**The RNA-Binding Protein SBR (Dm NXF1) Is Required for the Constitution of Medulla Boundaries in Drosophila melanogaster Optic Lobes**

**Abstract**

Drosophila melanogaster sbr (small bristles) is an orthologue of the Nxf1 (nuclear export factor 1) genes in different Opisthokonta. The known function of Nxf1 genes is the export of various mRNAs from the nucleus to the cytoplasm. The cytoplasmic localization of the SBR protein indicates that the nuclear export function is not the only function of this gene in Drosophila. RNA-binding protein SBR enriches the nucleus and cytoplasm of specific neurons and glial cells. In sbr12 mutant males, the disturbance of medulla boundaries correlates with the defects of photoreceptor axons pathfinding, axon bundle individualization, and developmental neurodegeneration. RNA-binding protein SBR participates in processes allowing axons to reach and identify their targets.

Drosophila melanogaster sbr (small bristles) является ортологом генов Nxf1 (nuclear export factor 1) у различных Opisthokonta. Известной функцией генов Nxf1 является экспорт различных мРНК из ядра в цитоплазму. Цитоплазматическая локализация белка SBR указывает на то, что экспортная функция ядра не является единственной функцией этого гена у дрозофилы. РНК-связывающий белок SBR обогащает ядра и цитоплазму специфических нейронов и глиальных клеток. У самцов с мутацией sbr12 нарушение границ мозгового вещества коррелирует с дефектами поиска пути аксонами фоторецепторов, индивидуализацией пучков аксонов и нейродегенерацией развития. РНК-связывающий белок SBR участвует в процессах, позволяющих аксонам достигать и идентифицировать свои цели.

**1. Introduction**

Drosophila melanogaster sbr (small bristles) is an orthologue of the Nxf1 (nuclear export factor 1) genes in different organisms, including human [1–3]. The best known function of the Nxf1 genes is the transport of various mRNAs from the nucleus to the cytoplasm [1]. NXF1 is localized in the nucleus or the nuclear envelope according to its function [4]. As we have shown previously, D. melanogaster SBR (Dm NXF1) is located not only in the nucleus but also in the cytoplasm of different cells [5–7]. This finding suggests that the SBR protein has specific cytoplasmic functions in addition to its participation in nuclear export of mRNAs. In the Drosophila larval brain, SBR forms granules in the neuron bodies and neurites [7]. Some granules contain two RNA-binding proteins, SBR and dFMR1 (drosophila Fragile Mental Retardation 1), which are known components of RNP-granules. Others are marked by either FMR1 or SBR. These observations suggest that SBR has specific localized RNA targets in the cytoplasm [8]. Regulated translation of localized mRNAs is a widespread and essential process during neurogenesis [9].

Drosophila melanogaster sbr (small bristles) является ортологом генов Nxf1 (nuclear export factor 1) у разных организмов, в том числе у человека [1–3]. Наиболее известной функцией генов Nxf1 является транспорт различных мРНК из ядра в цитоплазму [1]. NXF1 локализуется в ядре или ядерной оболочке в зависимости от его функции [4]. Как было показано нами ранее, SBR D. melanogaster (Dm NXF1) локализуется не только в ядре, но и в цитоплазме различных клеток [5–7]. Это открытие предполагает, что белок SBR выполняет специфические цитоплазматические функции в дополнение к его участию в ядерном экспорте мРНК. В мозге личинок дрозофилы SBR образует гранулы в телах нейронов и нейритах [7]. Некоторые гранулы содержат два РНК-связывающих белка, SBR и dFMR1 (drosophila Fragile Mental Retardation 1), которые являются известными компонентами RNP-гранул. Другие отмечены либо FMR1, либо SBR. Эти наблюдения предполагают, что SBR имеет специфические локализованные РНК-мишени в цитоплазме [8]. Регулируемая трансляция локализованных мРНК является широко распространенным и важным процессом в ходе нейрогенеза [9].

Neurogenesis in Drosophila is a highly organized process that requires strict regulation of the compartments individualization and the establishment of the correct connections between neurons. Intercellular communications are an important mediator of axon guidance, proper axon bundle track, and neuron survival [10–12]. Together with RNA binding proteins, localized RNAs in complex create a system of rapid and long-term production of signal or receptor molecules near cellular membranes of glial cells, neurons and their neurites. This determines intercellular communications and allows for the appropriate boundaries to be established between the compartments in the brain. The optic lobes of the fly brain are a model of neuropil compartmentalization, playing a crucial role in the development of the nervous system. Each of the optic lobes is divided into four brain compartments (neuropils): lamina, medulla, lobula, and lobula plate [13]. The compound eyes of D. melanogaster consist of single units called ommatidia. Each ommatidium contains eight photoreceptor neurons (R1–R8) that project into the optic lobe of the brain following the neural superposition rule [14,15]. This rule ensures that the axons from the retina cells obtain information from the same point in space projected onto the same cartridge of the lamina or column of the medulla. The axons of the photoreceptor neurons R1–R6 form the lamina plexus in a retinotopic manner, subdividing the lamina neuropil into synaptic cartridges. Each cartridge contains terminals of the R1–R6 photoreceptor neurons located in the neighboring ommatidia and detect the same visual point of space [16]. The axons of the R7–R8 photoreceptor neurons cross the lamina and terminate in the medulla (Figure 1) [17,18].

Нейрогенез у дрозофилы — высокоорганизованный процесс, требующий строгой регуляции индивидуализации компартментов и установления правильных связей между нейронами. Межклеточные связи являются важным медиатором направления аксонов, правильного пути пучков аксонов и выживания нейронов [10-12]. Вместе с РНК-связывающими белками локализованные РНК в комплексе создают систему быстрой и долговременной продукции сигнальных или рецепторных молекул вблизи клеточных мембран глиальных клеток, нейронов и их нейритов. Это определяет межклеточные связи и позволяет установить соответствующие границы между отделами мозга. Оптические доли мозга мух представляют собой модель компартментализации нейропиля, играющую решающую роль в развитии нервной системы. Каждая из зрительных долей делится на четыре отдела мозга (нейропили): пластинка, продолговатый мозг, долька и пластинка дольки [13]. Сложные глаза D. melanogaster состоят из отдельных единиц, называемых омматидиями. Каждый омматидий содержит восемь фоторецепторных нейронов (R1–R8), которые проецируются в зрительную долю мозга в соответствии с правилом нейронной суперпозиции [14,15]. Это правило гарантирует, что аксоны клеток сетчатки получают информацию из одной и той же точки пространства, спроецированной на один и тот же картридж пластинки или колонку продолговатого мозга. Аксоны фоторецепторных нейронов R1-R6 образуют пластинчатое сплетение ретинотопическим образом, подразделяя нейропиль пластинки на синаптические кассеты. Каждая кассета содержит терминали фоторецепторных нейронов R1–R6, расположенных в соседних омматидиях и обнаруживающих одну и ту же зрительную точку пространства [16]. Аксоны фоторецепторных нейронов R7–R8 пересекают пластинку и заканчиваются в мозговом веществе (рис. 1) [17,18].

Morphological defects in the optic lobes and ellipsoid body are the dominant features of sbr12 mutant males, characterized by low activity in the negative geotaxis test [19]. We discuss the role of the sbr (Dm nxf1) gene in establishing medulla compartment boundaries in Drosophila melanogaster optic lobes. The defects of the photoreceptor axon pathfinding, axon bundle individualization, and developmental neurodegeneration are essential for the formation of medulla boundaries in sbr12 mutant males. Non-random cytoplasmic localization of RNA-binding protein SBR suggests it plays a role in the processes allowing axons to reach and identify their targets.

Морфологические дефекты зрительных долей и эллипсоидного тела являются доминирующими признаками мутантных самцов sbr12, характеризующихся низкой активностью в тесте отрицательного геотаксиса [19]. Мы обсуждаем роль гена sbr (Dm nxf1) в установлении границ компартментов мозгового вещества в зрительных долях Drosophila melanogaster. Дефекты фоторецепторного поиска пути аксонов, индивидуализации пучков аксонов и нейродегенерации развития существенны для формирования границ мозгового вещества у самцов с мутацией sbr12. Неслучайная цитоплазматическая локализация РНК-связывающего белка SBR предполагает, что он играет роль в процессах, позволяющих аксонам достигать и идентифицировать свои цели.

**3. Results**

**3.1. Medulla Malformations in sbr12/Dp(1;Y)y+v+ Males**

The medulla neuropil is a highly ordered structure consisting of multiple synaptic layers. Projections of the R7–R8 photoreceptors terminate in different medullar layers (M3 and M6, respectively) and form strictly ordered synaptic connections with projections of the lamina and medulla neurons. Medulla columns are oriented perpendicular to the ten synaptic medulla layers [25].

Нейропиль продолговатого мозга представляет собой высокоупорядоченную структуру, состоящую из нескольких синаптических слоев. Отростки фоторецепторов R7–R8 оканчиваются в разных слоях мозгового вещества (соответственно М3 и М6) и образуют строго упорядоченные синаптические связи с проекциями нейронов пластинки и мозгового вещества. Столбцы мозгового вещества ориентированы перпендикулярно десяти синаптическим слоям мозгового вещества [25].

In Oregon-R, sbr+/Dp(1;Y)y+v+ and L4/Dp(1;Y)y+v+ adult males, the medulla has clear smooth boundaries (Figure 2a,b,d). Only in sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males, the medulla appears to have lost its integrity (Figure 2c). External boundary of the medulla in sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males looks like separate protrusions and hollows in all cases with variation of malformation degree. It is a dominant negative effect of the SBR12 protein rather than a consequence of the decrease in the content of the SBR protein, since similar disorders are absent in males L4/Dp(1;Y)y+v+ with the sbr gene deletion (L4—Df(1)v-L4, ras2 mD) (Figure 2d).

У взрослых самцов Oregon-R, sbr+/Dp(1;Y)y+v+ и L4/Dp(1;Y)y+v+ мозговой слой имеет четкие гладкие границы (рис. 2а, б, г). Только у самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ мозговое вещество утратило свою целостность (рис. 2с). Наружная граница мозгового вещества у самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ имеет вид отдельных выпячиваний и впадин во всех случаях с различной степенью порока развития. Это доминантно-негативное действие белка SBR12, а не следствие снижения содержания белка SBR, поскольку подобные нарушения отсутствуют у самцов L4/Dp(1;Y)y+v+ с делецией гена sbr (L4 — Df(1)v-L4, ras2 mD) (рис. 2г).

The structure of the medulla columns was visualized by autofluorescence of adult Drosophila brain on the paraffin sections (Figure 3a,b). In wild type Oregon-R males, organization of the medulla columns is ordered (Figure 3a’). A striking feature of sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males is that the medulla columns are disorganized and non-structured (Figure 3b’).

Структуру столбцов мозгового вещества визуализировали с помощью аутофлуоресценции мозга взрослых дрозофил на парафиновых срезах (рис. 3а, б). У самцов Oregon-R дикого типа организация столбцов мозгового вещества упорядочена (рис. 3а’). Поразительной особенностью самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ является то, что столбцы мозгового вещества дезорганизованы и неструктурированы (рис. 3b’).

The pattern of the structural disorganization of the medulla suggests that this disorga- nization could be caused by pathfinding defects in the photoreceptor axons. If that indeed were the case, then the axons of the photoreceptor neurons would not reach their targets and would not establish the correct connectome. To test this hypothesis, we investigated the locations of the photoreceptor terminals in the medulla of the whole adult Drosophila brain via confocal microscopy with the use of the antibody (Figure 4) and analysis of autofluorescence (Figure S1). The anti-chaoptin immunolabeling allows to visualize the terminal locations of the photoreceptors. The detection of the chaoptin demonstrated that the photoreceptor terminals were arranged in order, forming rows in the distal part of the medulla in the wild type (Figure 4a',a"), sbr+/Dp(1;Y)y\*v+ (Figure 4b',b"), and L4/Dp(1;Y)ytv+ males (Figure 4d',d"). In sbr12/Dp(1;Y)ytv+ males, the photoreceptor terminals were located chaotically and did not form ordered rows (Figure 4c',c").

Паттерн структурной дезорганизации продолговатого мозга предполагает, что эта дезорганизация может быть вызвана дефектами поиска пути в аксонах фоторецепторов. Если бы это действительно было так, то аксоны нейронов фоторецепторов не достигли бы своих целей и не установили бы правильный коннектом. Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали расположение терминалов фоторецепторов в мозговом веществе всего мозга взрослой дрозофилы с помощью конфокальной микроскопии с использованием антитела (рис. 4) и анализа аутофлуоресценции (рис. S1). Иммуномаркировка против хаоптина позволяет визуализировать терминальные местоположения фоторецепторов. Обнаружение хаоптина показало, что терминали фоторецепторов расположены по порядку, образуя ряды в дистальной части мозгового вещества у дикого типа (рис. 4а', а"), sbr+/Dp(1;Y)y\*v+ (рис. 4б',б"), а самцов L4/Dp(1;Y)ytv+ (рис. 4г',г"). У самцов sbr12/Dp(1;Y)ytv+ терминали фоторецепторов располагались хаотично и не образовывали упорядоченного ряды (рис. 4в',в").

The R7 and R8 neurons are the pioneer neurons during the organization of the medullary layers. The axons of these photoreceptors grow first to the medulla and then serve as a navigational guide for the axons of other neurons, which participate in the formation of the individual columns [26]. Therefore, the breach of the boundary between the lamina and the medulla in sbr12 /Dp(1;Y)y\*v\* males suggests that the process of coordinated ter- mination of photoreceptor neurons is defective (Figure 4c,c"). These types of disruptions may indicate both problems with pathfinding of the axons of photoreceptor neurons to their targets, and with the specification of photoreceptor neurons. To shed light on the reasons for the observed defects, we investigated the formation of the photoreceptor axons at earlier developmental stages.

Нейроны R7 и R8 являются пионерными нейронами при организации мозговых слоев. Аксоны этих фоторецепторов сначала прирастают к мозговому веществу, а затем служат навигационным ориентиром для аксонов других нейронов, участвующих в формировании отдельных столбцов [26]. Таким образом, нарушение границы между пластинкой и мозговым веществом у самцов sbr12/Dp(1;Y)y\*v\* свидетельствует о нарушении процесса согласованной терминации фоторецепторных нейронов (рис. 4в,в"). типы нарушений могут свидетельствовать как о проблемах с поиском путей аксонов фоторецепторных нейронов к их мишеням, так и со спецификацией фоторецепторных нейронов.Чтобы пролить свет на причины наблюдаемых дефектов, мы исследовали формирование аксонов фоторецепторов на более ранних стадиях развития .

**3.2. Defects in Fasciculation of Photoreceptor Axons in Eye-Antennal Imaginal Discs of sbr12/Dp(1;Y)y+v+ Male Larvae**

Antibodies to the plant glycoprotein horseradish peroxidase (HRP) recognize the fly neuronal membrane [22] and allow for the identification of photoreceptors with their neurites. In the eye part of the eye-antennal imaginal discs (EAIDs) of the Drosophila third instar larvae, the projections of photoreceptors belonging to different ommatidia interact with each other via cell adhesion proteins. They form axonal tracts that then further consolidate into the optic nerves that connect each EAID to the respective optic lobe of the developing brain.

Антитела к растительной гликопротеинпероксидазе хрена (HRP) распознают мембрану нейронов мух [22] и позволяют идентифицировать фоторецепторы с их нейритами. В глазной части глазоантеннальных имагинальных дисков (EAID) личинок третьего возраста дрозофилы проекции фоторецепторов, принадлежащих разным омматидиям, взаимодействуют друг с другом через белки клеточной адгезии. Они образуют аксональные тракты, которые затем объединяются в зрительные нервы, соединяющие каждый EAID с соответствующей зрительной долей развивающегося мозга.

Only sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males have a defective fasciculation (bundling) of the axons of the photoreceptor neurons in the EAIDs (Figure 5C). The axon bundles were located chaotically (Figure 5C,F) and not in parallel rows as observed in males of control genotypes (Figure 5A,B,D,E).

Только самцы sbr12/Dp(1;Y)y+v+ имеют дефектную фасцикуляцию (связку) аксонов фоторецепторных нейронов в EAID (рис. 5С). Пучки аксонов располагались хаотично (рис. 5C, F), а не параллельными рядами, как это наблюдалось у самцов контрольных генотипов (рис. 5A, B, D, E).

This is consistent with disorganized structure of the medullar columns in sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males (Figure 3b0). The defects in the structure of the photoreceptor axons observed in the EAIDs of sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males suggested that the sbr12 allele affects axon bundle organization. The axons of the photoreceptor neurons form the optic nerve passing from the EAIDs to the brain. The most impressive phenotype of the sbr12 allele is the disturbance of medulla boundary and column architecture in the adult Drosophila brain (Figures 2c and 3b'). These data suggest that the sbr12 allele affects multiple processes, including axon growth, arborization, establishment of new cell-cell interactions, and the formation of the strictly ordered zone of the R axons.

Это согласуется с дезорганизованной структурой мозговых столбов у самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ (рис. 3b0). Дефекты в структуре аксонов фоторецепторов, наблюдаемые в EAID самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+, позволяют предположить, что аллель sbr12 влияет на организацию пучков аксонов. Аксоны фоторецепторных нейронов образуют зрительный нерв, идущий от EAIDs к мозгу. Наиболее впечатляющим фенотипом аллеля sbr12 является нарушение границ продолговатого мозга и архитектуры столбцов в мозге взрослых дрозофил (рис. 2c и 3b'). Эти данные свидетельствуют о том, что аллель sbr12 влияет на множество процессов, включая рост аксонов, разветвление, установление новых межклеточных взаимодействий и формирование строго упорядоченной зоны R-аксонов.

**3.3. Features of Neurodegeneration in the Medulla of sbr12/Dp(1;Y)y+v+ Third Instar Male Larvae**

Staining with antibodies against HPR allows for the visualization of neuropils in the D. melanogaster larval brain. An analysis of the medulla structure in the developing optic lobes revealed that only sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males have features of neurodegeneration, including round black spots without any visual markers (Figure 6c0). Moreover, sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males have a defective medulla shape and localization pattern of the neuron bodies in this zone of the brain. The medulla neuropil normally looks like a sickle during the third instar larvae. This zone was easily visualized with antibodies against HRP (Figure 6a0–d0), and the cell nuclei were distributed on the periphery of the medulla neuropil (Figure 6a–d). In sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males, the medulla had a rough edge and a disordered structure. This abnormal medulla structure suggests that neuropil morphogenesis is defective in sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males (Figure 6c,c0). Males of control genotypes did not show signs of neurodegeneration in the medulla or defects in neuropil structure (Figure 6a0,b0,d0).

Окрашивание антителами против HPR позволяет визуализировать нейропили в мозге личинок D. melanogaster. Анализ структуры мозгового вещества развивающихся оптических долей показал, что только самцы sbr12/Dp(1;Y)y+v+ имеют признаки нейродегенерации, включая круглые черные пятна без каких-либо визуальных маркеров (рис. 6в0). Кроме того, самцы sbr12/Dp(1;Y)y+v+ имеют дефектную форму продолговатого мозга и характер локализации тел нейронов в этой зоне мозга. Нейропиль мозгового вещества обычно выглядит как серп во время личинок третьего возраста. Эта зона легко визуализировалась с помощью антител против HRP (рис. 6а0–d0), а ядра клеток были распределены по периферии нейропиля мозгового вещества (рис. 6а–d). У самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ мозговое вещество имело неровный край и неупорядоченное строение. Эта аномальная структура мозгового вещества предполагает, что морфогенез нейропиля дефектен у самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ (Fig. 6c,c0). У самцов контрольных генотипов не было обнаружено признаков нейродегенерации в мозговом веществе или дефектов в структуре нейропиля (рис. 6а0,b0,d0).

Neurodegeneration in a developing medulla of the sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males supports our assumption that the disruption of the structure of synaptic columns and cartridges in the medulla and lamina could be caused by defects in photoreceptor axons targeting, because mistargeted neurons and their axons are eliminate during brain development [27].

Нейродегенерация в развивающемся мозговом веществе самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ подтверждает наше предположение о том, что нарушение структуры синаптических столбцов и кассет в мозговом веществе и пластинке может быть вызвано дефектами нацеливания аксонов фоторецепторов, т.к. нейроны и их аксоны элиминируются в процессе развития мозга [27].

**3.4. Localization of SBR Protein in Different Brain Cells**

Distribution of SBR in the brain as a whole and in specific cells can help understand this gene’s functions by studying the results of the immunofluorescence analysis. Antibodies to the N-terminal end (2–112 aa) of SBR [23] are used to detect the distribution of SBR in different cells. SBR enriches the nuclei and the cytoplasm of some cells: the glia and the axons of photoreceptor neurons in the optic stalk (Figure 7a,a0,a00,c), and some of the stem cells, which are the largest cells in the brain, and their progenies (Figure 7b,b0,b00). SBR is localized both in the nuclei and the cytoplasm of these cells.

Распределение SBR в мозге в целом и в конкретных клетках может помочь понять функции этого гена, изучая результаты иммунофлуоресцентного анализа. Антитела к N-концу (2–112 а.о.) SBR [23] используют для выявления распределения SBR в разных клетках. SBR обогащает ядра и цитоплазму некоторых клеток: глии и аксонов фоторецепторных нейронов зрительного стебля (рис. 7а, а0, а00, в), а также некоторых стволовых клеток, которые являются самыми крупными клетками головного мозга. и их потомства (рис. 7b,b0,b00). SBR локализуется как в ядрах, так и в цитоплазме этих клеток.

Without special markers to glial cells it is not possible to detect cell specificity only by the morphological criteria alone. SBR enriches the cytoplasm and some nuclei of the glial cells ensheathing the optic stalk (Figure 7a’,a”,c). Glial functions are required for the proper development and survival of neurons, and a defective glia becomes the reason for multiple developmental abnormalities, including neuronal degeneration [12]. The glia plays an important role in establishing the boundaries between visual centers of the brain [28]. This could be an argument in favor of the participation of SBR participation in processes allowing axons to reach and identify their targets.

Без специальных маркеров глиальных клеток невозможно выявить клеточную специфичность только по одним только морфологическим критериям. SBR обогащает цитоплазму и некоторые ядра глиальных клеток, покрывающих зрительный стебель (рис. 7a’, a», c). Глиальные функции необходимы для правильного развития и выживания нейронов, а дефектная глия становится причиной множественных аномалий развития, включая дегенерацию нейронов [12]. Глия играет важную роль в установлении границ между зрительными центрами головного мозга [28]. Это может быть аргументом в пользу участия SBR в процессах, позволяющих аксонам достигать и идентифицировать свои цели.

**4. Discussion**

**4.1. The Assumed Cytoplasmic Functions of the SBR RNA-Binding Protein, an Orthologue of the Evolutionarily Conserved NXF1 Protein**

The SBR (NXF1) protein participates in RNA nuclear transport. However, it has no specificity for different mRNA targets. The interactions between NXF1 and mRNAs do not occur directly, as special adapter molecules are required [1,29].

Белок SBR (NXF1) участвует в ядерном транспорте РНК. Однако он не обладает специфичностью к различным мишеням мРНК. Взаимодействия между NXF1 и мРНК не происходят напрямую, так как требуются специальные адапторные молекулы [1,29].

The sbr12 allele carries a 30-nucleotide deletion in exon 9 [30]. The deletion of 30 bp does not shift the reading frame in the coding part of the sbr gene. In SBR12 protein, 10 amino acids (TIFITNATHE) are absent. As a result, the structure of the NTF2L domain is altered. The NTF2L domain is responsible for an interaction with the NXT1 (p15) protein, which is a permanent partner of NXF1 [4,31]. Moreover, the NTF2L domain (as well as the UBA domain) mediates the interaction between NXF1 and nucleoporins (the proteins of nuclear pore complexes) and subsequent transport of all RNP particles from the nucleus to the cytoplasm [31,32]. The structure of the NTF2L domain is important for interactions between NXF1 and various mRNAs and especially for its interaction with the intron-containing transcript of the nxf1 gene, which was established in vertebrates [33,34]. It is unknown whether the analogous intron-containing transcript of the sbr gene is a specific target for Drosophila SBR in the cytoplasm. The intron-containing transcript is more abundant among the sbr transcripts in the fly’s head [35]. It is unknown whether the intron-containing transcript is the specific target of SBR in neurites.

Аллель sbr12 несет 30-нуклеотидную делецию в экзоне 9 [30]. Делеция 30 п.н. не приводит к сдвигу рамки считывания в кодирующей части гена sbr. В белке SBR12 отсутствуют 10 аминокислот (TIFITNATHE). В результате изменяется структура домена NTF2L. Домен NTF2L отвечает за взаимодействие с белком NXT1 (p15), который является постоянным партнером NXF1 [4,31]. Более того, домен NTF2L (как и домен UBA) опосредует взаимодействие между NXF1 и нуклеопоринами (белками комплексов ядерных пор) и последующий транспорт всех частиц РНП из ядра в цитоплазму [31,32]. Структура домена NTF2L важна для взаимодействия NXF1 с различными мРНК и особенно для его взаимодействия с интрон-содержащим транскриптом гена nxf1, установленным у позвоночных [33,34]. Неизвестно, является ли аналогичный интронсодержащий транскрипт гена sbr специфической мишенью для SBR дрозофилы в цитоплазме. Интронсодержащий транскрипт более распространен среди транскриптов sbr в голове мухи [35]. Неизвестно, является ли интрон-содержащий транскрипт специфической мишенью SBR в нейритах.

The defects in the specific brain centers of sbr12 male cannot be simply explained by a decrease in overall mRNA export. The sbr12 allele has a dominant negative effect on the background of the normal sbr+ allele. We cannot exclude the possibility of selective effects of the sbr12 allele on the nuclear transport of some mRNA targets. The presence of SBR12 may affect the export activity of specific mRNAs, which might include localized mRNAs important for neurogenesis. SBR is founded in ribonucleoprotein complexes in neurites, not all neuronal RNP granules are marked by the SBR protein. This observation suggests that SBR can also bind to its specific target RNAs in the cytoplasm [7].

Дефекты в специфических центрах мозга самцов sbr12 не могут быть просто объяснены уменьшением общего экспорта мРНК. Аллель sbr12 оказывает доминантно-негативное действие на фоне нормального аллеля sbr+. Нельзя исключить возможность избирательного действия аллеля sbr12 на ядерный транспорт некоторых мРНК-мишеней. Присутствие SBR12 может влиять на экспортную активность специфических мРНК, которые могут включать локализованные мРНК, важные для нейрогенеза. SBR находится в составе рибонуклеопротеиновых комплексов в нейритах, не все нейрональные гранулы RNP маркируются белком SBR. Это наблюдение предполагает, что SBR также может связываться со своими специфическими РНК-мишенями в цитоплазме [7].

Directed growth of the neurites allows them to reach their targets, and arborization and the establishment and maintenance of connections between neurons depend on dynamic changes in the cytoskeleton with regulated localized translation of localized mRNAs [36]. Non-random distribution of SBR in the cytoplasm of various cells, including nervous system cells [7], suggests that localized mRNAs associated with the cytoskeleton may be among the targets of SBR [8].

Направленный рост нейритов позволяет им достигать своих мишеней, а разветвление, установление и поддержание связей между нейронами зависят от динамических изменений цитоскелета с регулируемой локализованной трансляцией локализованных мРНК [36]. Неслучайное распределение SBR в цитоплазме различных клеток, в том числе клеток нервной системы [7], позволяет предположить, что среди мишеней SBR могут быть локализованные мРНК, связанные с цитоскелетом [8].

In the eye imaginal discs of sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males, the axons of the photoreceptors from the different ommatidia did not form strictly ordered bundles. This observation suggests a disruption in the connections between these axons and their terminals and targets. We cannot exclude the dominant-negative influence of the sbr12 allele on the nuclear export of specific mRNAs. We have shown nonrandom cytoplasmic localization of the SBR proteins, which suggest additional cytoplasmic functions of the sbr gene. SBR is often localized near the cellular membrane (Figure S2). In the cytoplasm of various cells, SBR is found involved in granules (Figure 7c) [7], which are likely to be RNP-granules, since SBR is an RNA-binding protein. RNP-granules are quite complex and may contain proteins of signaling systems such as kinases and phosphatases [37]. This is required for the regulation of a localized mRNAs translation. The history of the discovery of TAP/Hs NXF1 (human ortholog of SBR) should be considered. TAP was first described as a cell adhesion factor (TAP—Tip Associated Protein, where tip—Tyrosine kinase Interacting Protein) [38]. Only later NXF1 (TAP) was identified as a protein involved in the nuclear export of different mRNAs [39].

В имагинальных дисках глаз самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ аксоны фоторецепторов из разных омматидий не образовывали строго упорядоченных пучков. Это наблюдение предполагает нарушение связи между этими аксонами и их окончаниями и мишенями. Мы не можем исключить доминантно-негативное влияние аллеля sbr12 на ядерный экспорт специфических мРНК. Мы показали неслучайную цитоплазматическую локализацию белков SBR, что свидетельствует о дополнительных цитоплазматических функциях гена sbr. SBR часто локализуется вблизи клеточной мембраны (рис. S2). В цитоплазме различных клеток SBR обнаруживается в гранулах (рис. 7в) [7], которые, вероятно, являются RNP-гранулами, поскольку SBR является РНК-связывающим белком. РНП-гранулы достаточно сложны и могут содержать белки сигнальных систем, такие как киназы и фосфатазы [37]. Это необходимо для регуляции локализованной трансляции мРНК. Следует рассмотреть историю открытия TAP/Hs NXF1 (человеческий ортолог SBR). TAP был впервые описан как фактор клеточной адгезии (TAP — Tip Associated Protein, где tip — белок, взаимодействующий с тирозинкиназой) [38]. Лишь позднее NXF1 (TAP) был идентифицирован как белок, участвующий в ядерном экспорте различных мРНК [39].

Cell adhesion molecules play important roles not only in fasciculation but also in axon targeting, and their malfunctions lead to morphogenesis defects [40,41]. Furthermore, neurons or their processes that form incorrect connections are usually destroyed [42–45]. This process might explain the neurodegeneration observed in the medulla in the brain optic lobes in sbr12/Dp(1;Y)y+v+ male larvae (Figure 6c,c0). Establishment of the correct contacts between neurons and their targets is a necessary requirement for neuron survival [27,42]. The structural defects and neurodegeneration foci in the medulla of sbr12/Dp(1;Y)y+v+ adult males may also be consequences of the elimination of neurons that formed aberrant synaptic connections. It is important to note that the predominant location of the areas of neurodegeneration in the medulla was consistent with defects in the photoreceptor targeting in this neuropil. Since R-neurons assume the role of pioneer neurons in the formation of the medulla, the elimination of their axons can cause of the medulla malformations. There are many mechanisms of neurodegeneration, and defects in RNA-binding proteins have been proposed to be a cause of neurodegeneration [46–49]. The defects of axon pathfinding, photoreceptor axon bundle individualization, and neurodegeneration can occur due to malfunction of intercellular communications [12].

Молекулы клеточной адгезии играют важную роль не только в фасцикуляции, но и в нацеливании на аксоны, и их нарушения приводят к дефектам морфогенеза [40,41]. Кроме того, нейроны или их отростки, образующие неправильные связи, обычно разрушаются [42–45]. Этот процесс может объяснить нейродегенерацию, наблюдаемую в мозговом веществе оптических долей головного мозга у личинок самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ (рис. 6с, с0). Установление правильных контактов между нейронами и их мишенями является необходимым условием выживания нейронов [27,42]. Структурные дефекты и очаги нейродегенерации в мозговом веществе взрослых самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ также могут быть следствием элиминации нейронов, образующих аберрантные синаптические связи. Важно отметить, что преимущественное расположение участков нейродегенерации в мозговом веществе соответствовало дефектам таргетинга фоторецепторов в этом нейропиле. Поскольку R-нейроны берут на себя роль пионерных нейронов в формировании продолговатого мозга, элиминация их аксонов может вызвать пороки развития продолговатого мозга. Существует множество механизмов нейродегенерации, и предполагается, что причиной нейродегенерации являются дефекты РНК-связывающих белков [46–49]. Дефекты поиска пути аксонов, индивидуализации фоторецепторных пучков аксонов и нейродегенерация могут возникать из-за нарушения межклеточных коммуникаций [12].

**4.2. The Non-Random Distribution of SBR in the Different Brain Cells**

The non-random distribution of SBR in the brain and in the eye-antennal imaginal disc (EAID) as a whole, and the characteristic subcellular localization of this protein, indicates the importance of SBR in the formation of certain structures during larval development. The SBR marks the optic stalk (Figure 7a0,a00,b0,b00,c) and some neuroblasts with their daughter cells (Figure 7b0,b00). The ommatidia boundaries are marked by anti-SBR in the eye-antennal imaginal disc that looks like a green mesh. All marked by SBR structures are involved in forming the medullar boundary facing the lamina. In the optic stalk, some glial cells and axons are enriched by SBR (7a0,c). The contacts of glial cells with neurons, including their axons, are required for glial cells migration [50]. Glial cell migration is regulated by the external signals causing changes in the cytoskeleton [51,52]. At the same time, glial cells themselves are the source of extracellular signals guiding the pathway of axons to their targets within the developing brain [53]. Axon pathfinding is exceptionally sensitive to the perturbation of the actin cytoskeleton [54,55]. The localization of SBR in the cytoplasm of glial cells and in the axons further supports the hypothesis that RNA-binding protein SBR is essential for cell–cell communications forming the boundaries between the brain compartments.

Неслучайное распределение SBR в головном мозге и в глазо-антенальном имагинальном диске (EAID) в целом, а также характерная субклеточная локализация этого белка указывают на важность SBR в формировании определенных структур во время личиночного развития. SBR маркирует зрительный стебель (рис. 7a0, a00, b0, b00, c) и некоторые нейробласты с их дочерними клетками (рис. 7b0, b00). Границы омматидиев отмечены анти-SBR в имагинальном диске глаза-антенны, который выглядит как зеленая сетка. Все отмеченные SBR структуры участвуют в формировании медуллярной границы, обращенной к пластинке. В зрительном стебле некоторые глиальные клетки и аксоны обогащены SBR (7a0,c). Контакты глиальных клеток с нейронами, включая их аксоны, необходимы для миграции глиальных клеток [50]. Миграция глиальных клеток регулируется внешними сигналами, вызывающими изменения в цитоскелете [51,52]. В то же время сами глиальные клетки являются источником внеклеточных сигналов, направляющих путь аксонов к их мишеням в развивающемся мозге [53]. Поиск пути аксона исключительно чувствителен к возмущению актинового цитоскелета [54,55]. Локализация SBR в цитоплазме глиальных клеток и в аксонах дополнительно подтверждает гипотезу о том, что РНК-связывающий белок SBR необходим для межклеточных коммуникаций, формирующих границы между отделами мозга.

There are special markers that identify glial cells. A glia specific expression of the genes reversed polarity (repo) or glial cells missing (gcm) allows to distinguish glial cells from neurons [12]. Nevertheless, there are some types of glial cells which can be recognized by the morphological criteria. On these criteria, it can be concluded that the SBR protein is enriched the nuclei and the cytoplasm of glial cells connected with the optic stalk (Figure 7a0,a00,b0,b00,c). All photoreceptor axons come together in a thick bundle called an optic stalk, which connects the eye imaginal disc to the brain [56]. Various types of glial cells associate with the optic stalk [57,58]. The role of SBR in the functioning of specific types of glial cells is unknown.

Существуют специальные маркеры, которые идентифицируют глиальные клетки. Глиоспецифическая экспрессия генов обратной полярности (repo) или отсутствия глиальных клеток (gcm) позволяет отличить глиальные клетки от нейронов [12]. Тем не менее, есть некоторые типы глиальных клеток, которые можно распознать по морфологическим критериям. По этим критериям можно сделать вывод, что белком SBR обогащены ядра и цитоплазма глиальных клеток, связанных с зрительным стеблем (рис. 7а0,а00,b0,b00,c). Все аксоны фоторецепторов собираются вместе в толстый пучок, называемый зрительным стеблем, который соединяет имагинальный диск глаза с мозгом [56]. Различные типы глиальных клеток связаны с зрительным стеблем [57,58]. Роль SBR в функционировании конкретных типов глиальных клеток неизвестна.

Cytoplasmic localization of the SBR suggest the existence of the prospective RNAtargets in glial cells, as well as in neurons. This is particularly relevant for large specialized cells whose function is to rapidly respond to external signals. The wrapping glia is important for the spatial distribution of the axons of the photoreceptor neurons [59]. The glia is involved in the photoreceptor axonal projection [59]. In sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males, the defects of signaling between wrapping glia and axon bundles may result in the disordered axonal projections. Furthermore, the interaction between neurons and glia is essential for the establishment of sharp compartment boundaries in the brain [60,61].

Цитоплазматическая локализация SBR предполагает существование предполагаемых РНК-мишеней в глиальных клетках, а также в нейронах. Это особенно актуально для крупных специализированных клеток, функция которых заключается в быстром реагировании на внешние сигналы. Обертывающая глия важна для пространственного распределения аксонов фоторецепторных нейронов [59]. Глия участвует в проекции аксона фоторецептора [59]. У самцов sbr12/Dp(1;Y)y+v+ дефекты передачи сигналов между оберткой глии и пучками аксонов могут приводить к неупорядоченным проекциям аксонов. Кроме того, взаимодействие между нейронами и глией необходимо для установления четких границ компартментов в головном мозге [60,61].

**4.3. Allele-Specific Phenotypes of sbr Gene Mutations**

sbr12/Dp(1;Y)y+v+ males are characterized by abnormalities in sexual behavior and lower activity in the test for negative geotaxis [19]. The sterile sbr12 males do not have mobile spermatozoa [6]. Spermatozoa immobility is an allelespecific phenotype of sbr12, sbr17, and sbr18 alleles. The male sterility of flies with mutant sbr alleles is accompanied by axonemal abnormalities (i.e., defects in the cytoskeleton structure). The sbr1 and sbr2 alleles cause defects in bristle morphology, but homo- and hemizygotes animals are viable [62]. The bristles are a sensory organ of D. melanogaster whose development is a classic example of the realization of positional information during cell differentiation. As a rule, after asymmetric division, two daughter cells have unequal distributions of cytoplasmic determinants (including RNP complexes) and differ in their spindle apparatus orientation [63–66]. For example, segregation of neuroblasts from neuroepithelial cells and the subsequent asymmetric neuroblast divisions also depend on spindle orientation and non-random distribution of cytoplasmic determinants, which provide positional information.

Самцы sbr12/Dp(1;Y)y+v+ характеризуются аномалиями полового поведения и меньшей активностью в тесте на отрицательный геотаксис [19]. Стерильные самцы sbr12 не имеют подвижных сперматозоидов [6]. Неподвижность сперматозоидов является аллельспецифическим фенотипом аллелей sbr12, sbr17 и sbr18. Самцовая стерильность мух с мутантными аллелями sbr сопровождается аксонемными аномалиями (т.е. дефектами строения цитоскелета). Аллели sbr1 и sbr2 вызывают дефекты морфологии щетинок, но гомо- и гемизиготы жизнеспособны [62]. Щетинки — сенсорный орган D. melanogaster, развитие которого является классическим примером реализации позиционной информации при дифференцировке клеток. Как правило, после асимметричного деления две дочерние клетки имеют неодинаковое распределение цитоплазматических детерминант (включая РНП-комплексы) и отличаются ориентацией своего веретенообразного аппарата [63-66]. Напр., сегрегация нейробластов от нейроэпителиальных клеток и последующие асимметричные деления нейробластов также зависят от ориентации веретена и неслучайного распределения цитоплазматических детерминант, которые обеспечивают позиционную информацию.

NXF1 is a component of different macromolecular complexes, and it interacts with proteins and RNAs [67]. The specificities of these interactions are determined by the domain structure of an NXF1 (it contains a LRR (leucine-rich repeat) domain that controls protein-protein interactions, an NTF2L (nuclear transport 2 like) domain that supports an interaction with its partner protein NXT1, and an RBD (RNA-binding domain) and by conformational features of the entire molecule [34,68].

NXF1 входит в состав различных макромолекулярных комплексов и взаимодействует с белками и РНК [67]. Специфичность этих взаимодействий определяется доменной структурой NXF1 (он содержит домен LRR (лейцин-богатые повторы), который контролирует белок-белковые взаимодействия, домен NTF2L (ядерный транспорт 2-подобный), который поддерживает взаимодействие с белком-партнером). NXT1 и RBD (РНК-связывающий домен) и по конформационным особенностям всей молекулы [34,68].

Defects in one part of the NXF1 molecule may affect functions of some complexes without having significant effects on the functions of others. The propensity of NXF1 to multimerize imparts a wide range of variability in heterozygous individuals. RNP complexes can contain different ratios of normal to mutant protein subunits, and this variability can affect structural and functional features of the complex and explain variations in the dominant negative effects due to the presence of mutant subunits.

Дефекты в одной части молекулы NXF1 могут влиять на функции одних комплексов, не оказывая существенного влияния на функции других. Склонность NXF1 к мультимеризации придает гетерозиготным индивидуумам широкий диапазон изменчивости. Комплексы РНП могут содержать различное соотношение нормальных и мутантных белковых субъединиц, и эта вариабельность может влиять на структурно-функциональные особенности комплекса и объяснять вариации доминантно-негативных эффектов за счет присутствия мутантных субъединиц.

**5. Conclusions**

SBR protein is required for the formation of the inner structure and the establishment of boundaries in the medulla of the Drosophila visual system. Morphogenetic events and the establishment of brain compartment boundaries are influenced by the cytoskeleton and membrane-associated RNP-complexes. The disorganization of the brain compartment boundaries is also aggravated by the degeneration of neurons with abnormally terminated axons. The formation of brain compartment boundaries depends on intercellular communication with local translation participation. The distribution of SBR in the nucleus and cytoplasm of specific neurons and glial cells suggests specialized functions of this protein. Determining of the composition of cytoplasmic granules containing SBR and enriching specialized cells will undoubtedly contribute to the understanding of the functions of SBR in the cytoplasm.

Белок SBR необходим для формирования внутренней структуры и установления границ в мозговом веществе зрительной системы дрозофилы. На морфогенетические события и установление границ компартментов головного мозга влияют цитоскелет и связанные с мембраной RNP-комплексы. Дезорганизация границ отделов головного мозга также усугубляется дегенерацией нейронов с аномально оканчивающимися аксонами. Формирование границ отделов головного мозга зависит от межклеточной коммуникации с участием локальной трансляции. Распределение SBR в ядре и цитоплазме специфических нейронов и глиальных клеток свидетельствует о специализированных функциях этого белка. Определение состава цитоплазматических гранул, содержащих SBR и обогащающих специализированные клетки, несомненно, будет способствовать пониманию функций SBR в цитоплазме.