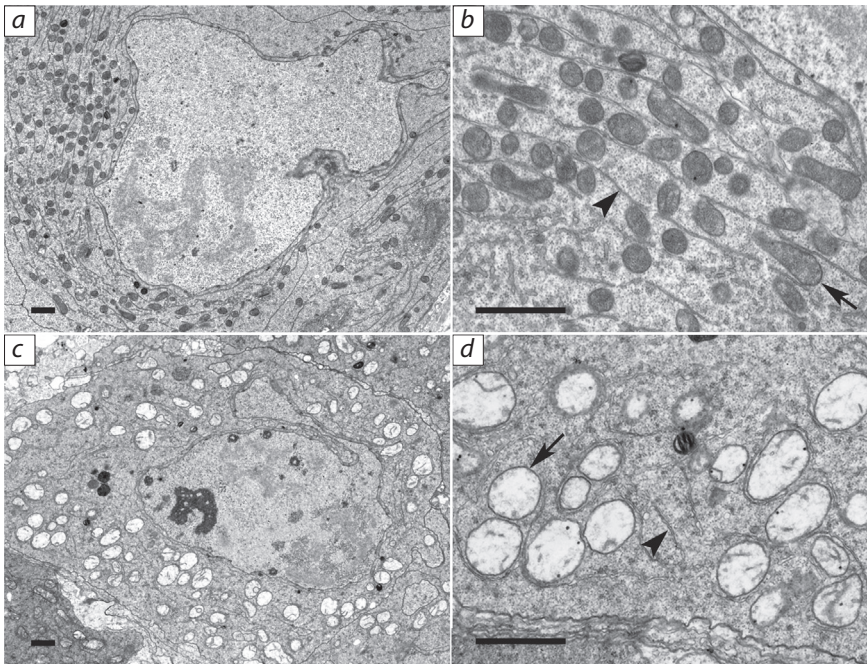


Fig. 1. Mature spermatocyte ultrastructure in wild-type *Drosophila* and the *pAbp*^{k10109}/*pAbp*^{EY11561} mutant.

(a, b) Mitochondria (arrows) of a normal spermatocyte contain densely packed intact cristae associated with highly developed endoplasmic reticulum cisternae (arrowheads). (c, d) In a mutant spermatocyte, swollen mitochondria (arrows) with electron-transparent matrix and remnant cristae are randomly distributed over the cell. Endoplasmic reticulum (arrowheads) is poorly developed in comparison to normal cells, fragmented, and weakly ordered in the cell. Scale bar 1 μm.

обогащенную среду: дрожжи (сухие) – 18 г, изюм – 40 г, агар-агар – 6–12 г, манная крупа – 36 г, патока – 50 мл, пропионовая кислота – 0.8 мл, вода – до 1 л. Скрещивания проводили в стаканах диаметром 25 мм при 25 °С.

Приготовление препаратов для электронно-микроскопического анализа. Семенники фиксировали в 2.5 % растворе глутарового альдегида в 0.1M какодилатном буфере (pH 7.2) 2 ч, дофиксировали в 1 % растворе OsO₄ в 0.1M какодилатном буфере в течение 1 ч. Зафиксированные образцы инкубировали в 1 % водном растворе уранилцетата в течение ночи при 4 °С, обезживали в этиловом спирте возрастающей концентрации, заключали в эпоксидную смолу Эпон. Ультратонкие срезы контрастировали в растворе цитрата свинца 5 мин. Препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-100 (Jeol, Япония).

Препараты для иммуногистохимического окрашивания готовили по (Болоболова и др., 2011).

Результаты

Электронно-микроскопический анализ. Процесс сперматогенеза в норме у *D. melanogaster* изучен на ультраструктурном уровне, результаты представлены в статьях (Stanley et al., 1972; Lindsley, Tokuyasu, 1980; Fuller, 1993). Для сравнительного анализа всех стадий сперматогенеза нами получены серии ультратонких срезов разных частей семенников мутантных и нормальных особей. Сперматогонии и ранние сперматоциты, образовавшиеся в результате митотических делений, в норме и у мутанта *pAbp* имели сходное типичное строение. Они содержали небольшое количество клеточных органелл, их цитоплазма была заполнена рибосомами и полисомами. Мелкие митохондрии лежали рядом с короткими фрагментами эндоплазматического ретикулума (ЭР). Митохондрии содержали многочисленные кристы и матрикс, имевший мелкогранулярное гомогенное строение. Первые структурные отличия у мутанта были выявлены в сперматоцитах, находящихся в фазе роста. В норме в процессе развития сперматоцитов, во время активного интерфазного син-

теза, происходят рост объема клеток, увеличение количества клеточных органелл. Митохондрии делятся, увеличиваются в размере, перемещаются в цитоплазматическом пространстве, в целом сохраняя свою ультраструктуру. В зрелых сперматоцитах митохондрии колокализуются с цистернами хорошо развитого ЭР. Часть митохондрий ассоциирована с отдельными цистернами ЭР, но большинство их находится в комплексах, состоящих из параллельных цистерн ЭР и лежащих между ними митохондрий. У мутанта в начале периода роста сперматоцитов в клетках наряду с нормальными встречались единичные более крупные митохондрии, имевшие расширенный, неравномерный по структуре матрикс. В процессе роста сперматоцитов число крупных митохондрий увеличивалось. В зрелых сперматоцитах все митохондрии имели аномальную ультраструктуру. Они выглядели «набухшими», имели неровные контуры, электронно-светлый матрикс, содержали мало крист (рис. 1). ЭР был развит хуже, чем в норме, фрагментирован, слабо упорядочен внутри клетки. Ассоциация митохондрий и ЭР была выражена более слабо по сравнению с нормой, в цитоплазме клетки встречались одиночные митохондрии, а также группы митохондрий, не связанные с ЭР.

В нормальном сперматогенезе зрелые сперматоциты проходят мейотические деления, в результате которых образуются сперматиды. В процессе развития сперматид происходят значительные структурные преобразования хондриома клеток. На начальном этапе все клеточные митохондрии собираются вместе и образуют один большой агломерат рядом с ядром. Затем митохондрии сливаются друг с другом, создавая сферическую структуру, названную небенкерном. Полностью сформированный небенкерн состоит из двух гигантских митохондрий, организованных в плотно упакованную сферу, прослоенную мембранами, подобно луковице. Далее небенкерн делится на две субъединицы – митохондриальные дериваты. Два митохондриальных деривата и аксонома ассоциируют, образуя аксиальный комплекс (рис. 2, а, б). У мутанта процесс формирования большинства небенкернов прошел с раз-

личными нарушениями: аномальное расположение митохондриальных слоев, редукция числа слоев, неполное слияние митохондрий в агломерате, приведшее к тому, что часть митохондрий осталась лежать отдельно. Все небенкерны имели электронно-светлый матрикс, содержали мало крист. После завершения деления небенкернов большинство сперматид содержали по несколько варьирующих в размере митохондриальных дериватов (рис. 2, в, г).

В процессе элонгации в норме митохондриальные дериваты и аксонема согласованно удлиняются, создавая хвостовой отдел сперматиды. Все сперматиды, находящиеся в одной цисте, проходят одновременно стадии спермиогенеза. На поперечном срезе цисты все дериваты имеют приблизительно одинаковые размер и форму (рис. 3, а, б). У мутанта срезы цист на стадии элонгации показали разнообразие ультраструктурные нарушения: митохондриальные дериваты различались по размеру, значительная часть дериватов не ассоциирована с аксонемами, аксиальные комплексы включали разное число аксонем и дериватов, часть аксонем разрушена и видна в виде фрагментов (рис. 3, в, г). Таким образом, у мутанта нарушен процесс образования аксиальных комплексов. Поздних сперматид и зрелых сперматозоидов не выявлено, следовательно, спермиогенез прекратился на стадии элонгации сперматид.

Анализ мутантного фенотипа методами световой микроскопии. Электронно-микроскопический анализ позволил выявить значительные дефекты во внутренней структуре митохондрий, вызванные мутацией *pAbp*. Однако для того чтобы представить общую картину проявления мутации в сперматогенезе, необходимо исследовать мутантный фенотип методами световой микроскопии. Мы провели цитологический анализ при помощи окрашивания семенников митотрекером (mitoTracker Red) – флуоресцентным митохондриальным маркером.

Аномалии во внутриклеточной морфологии начинают отчетливо проявляться в фазе роста сперматоцитов. В процессе роста происходит увеличение цитоплазматического объема

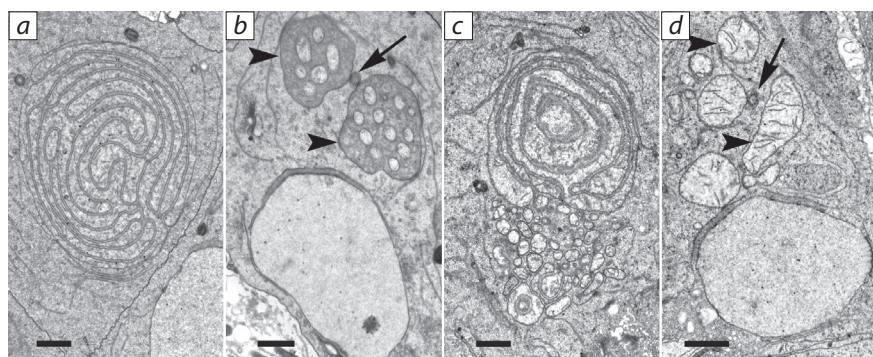


Fig. 2. Nebenkern at the onion stage. Formation of the axial complex in (a, b) wild-type *Drosophila* and (c, d) the *pAbp^{k10109}/pAbp^{EY11561}* mutant.

Nebenkern: (a) shaped as a spherical body with concentric lamellate inner structure; (b) divided into two mitochondrial derivatives (arrowheads) associated with axoneme (arrows) to form an axial complex; (c) with a distorted structure in mutant cells, discontinuous; (d) divided into several mitochondrial derivatives. Scale bar 1 μm.

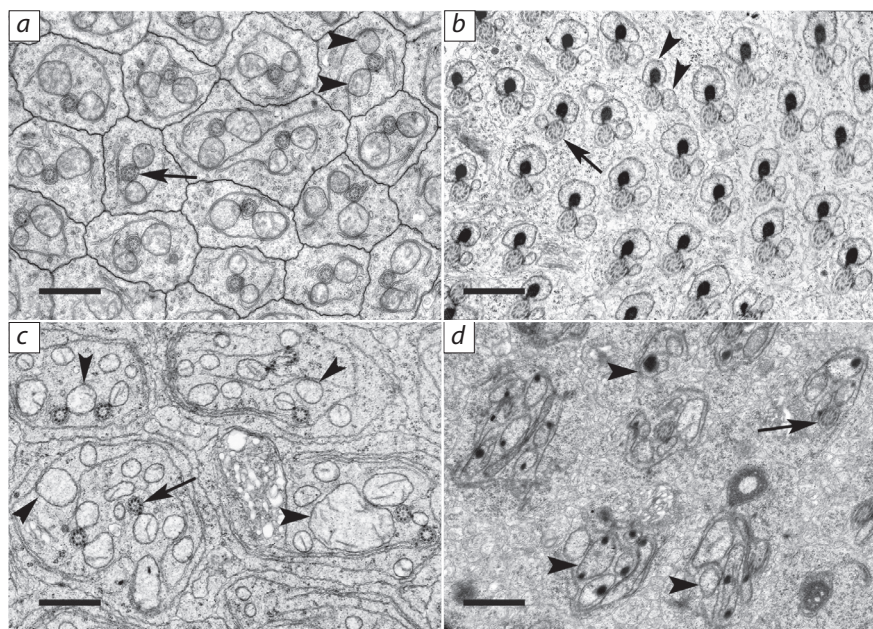


Fig. 3. Cross-section through the tail of an elongating spermatid bundle in wild-type *Drosophila* and in the *pAbp^{k10109}/pAbp^{EY11561}* mutant.

(a, b) In the normal cyst, the mitochondrial derivatives (arrowheads) and axoneme (arrow) of each spermatid concordantly elongate. (c, d) In the mutant cyst, spermatids show various numbers of mitochondrial derivatives, higher than normal, most derivatives not being associated with axonemes; The axial complexes have various numbers of axonemes and mitochondrial derivatives. Scale bar 1 μm.

и количества мембранных структур, в том числе митохондрий. Мутации не влияют на количество митохондрий и их способность к внутриклеточному перемещению. Но если в норме эти органеллы выявляются в виде дискретных, ярко окрашенных и плотных телец, то у мутанта они выглядят более разбухшими, слабо окрашенными и лишенными четких границ. На стадии луковичы такие митохондрии, так же как и в норме, перемещаются в определенную область цитоплазмы и формируют консолидированную структуру – митохондриальный дериват или небенкерн. В норме небенкерн имеет сферическую морфологию и равномерно окрашен. У мутанта эта структура окрашивается неоднородно, выглядит диффузной и включает участки различной плотности (рис. 4, а, в).

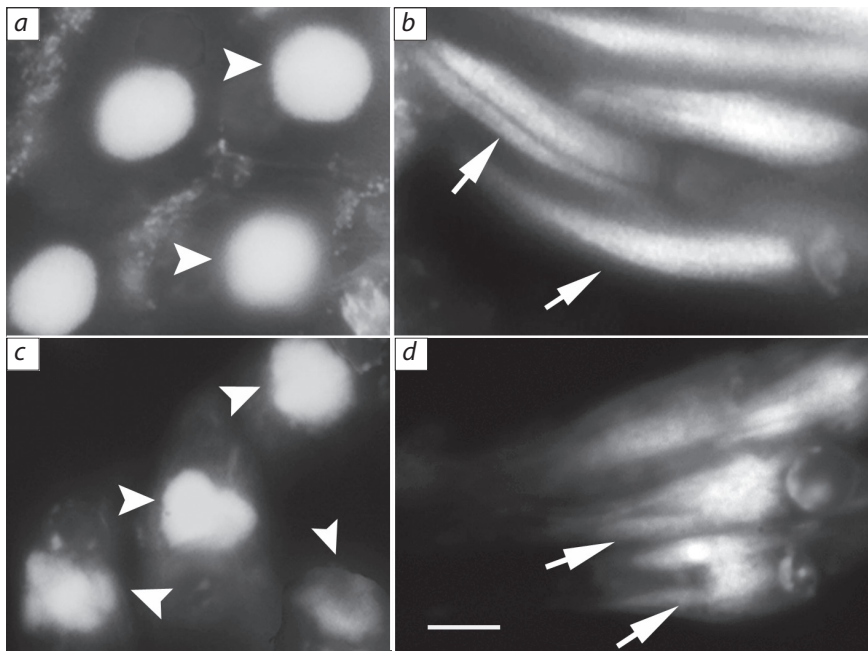


Fig. 4. Mitochondrial derivative (Nebenkern) at the (a, c) onion and (b, d) spermatid elongation stages: (a, b) wild type; (c, d) *pAbp^{k10109}/pAbp^{EY11561}* mutant.

(a) Normal spherical Nebenkern morphology (arrowheads); (b) Nebenkern elongation (arrows). (c) The Nebenkern has a nonhomogeneous morphology (arrowheads). (d) Nebenkern elongation proceeds irregularly and incompletely (arrows). Scale bar 5 μm .

Дальнейшие события в сперматогенезе связаны с элонгацией сперматид, которая сопровождается ростом аксонемы и удлинением митохондрий (рис. 4, б, з). У мутанта в начале стадии элонгации митохондриальные дериваты не приобретают морфологию листа, характерную для нормы. Последующего равномерного удлинения митохондрий также не происходит. В редких случаях наблюдается лишь незначительное вытягивание отдельных участков. В результате аномалий на стадии элонгации образуются цисты, которые содержат не только дефектные митохондриальные дериваты, но и хаотично расположенные ядра.

Обсуждение

Рассмотрение всех стадий сперматогенеза у мутанта *pAbp* показало, что влияние мутации проявилось уже на стадии первичных сперматоцитов, находящихся в процессе интерфазного роста, а самым значительным структурным изменениям подвергся митохондриальный аппарат клеток. Первичное проявление мутации выразилось в набухании митохондрий и изменении их ультраструктуры. Аномальные митохондрии имели электронно-светлый матрикс, содержали мало крист. Митохондриальное набухание определяется как увеличение объема матрикса. Объем митохондриального матрикса контролируется осмотическим балансом между цитозолем и митохондрией. Гомеостазис митохондриального объема является клеточной функцией, необходимой для поддержания структурной целостности органеллы. При набухании митохондрий происходит увеличение их объема за счет поступления жидкости в матрикс. Сначала расширение матрикса приводит к уменьшению межмембранного пространства в кристах. Дальнейшее расширение приводит к увеличению площади внутренней пограничной мембраны, постепенному изменению формы митохондрий на сферическую и, если набухание продолжается, – к разрушению внешней мембраны (Kaasic et al., 2007). Показано, что изменение объема матрикса влияет на некоторые клеточные процессы. Увеличение объема матрикса может активировать дыхательную цепь, увеличивая продукцию аденозин-5'-трифосфата (АТФ) (Halestrap, 1987). Набухание митохондрий сопутствует

высвобождению цитохрома С в процессе запуска апоптоза (Gogvadze et al., 2004). Изменение морфологии митохондрий может быть также следствием действия мутаций. К настоящему времени выделен ряд мутаций, приводящих к изменению или нарушению функционирования митохондрий и характеризующихся их набуханием, например мутации *D. melanogaster PINK1* (Poole et al., 2008), *LETM1* (McQuibban et al., 2010), *emm* (Dorogova et al., 2013). У всех мутантов набухание митохондрий сопровождалось перестройкой крист. Ультраструктурные изменения митохондрий в сперматоцитах мутанта *pAbp* подобны изменениям, описанным у мутантов *LETM1* и *emm*, но последующие структурные изменения митохондриального аппарата у всех мутантов различались. У мутанта *LETM1* набухшие митохондрии подверглись митофагии, мутация была летальна в третьем личиночном возрасте. У мутантов *pAbp* и *emm* процесс сперматогенеза продолжался с различными структурными нарушениями. В результате поздние сперматиды у мутанта *pAbp* отсутствовали, а у *emm* имели аномальное строение, приведшее к стерильности. Выявленное изменение морфологии митохондрий мутанта *pAbp*, проявившееся в набухании, уменьшении плотности матрикса и редукции количества крист, и сравнение с известными данными позволяют предположить, что мутация *pAbp* влияет на функциональную активность митохондрий. Известно, что митохондрия – полифункциональная клеточная органелла, участвующая в разнообразных процессах клеточного метаболизма. Изменение активности митохондрий может повлиять на разные внутриклеточные процессы.

Следующим структурным проявлением действия мутации *pAbp* были слабое развитие ЭР в зрелых сперматоцитах и ослабление ассоциации ЭР и митохондрий. Системы ЭР и митохондрий играют фундаментальную роль в процессе трансляции, поддержании клеточного гомеостаза и определении судьбы клетки в условиях стресса. Исследования последних лет показали важное взаимодействие этих систем. Выявлены зоны контакта между митохондриями и ЭР,

через которые происходит постоянный обмен сигналами, например ионами Ca^{2+} , регулирующими широкий спектр клеточных процессов (Pizzo, Pozzan, 2007). Получены данные о том, что зоны контактов митохондрий с трубочками ЭР могут маркировать места деления митохондрий (Friedman et al., 2011). Найдены свидетельства того, что движение митохондрий в клетке происходит совместно со специфическими районами ЭР, а некоторые клеточные сигналы эффективно синхронизируют движение органелл. Нарушения во взаимодействии митохондрий и ЭР могут активировать апоптоз (Giorgi et al., 2009). Таким образом, наблюдаемые у мутанта недоразвитие ЭР и ослабление его ассоциации с митохондриями в период роста сперматоцитов могли привести к изменению внутриклеточного морфогенеза, снижению уровня трансляции и значительно повлиять на более поздние стадии сперматогенеза.

Процесс формирования небенкерн в сперматиде включает перемещение всех клеточных митохондрий в один район возле ядра, их слияние в единую органеллу и далее формирование ее внутренней структуры. Форма митохондрий и ее изменение детерминируются динамически противоположными процессами слияния и деления органелл. В этих процессах участвуют белки цитозоля, внешней и внутренней митохондриальных мембран (Westermann, 2008; Van der Bleik et al., 2013). Выявленные нарушения структуры небенкернов у мутанта *pAbp* показали, что в большинстве случаев процесс слияния митохондрий прошел не полностью, часть митохондрий осталась лежать отдельно от общей сферической структуры, внутренняя структура большинства небенкернов имела аномальное строение, следовательно ее формирование было нарушено. Можно предположить, что мутация затронула функционирование механизмов слияния и деления митохондрий. Сравнение структурных нарушений мутантов *pAbp* и *fzo* подтверждает это предположение. Белок FZO участвует в слиянии митохондрий и является специфичным для сперматогенеза *Drosophila*. Мутация *fzo* приводит к формированию небенкерна, состоящего из нескольких субъединиц. На стадии элонгации каждая сперматида содержит по несколько удлиняющихся митохондрий, что приводит к нарушению формирования аксиальных комплексов и стерильности (Hales, Fuller, 1997). Похожий эффект наблюдался в случае мутации *pAbp*. У мутанта *pAbp* после деления небенкернов сперматиды содержали по несколько митохондрий, показаны множественные нарушения формирования аксиальных комплексов. Спермиогенез прекратился на стадии элонгации сперматид. Проведенный структурный анализ показал, что первичный морфологический эффект мутации гена *pAbp* на процесс сперматогенеза проявляется на стадии сперматоцитов, находящихся в фазе роста. Первичной структурной мишенью мутации *pAbp* является митохондриальный аппарат клеток. Далее действие мутации происходит плейотропно и вызывает серию структурных нарушений на всех последующих стадиях, в итоге приводящих к остановке сперматогенеза на стадии элонгации цист. Таким образом, белок PABP *D. melanogaster* участвует во многих событиях сперматогенеза и играет значительную роль в структурной дифференцировке гамет в процессе спермиогенеза.

Acknowledgments

This work was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0003 and the Russian Foundation for Basic Research, project 16-04-01018a.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Blagden S.P., Gatt M.K., Archambault V., Lada K., Ichihara K., Lilley K.S., Inoue Y.H., Glover D.M. *Drosophila* Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. *Dev. Biol.* 2009;334:186-197. DOI 10.1016/j.ydbio.2009.07.016.
- Bolobolova E.U., Yudina O.S., Dorogova N.V. *Drosophila* tumor suppressor Merlin is essential for morphogenesis of mitochondria during sperm formation. *Tsitologiya = Cytology.* 2011;53(1):31-38. (in Russian).
- Clouse K.N., Ferguson S.B., Schüpbach T. Squid, Cup and PABP 55B function together to regulate gurken translation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 2008;313:713-724. DOI 10.1016/j.ydbio.2007.11.00.
- Dorogova N.V., Bolobolova E.U., Akhmetova K.A., Fedorova S.A. *Drosophila* male-sterile mutation emmenthal specifically affects the mitochondrial morphogenesis. *Protoplasma.* 2013;250(2):515-520. DOI 10.1007/s00709-012-0434-2.
- Friedman J.R., Lackner L.L., West M., DiBenedetto J.R., Nunnari J., Voeltz G.K. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science.* 2011;334:358-362. DOI 10.1126/science.1207385.
- Fuller M. *The Development of Drosophila melanogaster*. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.
- Gallie D.R. Insights from a paradigm shift: how the poly(A)-binding protein brings translating mRNAs full circle. *New J. Sci.* 2014;2014: 1-16. DOI 10.1155/2014/873084.
- Giorgi C., Stefani D., Bononi A., Rizzuto R., Pinton P. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009;41:1817-1827. DOI 10.1016/j.biocel.2009.04.010.
- Gogvadze V., Robertson J.D., Enoksson M., Zhivotovsky B., Orrenius S. Mitochondrial cytochrome c release may occur by volume-dependent mechanisms not involving permeability transition. *Biochem. J.* 2004;378(1):213-217. DOI 10.1042/BJ20031193.
- Gorgoni B., Richardson W.A., Burgess H.M., Anderson R.C., Gavin S., Wilkie G.S., Gautier P., Martins J.P.S., Brook M., Sheets M.D., Gray N.K. Poly(A)-binding proteins are functionally distinct and have essential roles during vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;109(19):7844-7849. DOI 10.1073/pnas.1017664108.
- Goss D.J., Kleiman F.E. Poly(A)-binding proteins: are they all created equal? *WIREs RNA.* 2013;4:167-179. DOI 10.1002/wrna.1151.
- Hales K.G., Fuller M.T. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell.* 1997; 90(1):121-129. DOI 10.1016/S0092-674(00)80319-0.
- Halestrap A.P. The regulation of the oxidation of fatty acids and other substrates in rat heart mitochondria by changes in matrix volume induced by osmotic strength, valinomycin and Ca^{2+} . *Biochem. J.* 1987; 244(1):159-164.
- Kaasic A., Safiulina D., Zharkovsky A., Veksler V. Regulation of mitochondrial matrix volume. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;292:157-163. DOI 10.1152/ajpcell.00272.2006.
- Ko S., Park J.-H., Lee A.-R., Kim E., Kim J., Kawasaki I., Shim Y.-H. Two mutations in *pab-1* encoding poly(A)-binding protein show similar defects in germline stem cell proliferation but different longevity in *C. elegans*. *Mol. Cells.* 2010;30:167-172. DOI 10.1007/s10059-010-0103-2.
- Lindsley D.L., Tokuyasu K.T. *Genetics and Biology of Drosophila*. N. Y.: Acad. Press, 1980.

- Mangus D.A., Evans M.C., Jacobson A. Poly(A)-binding proteins: multi-functional scaffolds for the posttranscriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 2003;4(7):223. DOI 10.1186/gb-2003-4-7-223.
- McQuibban A.G., Joza N., Megighian A., Scorzeto M., Zanini D., Reipert S., Richter C., Schweyens R.J., Nowikovsky K. A *Drosophila* mutant of LETM1, a candidate gene for seizures in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(6):987-1000. DOI 10.1093/hmg/ddp563.
- 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;34(10):991-996. DOI 10.1042/CBI20100105.
- Pizzo P., Pozzan T. Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell. Biol.* 2007;17(10):511-517. DOI 10.1016/j.tcb.2007.07.011.
- Poole A.C., Thomas R.E., Andrews L.A., McBride H.M., Whitworth A.J., Leo J., Pallanck L.J. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(5):1638-1643. DOI 10.1073/pnas.0709336105.
- Sachs A.B., Davis R.W., Kornberg R.D. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell. Biol.* 1987;7(9):3268-3276. DOI 10.1128/MCB.7.9.3268.
- Sigrist S.J., Thiel P.R., Reiff D.F., Lachance P.E., Lasko P., Schuster C.M. Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature.* 2000;405(6790):1062-1065. DOI 10.1038/35016598.
- Stanley H.P., Bowman J.T., Romrell L.J., Reed S.C., Wilkinson R.F. Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.* 1972;41:433-466.
- Steger K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat. Embriol.* 2001;203:323-334.
- Thakurta A.G., Yoon J.H., Dhar R. *Schizosaccharomyces pombe* spPABP, a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Pab1p, is a non-essential, shuttling protein that facilitates mRNA export. *Yeast.* 2002;19:795-802. DOI 10.1002/yea.876.
- Van der Bleik A.M., Shen Q., Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5:a011072. DOI 10.1101/cshperspect.a011072.
- Westermann B. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J. Biol. Chem.* 2008;283(20):13501-13505. DOI 10.1074/jbc.R800011200.
- White-Cooper H. Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. *Reproduction.* 2010;139:11-21. DOI 10.1530/REP-09-0083.