**Testis-specific products of the Drosophila melanogaster sbr gene, encoding nuclear export factor 1, are necessary for male fertility**

**Abstract**

The evolutionarily conserved nuclear export factor 1 (NXF1) provides mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. We described several testis-specific transcripts of the Drosophila melanogaster nxf1 gene designated “sbr” in this species via different PCR approaches and CAGE-seq analysis. Characteristically, most of them have truncated 3′UTRs compared with those in other organs. In addition to regular transcripts, there are shorter transcripts that begin in intron 3 of the sbr gene. These short, 5′-truncated testis-specific transcripts vary in terms of transcription start site and their ability to exclude or retain the last 237 nucleotides of intron 3 in their 5′UTR. Using an anti-SBR antibody against the C-terminal portion of this protein, we detected the major SBR protein (74 kDa) in all analyzed organs of the fly as well as a new smaller protein (60 kDa) found only in the testes. This protein corresponds to the detected sbr transcripts that start in intron 3, based on its molecular mass. We investigated the sbr12 allele of the sbr gene, which is lethal in homozygous females and causes dominant sterility in heterozygous males. Sequencing of the sbr12 gene allele revealed a 30-bp deletion in exon 9 without a frame shift. Western blot analysis with an SBR-specific antibody revealed two bands of the expected size in the testes of heterozygous males. Thus, a mutant protein along with the normal protein presents in the testes of lethal allele-bearing flies and the described shorter testis-specific variant of SBR may account for male sterility.

Эволюционно консервативный фактор ядерного экспорта 1 (NXF1) обеспечивает экспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Мы описали несколько специфичных для семенников транскриптов гена nxf1 Drosophila melanogaster, обозначенного у этого вида как «sbr», с помощью различных подходов ПЦР и анализа CAGE-seq. Характерно, что большинство из них имеют укороченные 3'UTR по сравнению с таковыми в других органах. В дополнение к обычным транскриптам существуют более короткие транскрипты, начинающиеся в интроне 3 гена sbr. Эти короткие 5'-усеченные транскрипты, специфичные для семенников, различаются по сайту начала транскрипции и их способности исключать или сохранять последние 237 нуклеотидов интрона 3 в их 5'UTR. Используя анти-SBR антитела против С-концевой части этого белка, мы обнаружили основной белок SBR (74 кДа) во всех проанализированных органах мухи, а также новый меньший белок (60 кДа), обнаруженный только в семенниках. Этот белок соответствует обнаруженным транскриптам sbr, которые начинаются в интроне 3, исходя из его молекулярной массы. Мы исследовали аллель sbr12 гена sbr, летальный у гомозиготных самок и вызывающий доминантную стерильность у гетерозиготных самцов. Секвенирование аллеля гена sbr12 выявило делецию 30 п.н. в экзоне 9 без сдвига рамки считывания. Вестерн-блот-анализ с SBR-специфическим антителом выявил две полосы ожидаемого размера в семенниках гетерозиготных мужчин. Таким образом, мутантный белок наряду с нормальным белком присутствует в семенниках мух, несущих летальный аллель, и описанный более короткий специфичный для семенников вариант SBR может объяснить мужскую стерильность.

**1. Introduction**

The variety of products derived from a single gene is one facet of gene function specialization. Transcript diversity is a characteristic feature of the nxf (nuclear export factor) gene family. The product of nxf1, the main gene in this family, is responsible for the transport of most mRNAs from the nucleus to the cytoplasm in different eukaryotic organisms (Herold et al., 2000, 2001; Sasaki et al., 2005). This universal function is necessary for all cells with active transcription. The NXF1 protein belongs to a “transport receptor” family. As a receptor, NXF1 nonspecifically interacts with cellular mRNAs through adaptor proteins, and NXF1 also functions as a transporter via interaction with nucleoporins to ensure RNP (ribonucleoprotein) complex transfer through the nuclear pores (Katahira et al., 1999; Bachi et al., 2000; Fribourg et al., 2001; Lévesque et al., 2001; Schmitt and Gerace, 2001; Thakurta et al., 2004; Viphakone et al., 2012). The Drosophila melanogaster small bristles (sbr) gene is an ortholog of the nxf1 genes in other organisms and thus, based on its function, has been designated “Dm nxf1” (Wilkie et al., 2001; Herold et al., 2001; Tretyakova et al., 2001). It is X-linked, and the majority of the known alleles are lethal in a homozygous or hemizygous state in females or males, respectively (FlyBase http://flybase.org). Mutations described at the sbr locus exhibit a broad spectrum of pleiotropic effects, including dominant male sterility (Dybas et al., 1983; Geer et al., 1983; Golubkova et al., 2015). Given that not all sbr alleles cause male sterility, it can be assumed that there are some tissue-specific functions of the sbr gene in spermatogenesis, and these functions are impaired in certain cases (e.g., sbr17 and sbr12 mutant males). Previously, in addition to the canonical 3.5-kb sbr-encoded transcript found in all D. melanogaster organs, we detected shorter testis-specific transcripts (1.9 kb and 2.8 kb) (Ivankova et al., 2010). It is noteworthy that short testisspecific nxf1 transcripts have not been described for mammalian nxf1 genes. However, in Homo sapiens and Mus musculus there are the paralogous genes nxf2 and nxf3, which are characterized by exceptional or predominant expression in the testes (Herold et al., 2000; Herold et al., 2001; Yang et al., 2001; Sasaki et al., 2005). In D. melanogaster, the nxf family includes four genes (Herold et al., 2001) and their role in spermatogenesis is poorly understood.

Разнообразие продуктов, происходящих от одного гена, является одним из аспектов специализации функций генов. Разнообразие транскриптов является характерной чертой семейства генов nxf (nuclear export factor). Продукт nxf1, основного гена этого семейства, отвечает за транспорт большинства мРНК из ядра в цитоплазму у различных эукариотических организмов (Herold et al., 2000, 2001; Sasaki et al., 2005). Эта универсальная функция необходима для всех клеток с активной транскрипцией. Белок NXF1 принадлежит к семейству «транспортных рецепторов». В качестве рецептора NXF1 неспецифически взаимодействует с клеточными мРНК через адаптерные белки, а NXF1 также функционирует как транспортер посредством взаимодействия с нуклеопоринами для обеспечения переноса комплекса RNP (рибонуклеопротеина) через ядерные поры (Katahira et al., 1999; Bachi et al., 2000; Fribourg et al., 2001; Lévesque et al., 2001; Schmitt and Gerace, 2001; Thakurta et al., 2004; Viphakone et al., 2012). Ген small bristles (sbr) Drosophila melanogaster является ортологом генов nxf1 других организмов и поэтому на основании своей функции получил обозначение «Dm nxf1» (Wilkie et al., 2001; Herold et al., 2001; Третьякова). и др., 2001). Он сцеплен с Х-хромосомой, и большинство известных аллелей летальны в гомозиготном или гемизиготном состоянии у самок или самцов соответственно (FlyBase http://flybase.org). Мутации, описанные в локусе sbr, проявляют широкий спектр плейотропных эффектов, включая доминантную мужскую стерильность (Dybas et al., 1983; Geer et al., 1983; Голубкова и др., 2015). Учитывая, что не все аллели sbr вызывают мужское бесплодие, можно предположить, что существуют некоторые тканеспецифические функции гена sbr в сперматогенезе, причем эти функции в определенных случаях нарушены (например, у мутантных самцов sbr17 и sbr12). Ранее, помимо канонического sbr-кодируемого транскрипта размером 3,5 т.п.н., обнаруженного во всех органах D. melanogaster, мы обнаружили более короткие транскрипты, специфичные для семенников (1,9 т.п.н. и 2,8 т.п.н.) (Ivankova et al., 2010). Примечательно, что короткие транскрипты nxf1, специфичные для семенников, не описаны для генов nxf1 млекопитающих. Однако у Homo sapiens и Mus musculus имеются паралогичные гены nxf2 и nxf3, для которых характерна исключительная или преобладающая экспрессия в семенниках (Herold et al., 2000; Herold et al., 2001; Yang et al., 2001; Сасаки и др., 2005). У D. melanogaster семейство nxf включает четыре гена (Herold et al., 2001), и их роль в сперматогенезе плохо изучена.

Herein, we determined in detail the organization and origin of testisspecific sbr transcripts. We provide evidence that most sbr transcripts have truncated 3′UTRs in the testes, and the start points for the testisspecific 1.9-kb transcripts are localized in intron 3. Western blot analysis exploring antibodies to the C-terminal fragment of the SBR protein identified universal (74 kDa) and testis-specific, short (60 kDa) forms of SBR in D. melanogaster. Furthermore, the deletion of 10 aa in the testis-specific SBR protein leads to dominant male sterility, implying the significance of this protein in spermatogenesis.

Здесь мы подробно определили организацию и происхождение специфичных для семенников транскриптов sbr. Мы приводим доказательства того, что большинство транскриптов sbr имеют укороченные 3'UTR в семенниках, а стартовые точки для специфичных для семенников 1,9-т.п.н. (74 кДа) и специфичные для семенников короткие (60 кДа) формы SBR у D. melanogaster. Более того, делеция 10 а.о. в специфическом для семенников белке SBR приводит к доминантной мужской стерильности, что указывает на важность этого белка в сперматогенезе.

**3. Results**

**3.1. The sbr gene allele with a male sterility phenotype comprises a 30-bp deletion that does not shift the ORF**

The sbr12 allele is one of the 9 recessive lethal alleles among 23 known alleles of the sbr gene (FlyBase http://flybase.org). Viable males, heterozygous at the sbr12 allele, can be obtained by using the duplication Dp(1;Y) y+ v+ (FlyBase ID: FBab0003206). Besides the alleles y+ and v+ this duplication includes also the sbr+ and В+ alleles. Heterozygous males sbr12/Dp(1;Y) y+ v+ exhibit a dominant male sterility phenotype. This phenotype is allele-specific because the other lethal sbr alleles, such as sbr0, sbr5, or sbr6 do not cause male sterility in the presence of the duplication Dp(1;Y) y+ v+.

Аллель sbr12 является одним из 9 рецессивных летальных аллелей среди 23 известных аллелей гена sbr (FlyBase http://flybase.org). Жизнеспособных самцов, гетерозиготных по аллелю sbr12, можно получить с помощью дупликации Dp(1;Y) y+ v+ (FlyBase ID: FBab0003206). Кроме аллелей y+ и v+ в эту дупликацию входят также аллели sbr+ и В+. Гетерозиготные самцы sbr12/Dp(1;Y) y+ v+ демонстрируют доминантный фенотип мужской стерильности. Этот фенотип является аллель-специфическим, поскольку другие летальные аллели sbr, такие как sbr0, sbr5 или sbr6, не вызывают мужской стерильности в присутствии дупликации Dp(1;Y) y+ v+.

To determine what changes in the sbr gene sequence distinguish the sbr12 allele from the wild type, we amplified and sequenced all coding sequences of the sbr12 allele that comprise the following three regions of the gene: exons 1–3, 4–5 and 6–10 (Fig. 1A). Introns 3, 5, the 5′UTR and the 3′UTR were not included in the analysis.

Чтобы определить, какие изменения в последовательности гена sbr отличают аллель sbr12 от дикого типа, мы амплифицировали и секвенировали все кодирующие последовательности аллеля sbr12, которые включают следующие три области гена: экзоны 1–3, 4–5 и 6– 10 (фиг. 1А). Интроны 3, 5, 5'UTR и 3'UTR не были включены в анализ.

Given that sbr12 is a lethal allele, sequencing was performed using DNA from sbr12/sbr10 heterozygous females. It was possible to control heterozygosity via known SNPs for the sbr10 allele (Korey et al., 2001; Golubkova et al., 2009). As a control, we used genomic DNA isolated from homozygous sbr10 females.

Учитывая, что sbr12 является летальным аллелем, секвенирование проводили с использованием ДНК гетерозиготных самок sbr12/sbr10. С помощью известных SNP для аллеля sbr10 удалось контролировать гетерозиготность (Korey et al., 2001; Golubkova et al., 2009). В качестве контроля использовали геномную ДНК, выделенную от гомозиготных самок sbr10.

In the sbr12 allele, we discovered 3 neutral substitutions: C531T in exon 1, G670T in exon 2 and T12491C in exon 7; we also identified 5 substitutions in the introns: С870G in intron 2, A12264C, G12288T, T12292A, C12387T in intron 6; and finally we found the deletion 2del12294 in intron 6. Importantly, the sbr12 allele contains a 30-bp deletion in exon 9. It is noteworthy that there are direct 5-nucleotide terminal repeats in the deletion breakpoint region (Fig. 1A). The presence of short direct repeats at the breakpoint suggests a recombination mechanism underlying its origin (Shaffer and Lupski, 2000). This finding is of particular interest given that sbr12 mutation was discovered among MR (male recombination)-induced sex-linked recessive lethal mutations (Eeken et al., 1985).

В аллеле sbr12 нами обнаружены 3 нейтральные замены: C531T в экзоне 1, G670T в экзоне 2 и T12491C в экзоне 7; также выявлено 5 замен в интронах: С870G в интроне 2, A12264C, G12288T, T12292A, C12387T в интроне 6; и, наконец, мы обнаружили делецию 2del12294 в интроне 6. Важно отметить, что аллель sbr12 содержит делецию размером 30 п.н. в экзоне 9. Примечательно, что в области точки разрыва делеции имеются прямые 5-нуклеотидные концевые повторы (рис. 1А). Наличие коротких прямых повторов в точке разрыва указывает на механизм рекомбинации, лежащий в основе их происхождения (Shaffer and Lupski, 2000). Это открытие представляет особый интерес, учитывая, что мутация sbr12 была обнаружена среди рецессивных летальных мутаций, сцепленных с полом, индуцированных MR (male recombination) (Eeken et al., 1985).

The deletion of 30 bp does not shift the reading frame in the mutant gene sbr12. Thus, in the resulting mutant SBR12 protein, 10 amino acids from 526 to 535 (TIFITNATHE) are not present. The first 6 of these amino acids belong to the NTF2-like domain and the rest are part of the linker between the NTF2-like and UBA-like domains (domain layout from the Conserved Domain Database (CDD), NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd) (Fig. 2). In spite of the fact that sbr12/Dp(1;Y) y+ v+ males possess the normal sbr+ allele, presence of the mutant sbr12 allele results in a dominant negative effect on male fertility. This suggests that the mutant SBR12 protein with deletion prevents normal spermiogenesis and motile sperm formation (Golubkova et al., 2015).

Делеция 30 п.н. не приводит к сдвигу рамки считывания в мутантном гене sbr12. Таким образом, в полученном мутантном белке SBR12 отсутствуют 10 аминокислот с 526 по 535 (TIFITNATHE). Первые 6 из этих аминокислот относятся к NTF2-подобному домену, а остальные являются частью линкера между NTF2-подобным и UBA-подобным доменами (схема домена из базы данных консервативных доменов (CDD), NCBI http://www. .ncbi.nlm.nih.gov/cdd) (рис. 2). Несмотря на то, что самцы sbr12/Dp(1;Y) y+ v+ обладают нормальным аллелем sbr+, наличие мутантного аллеля sbr12 приводит к доминантно-негативному влиянию на фертильность самцов. Это свидетельствует о том, что мутантный белок SBR12 с делецией препятствует нормальному спермиогенезу и формированию подвижных сперматозоидов (Голубкова и др., 2015).

Previously, we have shown that in D. melanogaster testes, specific 1.9-kb and 2.8-kb sbr transcripts are expressed (Ivankova et al., 2010). Molecular features of the testis-expressed transcripts have not been described yet.

Ранее мы показали, что в семенниках D. melanogaster экспрессируются специфические транскрипты sbr размером 1,9 и 2,8 т.п.н. (Ivankova et al., 2010). Молекулярные особенности транскриптов, экспрессируемых семенниками, еще не описаны.

**3.2. Testis-specific transcripts of the sbr gene start from an alternative promoter and are truncated at the 3′ end**

To further characterize the sbr-originated testis-specific transcripts, we performed RACE-PCR analysis. First of all, we have shown that the short 1.9-kb testis-specific transcript of Drosophila males starts in the largest sbr intron 3 according to 5′ RACE-PCR. We experimentally demonstrated the presence of short sbr transcripts in the D. melanogaster testes belonging to two major types (Fig. 3). The transcripts of the first type start in intron 3. The transcripts of the second type also start in intron 3, upstream from the transcripts of the first type (Figs. 1B, 4), but differ from the first type transcripts in that they do not contain the last 237 nt of intron 3, apparently due to alternative splicing.

Чтобы дополнительно охарактеризовать транскрипты, специфичные для семенников, происходящие из sbr, мы провели анализ RACE-PCR. Прежде всего, мы показали, что короткий 1,9-т.п.о. специфичный для семенников транскрипт самцов дрозофилы начинается в самом большом интроне 3 sbr по данным 5'-RACE-PCR. Мы экспериментально показали наличие коротких транскриптов sbr в семенниках D. melanogaster, принадлежащих к двум основным типам (рис. 3). Транскрипты первого типа начинаются в интроне 3. Транскрипты второго типа также начинаются в интроне 3, выше транскриптов первого типа (рис. 1Б, 4), но отличаются от транскриптов первого типа тем, что они не содержат последних 237 н. интрона 3, по-видимому, из-за альтернативного сплайсинга.

Identification of the transcription start sites (TSSs) by the CAGE-seq method revealed among the testis-expressed sbr gene transcripts starting both in exon 1 and intron 3. In contrast, all head-expressed sbr transcripts started only in exon 1 (Fig. 5). In intron 3, TSSs are mapped within 300–212 nt before the exon 4 start, with the major peak at the 244 nt position (9613 nt position in the gene) that does not contradict the RACE-PCR results (Fig. 4).

Идентификация сайтов начала транскрипции (TSS) с помощью метода CAGE-seq выявила среди экспрессируемых в семенниках транскриптов гена sbr, начинающихся как в экзоне 1, так и в интроне 3. Напротив, все транскрипты sbr, экспрессируемые головой, начинались только в экзоне 1 (рис. 5). В интроне 3 TSS картируются в пределах 300–212 н. до старта экзона 4, с основным пиком в положении 244 н. (9613 н. положение в гене), что не противоречит результатам RACE-PCR (рис. 4).

For the next step, to confirm that in intron 3 there are alternative promoters that are utilized in the testes and that regulate the synthesis of the two transcript types discussed above, we verified the 5′ RACE-PCR results by RT-PCR. We used several primer sets with different forward primers and a common reverse primer (Fig. 6). The reverse primer is located in the adjacent exon, which enables us to verify the normal splicing of intron 4. The PCR product that starts in exon 4 (forward primer #3) could be found both in the heads and testes. The primer sets with the forward primers from intron 3 (##1, 2) only gave a PCR product with template cDNA from the testes. If primer #1 (upstream the 237- nt region, which is removed as an intron in the second-type transcripts) was used, only one PCR product was detected. Its size and sequence confirmed the excision of the 237 nt. When primer #2 (within the 237-nt region) was used, the PCR product corresponded to the firsttype transcripts in which the 237-nt region was retained.

На следующем этапе, чтобы подтвердить, что в интроне 3 есть альтернативные промоторы, которые используются в семенниках и которые регулируют синтез двух типов транскриптов, обсуждавшихся выше, мы проверили результаты 5'-RACE-PCR с помощью RT-PCR. Мы использовали несколько наборов праймеров с разными прямыми праймерами и общим обратным праймером (рис. 6). Обратный праймер расположен в соседнем экзоне, что позволяет нам убедиться в нормальном сплайсинге интрона 4. Продукт ПЦР, начинающийся в экзоне 4 (прямой праймер №3), можно обнаружить как в головах, так и в семенниках. Наборы праймеров с прямыми праймерами из интрона 3 (##1, 2) давали только продукт ПЦР с матричной кДНК из семенников. При использовании праймера № 1 (выше области 237 н., которая удалена как интрон в транскриптах второго типа) обнаруживался только один продукт ПЦР. Его размер и последовательность подтвердили вырезание 237 нуклеотидов. При использовании праймера № 2 (участок 237 н.) продукт ПЦР соответствовал транскриптам первого типа, в которых сохранялся участок 237 н.

It is important to note that the translation frame of the 5′-truncated transcripts was not shifted compared to the main protein, if the translation of the short testis-specific transcripts starts from the AUG codon in exon 4 (Fig. 4). As a result, the 5′-truncated testis-specific SBR protein should lack 136 N-terminal amino acids compared to the full-length protein, including the first 25 aa of the RNA-binding domain. Meanwhile, the beginning of the SBR protein includes nuclear localization signal (NLS) whose location is conservative in evolution (Zhang et al., 2011) (Fig. 2). As a result, the short testis-specific protein apparently cannot fulfill the universal function of nuclear mRNA export, demonstrating specialization features.

Важно отметить, что рамка трансляции 5'-укороченных транскриптов не смещена по сравнению с основным белком, если трансляция коротких специфичных для семенников транскриптов начинается с кодона AUG в экзоне 4 (рис. 4). В результате 5'-укороченный белок SBR, специфичный для семенников, должен отсутствовать на 136 N-концевых аминокислот по сравнению с полноразмерным белком, включая первые 25 а.о. РНК-связывающего домена. Между тем, начало белка SBR включает сигнал ядерной локализации (NLS), положение которого в эволюции консервативно (Zhang et al., 2011) (рис. 2). В результате короткий специфичный для семенников белок, по-видимому, не может выполнять универсальную функцию экспорта ядерной мРНК, демонстрируя черты специализации.

3′ RACE-PCR revealed that most of the testis-expressed sbr transcripts have truncated 3′UTRs. Such transcripts that varied in size contain only 44–124 nt out of 757 nt typical for the full-length canonical 3′UTR (Figs. 7, 8). Therefore, in the testes, even the fully spliced (normal) transcripts are shorter (2.8 kb) compared with those in other organs (3.5 kb), as we have shown previously (Ivankova et al., 2010). Truncation of 3′ end is common for different mRNAs species in the testes. It has been shown that testis-specific factors are responsible for 3′ end formation in mammals (Dass et al., 2007; Di Giammartino et al., 2011).

3'-RACE-PCR показала, что большинство транскриптов sbr, экспрессируемых семенниками, имеют укороченные 3'UTR. Такие транскрипты разного размера содержат только 44–124 н. из 757 н., характерных для полноразмерного канонического 3'UTR (рис. 7, 8). Поэтому в семенниках даже полностью сплайсированные (нормальные) транскрипты короче (2.8 т.п.н.) по сравнению с таковыми в других органах (3.5 т.п.н.), как было показано нами ранее (Иванкова и др., 2010). Укорочение 3'-конца характерно для разных видов мРНК в семенниках. Было показано, что факторы, специфичные для семенников, ответственны за формирование 3'-конца у млекопитающих (Dass et al., 2007; Di Giammartino et al., 2011).

**3.3. The testis-specific short form of the SBR protein in D. melanogaster**

Short testis-specific transcripts of the sbr gene, which start in intron 3, provide 5′-truncated mRNA templates for the synthesis of a short SBR protein that is truncated at the N-terminus. This protein should lack the part encoded by exons 1–3 of the full-length SBR protein (Fig. 2).

Короткие специфичные для семенников транскрипты гена sbr, которые начинаются в интроне 3, обеспечивают 5'-усеченные матрицы мРНК для синтеза короткого белка SBR, который укорочен на N-конце. В этом белке должна отсутствовать часть, кодируемая экзонами 1–3 полноразмерного белка SBR (рис. 2).

To detect this protein, we produced antibodies against the C-terminal fragment of the SBR protein (Fig. 2, underlined) and used them for Western blot analysis. The known major form of the SBR protein with a molecular mass of 74 kDa was found in all examined tissue samples from D. melanogaster (Fig. 9). Moreover, in addition to this canonical protein (74 kDa), a short 60-kDa form of SBR was found only in the testes of males with different genotypes. Its molecular mass perfectly corresponded to that of the putative protein encoded by short testis-specific transcripts. Moreover, in the heterozygous sbr12/Dp(1;Y) y+ v+ mutant males that have the sbr12 deletion and the sbr+ allele, the SBR protein (at least its short testis-specific form) was detected as expected in two forms: normal and truncated as a result of deletion (Fig. 9, line 4). Therefore, the anti-SBR antibody developed recognized all forms of the SBR protein, and the deletion of 10 aa in the region used as the antigen did not affect the antibody binding.

Для обнаружения этого белка мы получили антитела против С-концевого фрагмента белка SBR (рис. 2, подчеркнуто) и использовали их для вестерн-блоттинга. Известная мажорная форма белка SBR с молекулярной массой 74 кДа обнаружена во всех исследованных образцах тканей D. melanogaster (рис. 9). Причем кроме этого канонического белка (74 кДа) короткая форма SBR 60 кДа была обнаружена только в семенниках самцов с разными генотипами. Его молекулярная масса точно соответствовала массе предполагаемого белка, кодируемого короткими транскриптами, специфичными для семенников. Более того, у гетерозиготных sbr12/Dp(1;Y) y+ v+ мутантных самцов, имеющих делецию sbr12 и аллель sbr+, белок SBR (по крайней мере, его короткая тестикулярно-специфическая форма) был обнаружен, как и ожидалось, в двух формах: нормальной и усечен в результате делеции (рис. 9, строка 4). Таким образом, разработанное антитело против SBR распознавало все формы белка SBR, а делеция 10 а.о. в области, используемой в качестве антигена, не влияла на связывание антитела.

**4. Discussion**

**4.1. Alternative polyadenylation of sbr transcripts in the testes**

For mRNAs of ubiquitously expressed genes, alternative polyadenylation (APA) is more wide-spread than for tissue-specific genes (Lianoglou et al., 2013). In Drosophila, the sbr gene, whose main function is nonspecific mRNA export from the nucleus to the cytoplasm, apparently follows this rule. Multiple 3′UTR isoforms are a common characteristic of most house-keeping genes. Various 3′UTRs are capable of gene expression regulation at the post-transcriptional level (Lianoglou et al., 2013). There may be several alternative polyadenylation sites within the 3′UTR of an mRNA that may strongly influence its fate. Target sequences for miRNAs and other regulatory elements that interact with RNA-binding proteins are common in the 3′UTR (Jing et al., 2005; Bartel, 2009; Fabian et al., 2010; Miura et al., 2013; Hollerer et al., 2014). If such sequences are not retained in the mature mRNA as a result of APA, mRNA stability, cytoplasmic localization and/or translation efficiency may be strongly affected (Lewis et al., 1995; Edwalds-Gilbert et al., 1997; Zhao et al., 1999; Moore, 2005; Yan and Marr, 2005; Ji et al., 2011; Di Giammartino et al., 2011; Matoulkova et al., 2012; Hafez et al., 2013; Lianoglou et al., 2013; Tian and Manley, 2013).

Для мРНК повсеместно экспрессируемых генов альтернативное полиаденилирование (АРА) более распространено, чем для тканеспецифичных генов (Lianoglou et al., 2013). У дрозофилы этому правилу, по-видимому, следует ген sbr, основной функцией которого является неспецифический экспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Множественные изоформы 3'UTR являются общей характеристикой большинства генов домашнего хозяйства. Различные 3'UTR способны регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне (Lianoglou et al., 2013). Может быть несколько альтернативных сайтов полиаденилирования в пределах 3'UTR мРНК, которые могут сильно влиять на ее судьбу. Последовательности-мишени для микроРНК и других регуляторных элементов, которые взаимодействуют с РНК-связывающими белками, часто встречаются в 3'UTR (Jing et al., 2005; Bartel, 2009; Fabian et al., 2010; Miura et al., 2013; Hollerer et al. др., 2014). Если такие последовательности не сохраняются в зрелой мРНК в результате АРА, это может сильно повлиять на стабильность мРНК, цитоплазматическую локализацию и/или эффективность трансляции (Lewis et al., 1995; Edwalds-Gilbert et al., 1997; Zhao et al. ., 1999; Moore, 2005; Yan and Marr, 2005; Ji et al., 2011; Di Giammartino et al., 2011; Matoulkova et al., 2012; Hafez et al., 2013; Lianoglou et al., 2013; Тиан и Мэнли, 2013 г.).

In the 3′UTR of sbr mRNA, there are numerous major and minor hexanucleotide PASs (polyadenylation sites) that represent potential polyadenylation sites as well as USE (upstream sequence element) motifs before them. Fig. 8 depicts the possible post-transcriptional regulation of this gene via alternative polyadenylation that corresponds to 3′ RACE results (Fig. 7) and shows specific poly(A) sites that may be used in the testes, heads and ovaries. Our experimental data demonstrates truncations in the 3′ end transcripts of sbr in the testes comparing with the transcripts from the heads and ovaries. Sequence motifs potentially important for APA, such as poly(U)-tract, USE, PAS, and DSE (downstream sequence element) motifs, are found in certain places in the 3′UTR of the sbr mRNA (Fig. 8).

В 3'UTR мРНК sbr имеется множество основных и второстепенных гексануклеотидных PAS (сайтов полиаденилирования), которые представляют собой потенциальные сайты полиаденилирования, а также мотивы USE (элемент восходящей последовательности) перед ними. На рис. 8 показана возможная посттранскрипционная регуляция этого гена посредством альтернативного полиаденилирования, которая соответствует результатам 3'-RACE (рис. 7) и показаны специфические поли(А)-сайты, которые могут использоваться в семенниках, головах и яичниках. Наши экспериментальные данные демонстрируют укорочения 3'-концевых транскриптов sbr в семенниках по сравнению с транскриптами из головок и яичников. Потенциально важные для АРА мотивы последовательности, такие как поли(U)-тракт, мотивы USE, PAS и DSE (downstream sequence element), обнаруживаются в определенных местах 3'UTR мРНК sbr (рис. 8).

It is noteworthy that sbr transcripts detected in the testes, both full-length and shorter transcripts, had truncated 3′ termini. At the same time, polyadenylation, which is typical for testes RNA, was not found in the canonical full-size sbr transcripts isolated from the heads or ovaries of the flies (Fig. 7). In the case of sbr gene expression, tissue specificity is not limited by the formation of an alternative 3′UTR. Another cause of sbr transcript variability is alternative transcription start sites. Alternative promoters are a source of short testis-specific transcripts corresponding to short testis-specific SBR proteins.

Примечательно, что обнаруженные в семенниках транскрипты sbr, как полноразмерные, так и более короткие транскрипты, имели укороченный 3'-конец. В то же время в канонических полноразмерных sbr-транскриптах, выделенных из головы или яичников мух, полиаденилирование, характерное для РНК семенников, не обнаружено (рис. 7). В случае экспрессии гена sbr тканевая специфичность не ограничивается образованием альтернативной 3'UTR. Другой причиной изменчивости транскриптов sbr являются альтернативные сайты начала транскрипции. Альтернативные промоторы являются источником коротких специфичных для семенников транскриптов, соответствующих коротким белкам SBR, специфичным для семенников.

**4.2. Short transcripts starting within intron 3 give rise to the testis-specific SBR protein**

Testis-specific promoters in intron 3 of the sbr gene do not have one fixed transcription start site (TSS) (Figs. 4, 5). Such promoters are designated as “broad”, “weak” or “wide” (Atkinson and Halfon, 2014). They are common both in mammals (Carninci et al., 2006; Juven-Gershon et al., 2008; Juven-Gershon and Kadonaga, 2010) and in Drosophila (Rach et al., 2009; Hoskins et al., 2011).

Специфичные для семенников промоторы в интроне 3 гена sbr не имеют одного фиксированного сайта начала транскрипции (TSS) (рис. 4, 5). Такие промоторы обозначаются как «широкие», «слабые» или «широкие» (Atkinson, Halfon, 2014). Они распространены как у млекопитающих (Carninci et al., 2006; Juven-Gershon et al., 2008; Juven-Gershon, Kadonaga, 2010), так и у дрозофилы (Rach et al., 2009; Hoskins et al., 2011).

In mammalian genomes, there are different types of promoters: TATA and CpG-rich (Carninci et al., 2006). In the Drosophila genome, there are promoters containing the TATA-box — TATAWAAR (~30% of promoters), as well as the Initiator (Inr) element TCAKTY (~65% of promoters, functioning either together with the TATA-box or independently) and Downstream Promoter Elements (DPEs) RGWYV and others (Ohler et al., 2002; Gershenzon et al., 2006). The majority of these elements are present in region containing intron 3 of the sbr gene (Fig. 4). Further studies are needed to answer questions regarding the specific significance of these elements for transcription efficiency in the testes.

В геномах млекопитающих присутствуют разные типы промоторов: ТАТА и CpG-богатые (Carninci et al., 2006). В геноме дрозофилы присутствуют промоторы, содержащие ТАТА-бокс — TATAWAAR (~30% промоторов), а также инициаторный (Inr) элемент TCAKTY (~65% промоторов, функционирующих как вместе с ТАТА-боксом, так и независимо от них). ) и последующие промоутерные элементы (DPE) RGWYV и др. (Ohler et al., 2002; Gershenzon et al., 2006). Большинство этих элементов присутствует в области, содержащей интрон 3 гена sbr (рис. 4). Необходимы дальнейшие исследования, чтобы ответить на вопросы, касающиеся специфического значения этих элементов для эффективности транскрипции в семенниках.

Both the 3′UTR and 5′UTR are important for the fate of a transcript. Either an upstream ORF (uORF) (Medenbach et al., 2011) or an intron (Bicknell et al., 2012) in the 5′UTR are the factors that control translation efficiency in mammals. Exclusion or retention of the 237-bp intron may, therefore, regulate the translation of testis-specific transcripts.

И 3'UTR, и 5'UTR важны для судьбы транскрипта. Либо восходящая ORF (uORF) (Medenbach et al., 2011), либо интрон (Bicknell et al., 2012) в 5'UTR являются факторами, которые контролируют эффективность трансляции у млекопитающих. Таким образом, исключение или сохранение интрона длиной 237 п.н. может регулировать трансляцию специфичных для семенников транскриптов.

The existence of several TSSs does not change the protein-coding portion of the shortened sbr transcripts. All of the described sbr transcripts are in principle capable of encoding the same protein — the testis-specific shortened SBR isoform, designated “SBR-t”. In comparison with full-size SBR protein, SBR-t lacks the N-terminal portion with a nuclear localization signal (NLS) (Fig. 2). The absence of the NLS may restrict transport of the SBR-t into the nucleus. SBR-t also lacks a portion of the RNA-binding domain. As a result, the shorter, testisspecific SBR-t protein cannot fulfill the main canonical function of the full-size SBR protein and, thus, may possess certain other functions outside the nucleus, in the cytoplasm. Cytoplasmic localization is a characteristic of the mammalian NXF family proteins, expressed in the testes (Herold et al., 2000; Sasaki et al., 2005; Tan et al., 2005). We also showed the localization of SBR protein in the cytoplasm in some stages of spermatogenesis (Atsapkina et al., 2010; Golubkova et al., 2015). Unfortunately, the antibody described in this paper does not allow distinguishing SBR and SBR-t proteins.

Существование нескольких TSS не изменяет кодирующую белок часть укороченных транскриптов sbr. Все описанные транскрипты sbr, в принципе, способны кодировать один и тот же белок — специфичную для семенников укороченную изоформу SBR, обозначенную как «SBR-t». По сравнению с полноразмерным белком SBR, у SBR-t отсутствует N-концевая часть с сигналом ядерной локализации (NLS) (рис. 2). Отсутствие NLS может ограничивать транспорт SBR-t в ядро. В SBR-t также отсутствует часть РНК-связывающего домена. В результате более короткий тестисспецифический белок SBR-t не может выполнять основную каноническую функцию полноразмерного белка SBR и, таким образом, может обладать некоторыми другими функциями вне ядра, в цитоплазме. Цитоплазматическая локализация является характеристикой белков семейства NXF млекопитающих, экспрессируемых в семенниках (Herold et al., 2000; Sasaki et al., 2005; Tan et al., 2005). Мы также показали локализацию белка SBR в цитоплазме на некоторых стадиях сперматогенеза (Ацапкина и др., 2010; Голубкова и др., 2015). К сожалению, антитело, описанное в этой статье, не позволяет различать белки SBR и SBR-t.

**4.3. Sterile sbr12-heterozygous males of D. melanogaster do not form motile sperm**

NXF proteins function as large macromolecule complexes based on their structure. Thus, the LRR domain is responsible for protein–protein interactions (Liker et al., 2000), and the NTF2-like domain determines binding with its permanent partner protein p15, often termed “NXT1” (Bachi et al., 2000). The deletion present in the sbr12 allele affects the NTF2-like domain (Fig. 2) and causes disturbances in spermatogenesis. Heterozygous sbr12 males are sterile and do not have motile spermatozoa in the testes (Golubkova et al., 2015). These defects are allelespecific and dominant; even normal expression of the SBR protein (one dose) in the same cell with the mutant protein does not result in the formation of functional sperm. Thus, a question arises as to why the NTF2-like domain is so important for the completion of spermatogenesis. To begin with, it was noted that if there is a defect in NXT1 (the permanent partner of NXF1), many different testis-specific mRNAs no longer accumulate (Caporilli et al., 2013). Then, it was recently found that the surface of the NTF2-like domain is also important for interaction of the export receptor with mRNA (Katahira et al., 2015). Therefore, sbr12 deletion may affect NXF1-NXT1 dimer formation and structure, changing its affinity to specific target mRNAs.

Белки NXF функционируют как большие комплексы макромолекул в зависимости от их структуры. Таким образом, домен LRR отвечает за белок-белковые взаимодействия (Liker et al., 2000), а NTF2-подобный домен определяет связывание со своим постоянным партнерским белком p15, часто называемым «NXT1» (Bachi et al., 2000). Делеция, присутствующая в аллеле sbr12, затрагивает NTF2-подобный домен (рис. 2) и вызывает нарушения сперматогенеза. Гетерозиготные самцы sbr12 стерильны и не имеют подвижных сперматозоидов в семенниках (Голубкова и др., 2015). Эти дефекты аллельспецифичны и доминантны; даже нормальная экспрессия белка SBR (одна доза) в одной клетке с мутантным белком не приводит к образованию функциональных сперматозоидов. Таким образом, возникает вопрос, почему NTF2-подобный домен так важен для завершения сперматогенеза. Начнем с того, что было отмечено, что если есть дефект в NXT1 (постоянный партнер NXF1), многие различные специфичные для семенников мРНК больше не накапливаются (Caporilli et al., 2013). Затем недавно было обнаружено, что поверхность NTF2-подобного домена также важна для взаимодействия экспортного рецептора с мРНК (Katahira et al., 2015). Следовательно, делеция sbr12 может влиять на образование и структуру димера NXF1-NXT1, изменяя его аффинность к специфическим мРНК-мишеням.

Furthermore, the NTF2-like and UBA-like domains of the NXF1 proteins are responsible for interactions with nuclear pore complexes (NPCs) (Braun et al., 2001). Previously, using antibodies specific to the C-terminal fragment of the SBR protein, we showed that SBR is localized on the convex side of the crescent-shaped sperm nucleus during the individualization of spermatids (Atsapkina et al., 2010). NPCs focus on the same side of the nuclear envelope during the individualization of spermatids (Fuller, 1993; Fabian and Brill, 2012). The nuclear envelope is the most convenient compartment for the localization of temporally untranslated mRNAs whose products are necessary for spermiogenesis.

Более того, NTF2-подобный и UBA-подобный домены белков NXF1 ответственны за взаимодействия с комплексами ядерных пор (NPCs) (Braun et al., 2001). Ранее с помощью антител, специфичных к С-концевому фрагменту белка SBR, мы показали, что SBR локализуется на выпуклой стороне серповидного ядра спермия при индивидуализации сперматид (Ацапкина и др., 2010). NPC фокусируются на той же стороне ядерной оболочки во время индивидуализации сперматид (Fuller, 1993; Fabian and Brill, 2012). Ядерная оболочка является наиболее удобным компартментом для локализации временно нетранслируемых мРНК, продукты которых необходимы для спермиогенеза.

Thus, we can hypothesize that specialized testis-specific function of the sbr gene is important for the mRNA biogenesis that is necessary for the formation of motile spermatozoa. Further investigation is needed to dissect the molecular functions of this testis-specific protein and address questions concerning its mRNA targets.

Таким образом, можно предположить, что специализированная, специфичная для семенников функция гена sbr важна для биогенеза мРНК, необходимой для образования подвижных сперматозоидов. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы проанализировать молекулярные функции этого белка, специфичного для семенников, и ответить на вопросы, касающиеся его мРНК-мишеней.

**5. Conclusions**

Apart from its universal function, i.e., mRNA export from the nucleus to cytoplasm, the sbr (Dm nxf1) gene in D. melanogaster has testisspecific functions. Thus, we demonstrated that there are testis-specific alternative transcripts of this gene and a shortened SBR protein (60 kDa) that is found only in the testes. The described testis-specific transcripts result from alternative splicing and differ in their transcription start sites. We sequenced the sbr12 allele of the Dm nxf1 gene and found a 30-nt deletion in this allele that does not shift the ORF. Given that the sbr12 allele exhibits dominant male sterility, it was concluded that this deletion, which results in the absence of 10 aa, is responsible for this phenotype. It was also shown that the first 6 aa of the deletion belong to the NTF2-like domain, which likely leads to the functional disability of mutant proteins to provide sperm motility.

Ген sbr (Dm nxf1) у D. melanogaster помимо своей универсальной функции, т. е. экспорта мРНК из ядра в цитоплазму, выполняет семенно-специфические функции. Таким образом, мы показали, что существуют специфичные для семенников альтернативные транскрипты этого гена и укороченный белок SBR (60 кДа), обнаруженный только в семенниках. Описанные специфичные для семенников транскрипты возникают в результате альтернативного сплайсинга и различаются сайтами начала транскрипции. Мы секвенировали аллель sbr12 гена Dm nxf1 и обнаружили в этой аллели 30-нуклеотидную делецию, которая не сдвигает ORF. Учитывая, что аллель sbr12 проявляет доминантную мужскую стерильность, был сделан вывод, что эта делеция, приводящая к отсутствию 10 а.о., ответственна за данный фенотип. Также было показано, что первые 6 а.о. делеции принадлежат NTF2-подобному домену, что, вероятно, приводит к функциональной неспособности мутантных белков обеспечивать подвижность сперматозоидов.