

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ СУПРЕССОРА ОПУХОЛЕЙ MERLIN С ПОМОЩЬЮ ТРАНСГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ В СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ *DROSOPHILA*

О.С. Юдина, Ю.А. Галимова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: yudina@bionet.nsc.ru

Впервые на модели сперматогенеза *Drosophila* были изучены функциональные домены белка Merlin и показаны различия в функционировании белка в соматической и генеративной тканях.

Введение

Способность к регуляции пролиферации – важнейшее свойство многоклеточных организмов, необходимое им для того, чтобы контролировать свой размер и форму, поэтому нарушения в контроле деления клетки могут иметь тяжелые последствия. Ошибочная активация пролиферации часто заканчивается формированием опухоли и развитием рака. Многие гены, как непосредственно контролируемые пролиферацию, так и косвенно вовлеченные в контроль клеточного цикла, были идентифицированы в качестве онкогенов и тумор-супрессоров.

Среди известных тумор-супрессоров интересен открытый в 1993 г. ген *Neurofibromatosis 2 (NF2)*, кодирующий белок Merlin, принадлежащий к суперсемейству p4.1, – большой группе цитоплазматических белков, связанных с мембраной. Наибольшую степень сходства он имеет с белками подсемейства ERM (ezrin-radixin-moesin). Отсюда название Merlin – Moesin-ezrin-radixin-like. Мутация именно этого гена вызывает заболевание под названием «нейрофиброматоз второго типа», характеризующееся формированием билатеральной акустической шванномы, поражающей восьмью пару черепно-мозговых нервов, а также других опухолей, ассоциированных с центральной нервной системой (Martuza, Eldridge, 1988; Rouleau *et al.*, 1993; Trofatter *et al.*, 1993).

В структуре белка Merlin можно выделить три части: N-концевой FERM (Four-point one,

ezrin, radixin, moezin) домен, протяженный участок coiled-coil и короткий C-концевой домен (Kang *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2002).

N-концевой район на 60 % гомологичен между Merlin и ERM белками, но в пределах FERM-домена Merlin существует участок, состоящий из 7 аминокислот (¹⁷⁰YQMTREM¹⁷⁷), которые идентичны у человеческого и дрозофилиного гомологов Merlin, но отличаются от таковых у ERM-белков. Этот район был назван «Blue Box» (BB). Он имеет важное значение в правильном функционировании белка. Merlin, как и другие белки семейства ERM, может существовать в двух формах: закрытой и открытой. Возможно, что район «Blue Box» играет ключевую роль в конформационных преобразованиях белка, в образовании закрытой конформации белка Merlin путем взаимодействия FERM-домена и C-концевого домена (LaJeunesse *et al.*, 1998). Переключение между конформациями осуществляется путем фосфорилирования киназой PAK (p21-activated kinase) остатка Ser518, а не треонина, как у ERM (Kissil *et al.*, 2002).

Для изучения клеточных функций белка Merlin удобно использовать его гомологи у мыши и у *Drosophila melanogaster*. В обеих системах особи, гомозиготные по мутации, нежизнеспособны, это свидетельствует о жизненно важных функциях Мерлина (Fehon *et al.*, 1997; McClatchey *et al.*, 1997). Эксперименты с использованием мутаций с потерей функций Мерлина и FLP-FRT-системы для получения соматических мозаичных клонов мутантных эпителиальных клеток показали, что, как и у

млекопитающих, Мерлин-дефицитные клетки *Drosophila melanogaster* характеризуются гиперплазией. Таким образом, Мерлин выполняет функцию тумор-супрессора и у *Drosophila melanogaster* (LaJeunesse *et al.*, 1998).

К настоящему времени описаны 4 мутации гена *Merlin* у дрозофилы. Ни один из аллелей не вызывает эмбриональной гибели, три из этих мутаций – *Mer¹*, *Mer²* и *Mer⁴* – вызывают гибель на стадии личинки и куколки. Единственный жизнеспособный аллель – *Mer³*. Мухи, гомозиготные по *Mer³*, доживают до взрослого состояния, но стерильны (Fehon *et al.*, 1997). Было показано, что мутации в гене *Merlin* приводят к дефектам сперматогенеза: мутация *Mer³* влияет на процессы компактизации ядер и поляризации цисты, что приводит к серьезным нарушениям на стадии индивидуализации спермиев и вызывает мужскую стерильность (Dorogova *et al.*, 2008).

Материалы и методы

В работе была использована линия из фонда дрозофил Блумингтон: (9104) *y1 w Mer⁴ P{ry(+t7.2)= neoFRT}19A/FM7i, P {w(+mC)= ActiGFP}JMR3*, в которую нами был введен новый балансер *M-5, B sc w^a (4937) w^[1118]; P{w^{[+mC]}=Gal4::VP16-nos.UTR}MVD}*. Также в работе были использованы следующие линии: *w; P{da-Gal4}* – драйвер (описан в работе (Ito *et al.*, 1997)), *MS 1096-Gal4* (описан в работе (Capdevila, Guerrero, 1994)), балансер *In(1)Binsn, B sn y⁺ w⁺*, балансер *M-5, B sc w^a*, источник эндогенной транспозазы *y w; Ki Delta 2-3*.

Линии, содержащие кДНК мутантных аллелей гена *Merlin*, были получены от Р. Фехона (США) и соответствуют полученным в работе (LaJeunesse *et al.*, 1998).

С помощью праймеров 5'- TGAATACAAGA AGAGAACCTGAATAGGGAATTG-3' и 5'- CA GAAGTAAGGTTTCCTTCACAAAGATCCTC-3' был получен ПЦР-продукт, включающий участок Мус-эпитопа, сшитый с мутантной копией гена *Merlin*. рUASP-вектор и ПЦР-продукт были гидролизованы эндонуклеазами *SacII* и *XbaI* и лигированы. ДНК клонов, несущих вставку *Merlin*, была секвенирована для подтверждения наличия точечной мутации. Трансформация зародышевой линии дрозофилы была выполнена

по методу, описанному в работе (Шилова, Омелянчук, 2007). Для каждой конструкции были получены несколько событий встройки.

Результаты

Для изучения функциональных доменов *Merlin* были созданы различные усеченные копии кДНК гена *Merlin* (LaJeunesse *et al.*, 1998). Выяснить, имеют ли мутантные копии белка доминантно-негативный эффект в клетках зародышевого пути *Drosophila melanogaster*, и если имеют, то какой, позволяет метод эктопической экспрессии. Для эктопической экспрессии генов дрозофилы широко используется система GAL4-UAS (Brand, Perrimon, 1993).

Вектор рUAST, использованный для эктопической экспрессии усеченных копий гена *Merlin* (LaJeunesse *et al.*, 1998), обеспечивает эктопическую экспрессию в соматической ткани, но не в зародышевой линии клеток. Поэтому выяснить, каким образом белок *Merlin* влияет на сперматогенез, используя конструкции в составе вектора рUAST, невозможно.

Чтобы преодолеть эту проблему, был создан модифицированный вектор, который позволяет получить высокий уровень экспрессии белков в генеративной ткани и изучить их влияние на оогенез, ранний эмбриогенез и сперматогенез (Rorth, 1998).

Используя кДНК мутантных аллелей *Merlin* (LaJeunesse *et al.*, 1998) и вектор рUASp, мы изучили влияние *Merlin* на сперматогенез *Drosophila melanogaster*.

Получение трансгенных линий мух

На основании данных, описанных в работе (LaJeunesse *et al.*, 1998), были выбраны несколько наиболее интересных мутантных и усеченных копий белка для анализа их функциональной значимости в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*:

musMer⁺ – полноразмерная копия нормального белка *Merlin*;

musMer¹⁻¹⁶⁹ – N-концевой участок белка, содержащий аминокислотные остатки с 1 по 169;

musMer¹⁻³⁷⁹ – N-концевой участок белка, содержащий аминокислотные остатки с 1 по 379;

мусMer³⁴⁵⁻⁶³⁵ – С-концевой участок белка, содержащий аминокислотные остатки с 345 по 635;

мусMer³ – белок, в котором метионин в положении 177 заменен на изолейцин;

мусMer^{ΔBB} – белок, в котором отсутствует Blue Box.

Все эти усеченные и мутантные формы белка Merlin были клонированы в вектор pUASp. Для каждой конструкции было получено несколько независимых трансгенных линий мух, которые были проанализированы на способность экспрессировать усеченные формы белка.

Анализ эктопической экспрессии мутантных вариантов белка Merlin в соматической ткани

Специфичность и уровень экспрессии полученных конструкций были проверены при помощи драйвера 1096-Gal4, обеспечивающего высокий уровень экспрессии в дорзальной области почки крылового имагинального диска (Cardevila, Guertgen, 1994) с более слабой экспрессией в вентральной области (Lunde *et al.*, 1998). Имагинальные крыловые диски мух с комбинациями драйвер 1096-Gal4 и вектор UASp-мусMer*, а также 1096-GAL4 и UASp-мусMer* (* различные транскрипированные копии гена Merlin) были окрашены антителами на мус-эпитоп, пришитый к N-концу мутантных белков мусMer⁺, мусMer¹⁻¹⁶⁹, мусMer¹⁻³⁷⁹, мусMer³⁴⁵⁻⁶³⁵, мусMer³, мусMer^{ΔBB}. В случае использования вектора pUASp совместно с драйвером 1096-Gal4 специфический паттерн экспрессии в крыловом имагинальном диске значительно больше, чем при использовании конструкций в составе вектора pUASp с тем же драйвером.

Восстановление сперматогенеза у мутантов Mer⁴ с помощью эндогенной экспрессии усеченных копий гена Merlin

Были проведены эксперименты по спасению летальной мутации Mer⁴ полученными нами конструкциями. В случае этой мутации образуется короткий нефункциональный белок длиной всего 170 аминокислот. Гибель мух, содержащих только этот мутантный аллель,

происходит на стадии личинки и куколки. Для спасения летального фенотипа мутации Mer⁴ были использованы полученные нами конструкции, активируемые драйвером *da-Gal4*, обеспечивающим повсеместную экспрессию.

Благодаря повсеместной экспрессии полного размера белка Merlin происходило полное восстановление жизнеспособности и всех процессов сперматогенеза мух и, как следствие, восстановление фертильности.

Аналогичный эксперимент был проведен с трансгенной конструкцией UASp-мусMer³. В этом случае также происходило спасение летального фенотипа, образовывался класс самцов, выживших за счет экспрессии Mer³. У этих самцов в сперматогенезе были обнаружены нарушения, характерные для оригинального аллеля Mer³, восстановление фертильности не происходило.

В случае эктопической экспрессии UASp-мусMer¹⁻³⁷⁹ на фоне Mer⁴ жизнеспособность летальных мутантов Mer⁴ полностью восстанавливалась, но в сперматогенезе восстановление не происходило, наблюдалась картина, характерная для мутантов Mer⁴, фертильность не восстанавливалась.

При эктопической экспрессии pUASp-мусMer¹⁻¹⁶⁹, pUASp-мусMer^{ΔBB}, pUASp-мусMer³⁴⁵⁻⁶³⁵ на фоне мутации Mer⁴ спасение летального фенотипа мутации Mer⁴ не происходит.

Надо заметить, что в экспериментах по спасению фенотипа летальной мутации Mer⁴ конструкцией pUASp-мусMer^{ΔBB} происходит незначительное восстановление в соматической ткани и в сперматогенезе (из куколок вылетело незначительное количество ослабленных самцов, которые погибли в первые часы жизни). Картина в сперматогенезе сходна с картиной сперматогенеза у мутантов Mer³.

Таким образом, наши результаты по восстановлению фенотипа мутации Mer⁴ полностью согласуются с результатами, полученными ранее на соматической ткани (LaJeunesse *et al.*, 1998), и мы можем дополнительно убедиться в том, что полученные нами конструкты обеспечивают необходимый уровень экспрессии исследуемых форм белка Merlin в ответ на активацию требуемым драйвером.

Мы выявили влияние отдельных доменов белка Merlin на сперматогенез *Drosophila*

melanogaster. Полное восстановление сперматогенеза и фертильности обеспечивает только полноразмерный белок Merlin. Ни одна из усеченных или мутантных форм Merlin не обеспечивала полного восстановления сперматогенеза. Таким образом, можно заключить, что как N-, так и C-концевые домены важны в этом процессе, а также важен район «Blue Box», который контролирует внутримолекулярные конформационные переходы белка Merlin.

Таблица 1

Восстановление жизнеспособности и сперматогенеза у мутантов *Mer^A* с помощью экспрессии различных усеченных форм белка

Усеченные варианты белка Merlin	Способность спасти летальный фенотип у мутантов <i>Mer^A</i>	Способность восстанавливать сперматогенез у мутантов <i>Mer^A</i>
mysMer ⁺	+	+
mysMer ³	+	—**
mysMer ^{ΔBB}	+/-*	—**
mysMer ¹⁻³⁷⁹	+	—**
mysMer ³⁴⁵⁻⁶³⁵	—	—
mysMer ¹⁻¹⁶⁹	—	—

* Было обнаружено незначительное количество мух, доживающих до имаго, но с сильно ослабленной жизнеспособностью. ** Уровень нарушений в сперматогенезе у мутантов *Mer^A* снижен до уровня *Mer³*.

Обсуждение

В работах (LaJeunesse *et al.*, 1998) было показано восстановление жизнеспособности летальной мутации *Mer^A* с помощью эктопической экспрессии различных усеченных копий белка Merlin, последовательности которых клонированы в вектор pUAST. С помощью экспериментов по спасению летальных мутаций *Mer¹*, *Mer²* и *Mer^A* был определен район белка Merlin, несущий ключевые жизненно важные функции (LaJeunesse *et al.*, 1998) – это участок, состоящий из первых 350 аминокислот. В этих экспериментах UAS-конструкты, несущие различные усеченные копии белка, экспрессировались под контролем повсеместного драйвера

T80-Gal4 на фоне летальных мутаций. Полное восстановление нормального фенотипа в соматической ткани обеспечивали белки mysMer¹⁻⁶⁰⁰ и mysMer⁺, частичное спасение – mysMer¹⁻³⁷⁵ и mysMer¹⁻³⁵⁰. Более короткие белки, а также mysMer^{ΔBB} и mysMer^{BBA}, не обеспечивали восстановления фенотипа. Частичное спасение также наблюдалось в случае mysMer³, а у выживших мух были все нарушения фенотипа, характерные для оригинального аллеля *Mer³*.

Полученные нами результаты и результаты, полученные ранее в лаборатории Фехона, можно интерпретировать, исходя из данных структурного анализа белка (Li *et al.*, 2007). Кристалло-структурный анализ проводили для белка Moesin *Spodoptera frugiperda* (SfMoesin). Сравнение последовательностей белков семейства ERM Merlin и Moesin показало высокий уровень гомологии функциональных доменов этих белков (Hughes, Fehon, 2006; Li *et al.*, 2007). Внутримолекулярные взаимодействия в белке Moesin аналогичны взаимодействиям в Merlin. Ввиду высокой гомологии этих белков можно проводить аналогию структуры белка Merlin *Drosophila melanogaster* со структурой Moesin *Spodoptera frugiperda* с учетом смещения аминокислотной последовательности.

В закрытой конформации альфа-спиральный район закрывает часть FERM-домена, таким образом, могут образовываться новые сайты и перекрываться имеющиеся на FERM-домене. В белке Merlin в N-концевом участке есть актин-связывающий сайт, который расположен между 1 и 27 аминокислотными остатками (Golovnina *et al.*, 2005). Район альфа-спирали, альфа-В (участок с 320-й по 369-ю аминокислоту), связан водородными связями именно с этим участком, который благодаря такому связыванию образует петлевую структуру, выступающую над молекулой белка (Li *et al.*, 2007). Возможно, что если альфа-В спираль отсутствует или не связана с N-концевым участком, то эта петлевая структура не образуется и не формируется сайт связывания с актином. Этим можно объяснить тот факт, что mysMer¹⁻³³⁰ не спасает жизнеспособность мух, мутантных по гену *Merlin*, а mysMer¹⁻³⁷⁹ спасает.

Таким образом, для соматической ткани необходима закрытая форма белка Merlin, и именно в этой форме белок взаимодействует с актином.

Так как *musMer*¹⁻³⁷⁹ не спасает процесс сперматогенеза у мутантов по гену *Merlin*, можно предположить, что для этого процесса необходима такая форма белка Merlin, которая имеет С-концевой участок, или же нужна открытая форма белка. Мы также предполагаем, что на разных стадиях сперматогенеза функционируют разные формы белка. Нарушения сперматогенеза при восстановлении летальной мутации *Mer*⁴ с помощью экспрессии N-концевого участка белка сходны с нарушениями у мутантов *Mer*³.

В случае мутации *Mer*³ нарушений в сперматогенезе дрозофилы меньше, чем у мутантов *Mer*⁴, и основные нарушения происходят на более поздних стадиях, начиная со стадии элонгации сперматид. Точечная мутация *Mer*³ приводит к нарушениям участка «Blue Vox», который важен для различных процессов в организме, но, скорее всего, не приводит к нарушениям конформации закрытой формы белка, в то время как при делеции всего района «Blue Vox» белок утрачивает способность к конформационным переходам и способность образовывать закрытую форму белка. Белок *musMer*^{ABB} не восстанавливает жизнеспособность летальной мутации *Mer*⁴ и сперматогенез у этих мутантов. Вероятно, для правильного протекания ранних этапов сперматогенеза дрозофилы необходима закрытая форма белка, а на более поздних стадиях важные функции для этого процесса выполняет открытая форма. Исходя из вышесказанного, можно считать, что следующие усеченные и мутантные формы белка Merlin соответствуют различным конформационным формам белка: *musMer*¹⁻³³⁰ – аналог константно открытой конформации белка; *musMer*¹⁻³⁷⁹ – аналог константно закрытой конформации белка; *musMer*³ – аналог закрытой конформации белка; *musMer*^{ABB} – аналог константно открытой конформации белка.

Так как мы предполагаем, что белок Merlin с удаленным районом «Blue Vox» всегда находится в открытой форме, то восстановление летального фенотипа мутации *Mer*⁴ этой формой приводит к тому, что закрытая форма, необходимая для протекания ранних стадий сперматогенеза, у них отсутствует, соответственно ранние процессы проходят с нарушениями, что влечет за собой нарушения и на более поздних стадиях.

Возможно, белок *musMer*¹⁻³⁷⁹ аналогичен константно закрытой конформации из-за отсутствия у этой формы С-концевого домена. Так как эта конструкция не обеспечивает восстановление процессов сперматогенеза, то можно заключить, что С-концевой участок белка Merlin играет важную роль в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*. Фосфорилирование серина в положении 518, расположенного на С-концевом участке белка *merlin* человека, приводит к внутримолекулярным конформационным переходам (Kissil *et al.*, 2002). Этому положению в белке человека соответствует треонин в положении 559 в белке Merlin дрозофилы (Golovnina *et al.*, 2005).

Восстановление жизнеспособности мутантов *Mer*⁴ конструкцией *musMer*¹⁻³⁷⁹ при использовании драйвера с повсеместной экспрессией и абсолютное невосстановление сперматогенеза этой же конструкцией свидетельствуют о том, что в соматической и генеративной тканях белок Merlin функционирует по-разному. Вероятнее всего, эта разница связана с тем, что белок Merlin принимает участие в различных взаимодействиях с белковыми комплексами в разных типах клеток. Мы предполагаем, что это связано с тем, что С-концевой участок белка Мерлин играет важную роль в сперматогенезе *Drosophila melanogaster*, и отсутствие этого участка, а соответственно и сайта фосфорилирования, делает невозможными эти переходы.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Н.В. Дороговой и Л.В. Омелянчуку за консультации и руководство работой. Работа выполнялась в рамках проекта РФФИ 08-04-00265-а.

Литература

- Шилова И.Э., Омелянчук Л.В. Метод трансформации клеток зародышевого пути дрозофилы высококонцентрированной экзогенной ДНК // Генетика. 2007. Т. 43. № 1. С. 96–99.
- Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // *Development*. 1993. V. 118. P. 401–415.
- Capdevila J., Guerrero I. Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern

- duplications and growth alterations in *Drosophila* wings // *The EMBO J.* 1994. V. 13. P. 4459–4468.
- Dorogova N.V., Akhmametyeva E.M., Kopyl S.A. *et al.* The role of *Drosophila* Merlin in spermatogenesis // *BMC Cell Biol.* 2008. V. 10. № 9(1). P. 1.
- Fehon R.G., Oren T., LaJeunesse D.R. *et al.* Isolation of mutations in the *Drosophila* homologues of the human *Neurofibromatosis 2* and yeast *CDC42* genes using a simple and efficient reverse-genetic method // *Genetics.* 1997. V. 146. P. 245–252.
- Golovkina K., Blinov A., Akhmametyeva E.M. *et al.* Evolution and origin of merlin, the product of the *Neurofibromatosis type 2* (NF2) tumor-suppressor gene // *BMC Evol. Biol.* 2005. V. 5. P. 69.
- Hughes S.C., Fehon R.G. Phosphorylation and activity of the tumor suppressor Merlin and the ERM protein Moesin are coordinately regulated by the Slik kinase // *J. Cell Biol.* 2006. V. 175. № 2. P. 305–313.
- Ito K., Awano W., Yamamoto D. Cell lineage analysis of adult fly brains using the FLIPPASE/FRT and GAL4/UAS systems // *J. Neurogenet.* 1997. V. 11. P. 164–165.
- Kang B.S., Cooper D.R., Devedjiev Y. *et al.* The structure of the FERM domain of merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2002. V. 58. P. 381–391.
- Kissil J.L., Johnson K.C., Eckman M.S., Jacks T. Merlin phosphorylation by p21-activated kinase 2 and effects of phosphorylation on merlin localization // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 10394–10399.
- LaJeunesse D.R., McCartney B.M., Fehon R.G. Structural analysis of *Drosophila* merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization // *J. Cell Biol.* 1998. V. 141. P. 1589–1599.
- Li Q., Nance M.R., Kulikauskas R. *et al.* Self-masking in an intact ERM-merlin protein: An active role for the central α -helical domain // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 365. P. 1446–1459.
- Lunde K., Biehs B., Nauber U., Bier E. The *knirps* and *knirpsrelated* genes organize development of the second wing vein in *Drosophila* // *Development.* 1998. V. 125. P. 4145–4154.
- Martuza R.L., Eldridge R. Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis) // *N. Eng. J. Med.* 1988. V. 318. P. 684–688.
- McClatchey A.I., Saotome I., Ramesh V. *et al.* The *Nf2* tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 1253–1265.
- Rørth P. Gal4 in the *Drosophila* female germline // *Mechanisms of Development.* 1998. V. 78. P. 113–118.
- Rouleau G.A., Merel P., Lutchman M., Sanson M. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2 // *Nature.* 1993. V. 363. P. 515–521.
- Shimizu T., Seto A., Maita N., Hamada K. Structural basis for Neurofibromatosis type 2. Crystal structure of the merlin FERM domain // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 10332–10336.
- Trofatter J.A., MacCollin M.M., Rutter J.L., Murrell J. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor // *Cell.* 1993. V. 75. P. 826.

STRUCTURAL ANALYSIS OF TUMOR-SUPPRESSOR MERLIN BY MEANS OF TRANSGENIC CONSTRUCTIONS IN *DROSOPHILA* SPERMATOGENESIS

O.S. Yudina, Yu.A. Galimova

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: e-mail: yudina@bionet.nsc.ru

Summary

For the first time structural analysis reveals functional domains of *Drosophila* Merlin protein and difference in properties of this protein in somatic tissue and in germ cells.