

УДК 591

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ГОРМОНОВ РАЗВИТИЯ У НАСЕКОМЫХ<sup>1</sup>

© 2007 г. В. Г. Митрофанов

Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д.26

E-mail: vgm1936@mail.ru

Поступила в редакцию 18.04.06 г.

Окончательный вариант получен 17.07.06 г.

Представлен обзор известных данных о молекулярных механизмах регуляции экспрессии генов гормоном развития экдизоном и ювенильным гормоном. Основным рецептором экдизона у *D. melanogaster* является гетеродимер ESP/USP. У других насекомых выявлены структуры, сходные с ESP/USP. Сведения о молекулярно-генетических механизмах действия ювеноидов менее определены. Предполагается, что ювенильный гормон у насекомых является модулятором действия экдизона.

*Ключевые слова:* экдизон, ювенильный гормон, дрозофила, насекомые, развитие.

Основные процессы развития насекомых контролируются сравнительно небольшим числом гормонов, в основном ювеноидами и экдистероидами. Их химическая структура довольно проста и консервативна, и тем более удивительно разнообразие физиологических процессов, которые подвержены влиянию гормонов. Маловероятно, чтобы во всех случаях механизм действия гормонов был всегда одинаковым. Наибольшее влияние на развитие оказывает экдизон, исследованию генетических и молекулярных механизмов его действия уделяется основное внимание по сравнению с другими гормонами и метаболитами, влияющими на развитие насекомых. Большинство исследований генетических механизмов действия гормонов выполнено на *Drosophila melanogaster* и это естественно, потому что этот вид по сравнению с другими насекомыми лучше всех изучен как генетически, так и с точки зрения физиологии развития. Однако и для других видов насекомых, особенно двукрылых и чешуекрылых, получены данные, дополняющие и открывающие совершенно новые аспекты влияния гормонов на развитие насекомых. В настоящее время доказана ключевая роль белкового рецептора в действии гормона и скорее всего именно структура рецептора, изменяющаяся под действием гормона, и является истинной причиной разнообразного влияния гормона на развитие насекомого. В том, что сами по себе гормоны не являются прямыми регуляторами развития, убеждает наличие их многочисленных аналогов и агонистов, химическая

структура которых не имеет ничего общего с природными гормонами (Ortego, Bowers, 1996; Blackford, Dinan, 1997).

Тем не менее развитие и метаморфоз насекомых невозможны без экдизона. Об этом свидетельствуют мутации, связанные с нарушением синтеза экдистероидов, которые были индуцированы у *D. melanogaster*. Можно привести несколько примеров нарушений развития у дефицитных по синтезу экдизона дрозофил.

У личинок 3-го возраста температурочувствительной летальной мутации *ecd<sup>l</sup>* *D. melanogaster* при 29°C содержание экдизона не более 5% от нормы. Они живут, не окукливаясь, до трех недель (Garen et al., 1977).

Мутация *giant (gt)* у *D. melanogaster*, локализованная в хромосоме X, влияет на увеличение уровня титра 20-ОН-экдистерона (20-ОН-Э) при формировании пупария. Продолжительность развития личинки 3L растягивается на 4 сут, и в это время имгинальные диски зреют медленнее, чем нормальные. Если мутантам давать 20-ОН-Э, то они развиваются нормально: таким образом, эта мутация вызывает дефицит 20-ОН-Э перед окукливанием (Schwartz et al., 1984).

Мутации типа “нехватки функции” в локусе *dre4* (хромосома 3L, 62B-D) у *D. melanogaster* вызывают остановки развития в 1-м возрасте (эмбриогенез не затрагивается), после чего личинки живут довольно долго. Чувствительный к температуре 31°C аллель *dre4-e55* вызывает остановку развития в 1-м и 2-м возрастах в рестриктивных условиях. При некоторых температурных режимах личинка 2-го возраста окукливается, не достигая 3-го. Неокукливание и дефекты метаморфоза связаны с редукцией или

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-49450) и Госконтрактом 10002-251/П-24/154-150/200404-111.

элиминацией пиков экдистероидов, в норме появляющихся у поздних личинок, предкуколок, куколок и фартатных имаго. Ген *dre4* в кольцевых железах экспрессируется автономно и требуется на многих стадиях развития (Sliter, Gilbert, 1992).

Летальная мутация *dor-lt187* вызывает гибель личинок на стадии 3-го возраста – у них полностью отсутствуют экдизоновые пuffs. Если слюнные железы мутантов инкубировать в среде С46Р с экдизоном ( $10^{-5}$  М), то puffинг полностью восстанавливается. Эта леталь также относится к классу экдизондефицитных мутаций (Biyasheva et al., 1985).

С другой стороны, существует класс мутаций, которые вызывают потерю чувствительности всех тканей к 20-ОН-Э, например *l(1)npr-1*, *l(1)npr-2* и *l(1)d.norm.-1a* у дрозофилы (Fristrom et al., 1981). Поэтому изучение генетических механизмов действия гормонов, с одной стороны, требует анализа факторов, которые определяют активацию генов, чувствительных к гормонам, а с другой – анализа закономерностей формирования компетенции органов и тканей к гормонам.

Впервые влияние экдизона на дифференциальную активность генов было выявлено на политенных хромосомах слюнных желез дрозофил и других двукрылых, имеющих политенные хромосомы. Весь объем исследований по этому вопросу можно оценить, обратившись к специальным обзорам (см. например: Ashburner, 1990). Здесь будут рассмотрены только основные результаты исследования цитогенетических механизмов действия гормонов.

#### ДЕЙСТВИЕ ЭКДИЗОНА НА СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ПУФФИНГ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ДВУКРЫЛЫХ

Пуффинг политенных хромосом слюнных желез двукрылых всегда служил основным объектом исследования механизмов действия гормонов (особенно экдистероидов) на активацию специфических генов. Сейчас уже известен довольно широкий набор видов двукрылых, на которых проведены сходные исследования, и полученные результаты вполне можно сравнивать, однако большинство работ было выполнено на хромосомах *D. melanogaster*.

В процессе развития личинок перед линькой каждого личиночного возраста в ее теле повышается концентрация гормона линьки экдизона. Однако политенные хромосомы становятся доступными для цитологического анализа только в поздних возрастах. У *Drosophila* – это вторая половина 3-го возраста, когда политения хромосом достаточно хорошо выражена. Экдизоновые пuffs можно индуцировать с помощью инъекций гормона на более ранних этапах развития 3-го возраста, когда они еще не появляются в нормальных условиях развития.

У *D. melanogaster* описано три набора пuffs, разделенных по времени появления: так называемые межличиночные, ранние и поздние. Первыми индуцируются (в середине 3-го возраста) межличиночные пuffs, гены которых контролируют синтез белков клея, с помощью которых личинка приклеивает себя к твердому субстрату для завершения метаморфоза. Межличиночные гены подавляются при формировании пупария по мере того как высокие титры экдизона активируют небольшой набор ранних регуляторных генов (Ashburner, Berendes, 1978).

Ранние пuffs – 74EF, 75B – индуцируются в течение нескольких минут и достигают максимума после 3 ч воздействия, а затем регрессируют. Ранние гены активируют более 100 поздних генов вторичного ответа. Ранний puff 2B5 локализован на конце X-хромосомы, а пuffs 74EF и 75B – в левом плече хромосомы 3. Поздние пuffs активируются при 25°C через 6 ч после воздействия экдизоном (Ashburner, Richards, 1976).

Дупликации ранних пuffs приводят к большему и более быстрому ответу некоторых, но не всех, поздних пuffs на гормон. Делеции ранних пuffs приводят к задержке ответа тех же пuffs. Таким образом, ранние пuffs и их продукты контролируют активность некоторых поздних пuffs (Walker, Ashburner, 1981).

Развитие ранних пuffs у *D. melanogaster* индуцируется экдизоном. Процесс начинается с активации зависимого от гормона ряда транскрипционных факторов (ранних генов), которые в свою очередь активируют тканеспецифичные гены-эффекторы (поздние гены). Участок политенной хромосомы 71E содержит кластер из десяти генов (гены *L71*), которые регулируются экдизоном. Гены *L71* кодируют семейство малых химически основных белков с консервативной основой из цистеиновых остатков. Участок 71E содержит ген *L71-1* с характеристиками межличиночных клеящих белков слюнных желез (Wright et al., 1996).

Не менее интересны и механизмы включения поздних пuffs. У *D. melanogaster* некоторые поздние экдизоновые пuffs можно также индуцировать умеренным детергентом дигитонином. Однако они индуцируются только на стадии, непосредственно предшествующей тому моменту, когда должен появиться пуффинг, запрограммированный в развитии. В связи с этим на культуре слюнных желез *in vitro* был изучен вопрос о том, что индуцирует поздний пуффинг: сам экдизон или белковые продукты ранних пuffs. Было показано, что дигитонин-ответственность можно индуцировать *in vitro* инкубацией слюнных желез с экдизоном (первый шаг). Первый шаг можно также индуцировать ингибиторами белкового синтеза даже в отсутствие экдизона. Второй шаг требует и экдизона, и белкового синтеза, если только не было обработки дигитонином. Наконец, первый, а не второй шаг определяется временными параметрами формирования нор-

мального пуфа этого локуса. Полученные данные предполагают, что экдизоновый контроль обоих этапов регулируется посредством активации двух типов ранних генов. Первый тип, функцию которого можно имитировать циклогексимидом, включает локусы, отвечающие на дигитонин; и второй тип, который имитируется дигитонином, активирует локусы, чтобы сформировать пуфы (Asaoka et al., 1995).

В состав многих пуфов политенных хромосом *D. melanogaster* входит белок Vx42 (молекуляр. масса 66 кДа), распределение которого меняется в соответствии с изменением пуффинга под действием экдизона. Из геномной библиотеки выделена кДНК, соответствующая гену *Vx42*. Два транскрипта постоянно обнаруживаются уже в раннем эмбриогенезе у 0–3-часовых эмбрионов. Последовательности *Vx42* локализованы в X-хромосоме (Wieland et al., 1992).

Из других объектов действие экдизона на пуффинг изучалось у некоторых видов рода *Drosophila*, а также у ряда двукрылых, у которых политенные хромосомы доступны для изучения.

Под действием экдизона у *D. virilis* в хромосомах слюнных желез возникает пять ранних экдизоновых пуфов: X-A-6, 2-D-3, 3-C-1, 3-G-2 и 4-C-4 (Полуэктова и др., 1980). Такие пуфы отсутствуют у хромосомах 5 и 6, в остальных же они расположены в дистальных участках. Сравнение кинетики роста ранних пуфов у *D. melanogaster* и *D. virilis* показало, что пуфам 23E и 74EF у *D. melanogaster* соответствуют пуфы 2-D-3 и 3-G-2 у *D. virilis*, а пуфу 75B – пуф 4-C-4 (Полуэктова и др., 1987).

У *D. hydei* экдизоновые пуфы появляются в две фазы: сначала в течение 15–20 мин после инъекции гормона развиваются три пуфа, а через 5–6 ч – еще одна группа, состоящая из пяти поздних пуфов (Berendes, 1972).

Несомненно, экдизон является основным фактором формирования пуффинга политенных хромосом, однако некоторые физиологические процессы также влияют на пуффинг и, возможно, играют определенную роль вместе с экдизоном в активации специфических участков хромосом. Амилорид (блокатор обмена  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  плазменной мембраны) предотвращает изменение внутриклеточного pH, вызванного 20-ОН-Э (Schneider et al., 1996).

Инъекция больших доз экдизона личинкам *Chironomus thummi* последнего возраста приводит к резко выраженным изменениям картины пуффирования хромосом слюнных желез. У личинок появляются типичные пуфы метаморфоза: D1f – в хромосоме III, A3e – в хромосоме II, Ba, A1a, A1c – в хромосоме IV. Через 24 ч после инъекции экдизона индукция активности BRb происходит у большинства хромосом. В итоге преждевременная инъекция гормона линьки дает картину пуффинга, сходную с таковой на стадии предкуколки (Кикнадзе, 1985).

В хромосомах *Rhynchosciaria americana* имеются особые ДНК-пуфы. Если личинкам 4-го возраста преждевременно инъецировать 20-ОН-Э в концентрации 22.6 мМ, то в проксимальном отделе слюнной железы (S1) появляется ДНК-пуф B2b. Активность его сопровождается продукцией мРНК и полипептида с теми же характеристиками, что и продукция пуфа B2b в нормальном развитии (Alvarenga et al., 1991).

Механизм индукции ранних пуфов достаточно ясен, хотя для каждого объекта понятие “раннего пуфа” теряет четкость при сравнении всех результатов, полученных по разным видам. Это затрудняет сравнительный анализ картины пуффирования у разных видов даже в рамках рода *Drosophila*.

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ГЕНОВ ЭКДИЗОНОМ

Изменение титра 20-ОН-Э в организме вызывает последовательные изменения процессов развития, которые являются результатом иерархической регуляции экспрессии генов. У дрозофилы, когда личинка готовится к метаморфозу, трудно назвать орган или ткань, которые не подвергались бы коренным изменениям под действием гормона. Во многих тканях и органах из-за их малых размеров экспрессия генов практически не изучена, однако имагинальные диски, слюнные железы, жировые тела и культура эмбриональной ткани достаточно хорошо исследованы. Одним из важнейших достижений таких исследований является молекулярно-генетический анализ рецепторов гормонов.

*Ядерные рецепторы гормонов.* Рецепторы гормонов относятся к факторам, которые связываются именно со специфическими последовательностями ДНК. Эти факторы составляют многочисленную группу транскрипционных регуляторов, действующих не только в эмбриогенезе, но и на постэмбриональных стадиях развития.

Ядерные рецепторы характеризуются центральным ДНК-связующим доменом (ДСД), который направляет рецептор на специфические последовательности ДНК, известные как реагирующие на гормон элементы. ДСД состоит из двух высоко консервативных “цинковых пальцев”, которые отличают ядерные рецепторы от других ДНК-связующих белков. С-терминальная половина рецептора включает лигандсвязывающий домен (ЛСД), который обладает свойством распознавания гормона и обеспечивает селективность и специфичность физиологического ответа. Короче говоря, ЛСД служит молекулярным включателем, который посредством связывающего лиганда приводит рецептор в транскрипционно-активное состояние.

В настоящее время известны более 150 членов семейства ядерных рецепторов, охватывающих огромное число видов от червей до насекомых и человека. Все известные ядерные рецепторы можно

грубо разделить на стероидные и нестероидные (взаимодействующие с тироидами, ретиноидами и витамином Д).

Техника молекулярного клонирования и генетические методы позволяют идентифицировать многочисленные члены семейства рецепторов, для которых не существует очевидных лигандов. Эти так называемые орфанные рецепторы найдены у всех исследованных видов Metazoa, и можно ожидать, что некоторые из них взаимодействуют с новыми лигандами, тогда как другие, возможно, представляют конститутивные активаторы/рецепторы или факторы, активность которых модулируется уже в посттрансляционный период. Рецепторы экдизона относятся ко второму классу (Mangelsdorf et al., 1995).

Хотя интенсивные исследования существенно прояснили механизмы, посредством которых ядерные рецепторы гормонов регулируют транскрипцию генов-мишеней, мы еще мало знаем о том, как эти изменения в генной экспрессии приводят к специфическим и разнообразным ответам в развитии.

**Ядерные рецепторы гормонов у дрозофилы.** В настоящее время у дрозофилы идентифицировано 16 членов суперсемейства ядерных рецепторов гормонов. Из них восемь имеют специфические функции в эмбриогенезе или на поздних стадиях развития: *kni*, *knrl*, *egon*, *tailless*, *dHNF4*, *FTZ-F1*, *svp*, *DHR39* (или *FTZ-F1β*). Половина из известных ядерных рецепторов гормонов у дрозофилы или индуцируются, или репрессируются экдизоном на уровне транскрипции.

Анализ ДНК-связывающих доменов (С-участок) ядерных рецепторов гормонов дрозофилы выявил уникальный центральный участок из 8–9 аминокислот, фланкированных высококонсервативными участками, которые содержат “цинковый палец”  $Cys_2$   $Cys_2$ . Всего рецептор содержит два “цинковых пальца” (Fisk, Thummel, 1995). Включенный в этот участок Р-бокс определяет специфичность связывания с последовательностью-мишенью. Также является членом этого семейства менее консервативный домен связывания с лигандом димеризации, который локализован вблизи С-конца. Этот участок содержит консервативные повторы гидрофобных аминокислот, которые могут обуславливать димеризацию (Forman, Samuels, 1990). Семь из них связаны с передачей гормонального сигнала, который направляет начало метаморфоза: *E75*, *E78*, *FTZ-F1*, *DHR3*, *DHR39*, *EcR* и *usp* (Woodard et al., 1994; Horner et al., 1995).

У дрозофилы из всех членов суперсемейства ядерных рецепторов гормонов восемь имеют специфические функции в эмбриогенезе или на поздних стадиях развития; ниже дается их краткая характеристика.

**Гены *kni* (*knirps*), *knrl* (*knirps-related*), *egon* (*embryonic gonad*)** локализованы в хромосоме 3. Ген *kni* необходим для сегментации брюшка эмбриона и яв-

ляется членом класса генов *gap*. Он кодирует белок, относящийся к классу ядерных рецепторов гормонов (Nauber et al., 1988). Еще один член этого суперсемейства у *Drosophila*, *knrl*, наследуется по материнской линии, и в эмбрионе его транскрипт расположен повсеместно. На стадии бластомеры появляются два дополнительных транскрипта. Третий гомолог гена *kni*, *egon*, необходим для нормального развития эмбриональных гонад и действует только в конце их развития (Ogo et al., 1988; Rothe et al., 1989).

**Ген *DHR3* параллельно с генами *E75B* и *E78B*** недолго экспрессируется в поздней 3-й личинке с пиком активности в начале предкуколки; он имеет гомолог у *Manduca sexta* – ген *MHR3* (Koelle et al., 1991). *DHR3* является сложным локусом, кодирующим не менее трех классов мРНК (Koelle et al., 1992).

**Гены *DHR38*, *DHR78* (или *XR78E/F*) и *DHR96*** экспрессируются в течение 3-го личиночного возраста и во время предкулолочного развития. *DHR38* является гомологом *NGFI-B* у позвоночных и специфически связывается с *NGFI-B*-элементом ответа. *DHR78* и *DHR96* – орфанные рецепторные гены. *DHR78* индуцируется 20-ОН-Э в культуре личиночных органов и кодирует белковую связь с двумя полусайтами *AGGTCA*, расположенными либо как прямые, либо как палиндромные повторы. *DHR96* также индуцируется 20-ОН-Э и кодирует белковые связи селективно с элементом *hsp27*, реагирующим на 20-ОН-Э. Рецептор 20-ОН-Э может связываться каждой из последовательностей, распознаваемых белками *DHR78* и *DHR96*, что указывает на их дополнение к рецептору для связи с общим набором последовательностей-мишеней (Fisk, Thummel, 1995).

**Ген *tl* (*tailless*)** нужен для сегментации и развития мозга, кишки, мальпигиевых сосудов, он является гомологом гена *TXL* у мышей (Yu et al., 1994).

**Ген *dHNF4*** у мух экспрессируется в средней кишке и мальпигиевых сосудах (Zhong et al., 1993).

**Ген *svp* (*seven up*)** экспрессируется в ЦНС эмбриона и жировых телах, а также в предшественниках фоторецепторных клеток глазных имажинальных дисков R1, R3, R4 и R6 при развитии глаза. При отсутствии функции *svp* эти клетки трансформируются в клетки R7, а клетки R2, R5, R8 развиваются нормально (Mlodzik et al., 1990).

**Ген *E75*** (расположен в зоне раннего пуфа 75B) включает две перекрывающиеся транскрипционные единицы (А и В). Единица А содержит шесть экзонов: два (АО и А1), специфичных для этой единицы, и экзоны 2–5, общие для обеих единиц. Единица В содержит пять экзонов: 5'-терминальный экзон В1 и общие экзоны 2–5. Крупные открытые рамки считывания начинаются в пределах 1-го экзона каждой единицы и продолжаются в последнем экзоне, и поэтому кодируют два разных белка (*E75A* и *E75B*). Оба белка сходны по структуре консервативных ДНК- и гормонсвязывающих доменов и отно-

сятся к суперсемейству стероидных рецепторов. Ген *E75A* содержит два “цинковых пальца”, тогда как *E75B* – только один (Segraves, Hogness, 1990).

Ген *E78* состоит из двух транскрипционных единиц, образующих одно гнездо – *E78A* и *E78B*. *E78A* мРНК экспрессируется в течение короткого интервала в средней куколке и кодирует новый член суперсемейства ядерных рецепторов гормонов. *E78B* кодирует рецепторную изоформу, которая утратила ДНК-связывающий домен, преимущественно экспрессируется при формировании пупария и следует сразу же за *E78A* в куколке. *E78A* кодирует белок из 884 остатков аминокислот, и его ДНК-связывающий домен содержит цистеины, формирующие два “цинковых пальца”. Если транскрипт *E78B* удлиняется со скоростью 1.1–1.4 т.п.о/мин (тыс. пар оснований в мин), как это определено по другим генам у дрозофил, то синтез первичного транскрипта в 17 т.п.о. закончится через 15 мин после действия экдизона. Наоборот, если транскрипт после действия экдизона не обнаруживается через 30 мин, то это связано с синтезом нового белка для достижения максимума активации промотора *E78B* (Stone, Thummel, 1993).

Ген *FTZ-F1* (ген сегментации *fushi tarazu 3*) имеет две изоформы:  $\alpha FTZ-F1$  и  $\beta FTZ-F1$ .  $\alpha FTZ-F1$  экспрессируется в раннем эмбриогенезе (2–4 ч) и кодирует полипептид в 1043 аминокислоты (110 кДа). Основная функция гена – контроль сегментации эмбриона в раннем эмбриогенезе. Его экспрессия совпадает с таковой гена *ftz*. Ген  $\beta FTZ-F1$  функционирует в позднем эмбрионе (14–22 ч) и средней предкуколке (5–6 ч после начала окукливания). Его экспрессия в предкуколке совпадает с активностью пуфа 75CD, где он и локализован. Оба белка являются рецепторами гормона, однако основную роль в передаче гормонального сигнала играет  $\beta FTZ-F1$  (Lavorgna et al., 1991, 1993).

Продукты генов, расположенных в зонах ранних предкулолочных пуфов, являются главными регуляторами, которые дают сигнал к быстрому гистолузу слюнной железы с помощью индукции ряда уникальных поздних генов. Многие другие ткани изменяют программу развития в это время, например, имагинальные диски начинают дифференцировку и эвагинацию (Woodard et al., 1994). Таким образом,  $\beta FTZ-F1$  играет центральную роль в ответе генов предкулолки на экдизон. При РНК-интерференции на кодирующий участок  $\beta FTZ-F1$  не происходит нарушения формирования пупария, но прекращается кулолочное развитие (Lam, Thummel, 2000).

Ген *DHR39* (или *FTZ-F1 $\beta$* ) индуцируется в середине 3-го личиночного возраста (82–84 ч после откладки яиц, параллельно генам *E74B*, *BR-C*, *EcR*) и экспрессируется на дальнейших этапах этого возраста и на стадии предкулолки. Содержание кодируемой им РНК увеличивается параллельно увеличению титра 20-ОН-Э (Andres et al., 1993). По своей

структуре *DHR39* очень схож с *FTZ-F1* (Ohno, Petkovich, 1992).

Ген *usp* (*ultraspiracle*) обладает летальным эффектом и обуславливает ответы на экдизон в развитии. Белок *usp* функционирует при синтезе кутикулы брюшка в середине эмбриогенеза и при личиночных линьках. Он также необходим при детерминации фоторецепторных клеток R7 у имаго. Однако метаморфоз торака и брюшка имаго может происходить и в отсутствие *usp* (Oro et al., 1990).

Ген *EcR* кодирует три изоформы рецепторов экдизона: *EcR-A*, *EcR-B1* и *EcR-B2*, которые имеют общие ДНК- (66 аминокислот) и гормонсвязывающие (221 аминокислоты) домены, но отличаются по N-концевым участкам. В начале метаморфоза разные ткани-мишени экдизона экспрессируют различные комбинации изоформ (Talbot et al., 1993). В ЦНС дрозофилы экспрессия изоформ в деталях коррелировала с изменениями в развитии нейронов (Schubiger et al., 1997).

Кроме известной для формы *EcR-A* мутации *I27A*, которая не инактивирует *EcR-A* и комплементарна 0-аллелям этого локуса, инактивирующим все три изоформы, изолировано шесть новых аллелей, два из которых неспособны к комплементарности с 0-аллелями *EcR-A*, но комплементарны аллелям *EcR-B1*. Остальные четыре аллеля не комплементарны мутациям любого типа (Carney, Bender, 1997).

Структура рецептора экдизона у дрозофилы. Рецептор 20-ОН-Э кодируется двумя членами суперсемейства генов ядерных рецепторов гормонов – *EcR* и *usp*. Экдизоновый белок-рецептор у дрозофилы является гетеродимером из белков *ECR* и *USP*. Этот гетеродимер больше похож на рецептор ретиноевой кислоты, чем на рецептор стероидов у позвоночных (Oro et al., 1990; Koelle et al., 1991; Yao et al., 1993).

*USP*-белок наиболее близок к семейству рецепторов *RXR* у позвоночных и может образовывать гетеродимеры как с *ECR*, так и с рецепторами тирозидов и витамина D у позвоночных (Thomas et al., 1993). ДНК-связывающая активность *ECR/USP* не определяется гормоном, а стимулируется экдистероидом или 9-*цис*-ретиноевой кислотой, что указывает на роль гормона в стабилизации гетеродимера. Все три формы *ECR* связывают ДНК после образования гетеродимеров с *USP* (Koelle 1992; Thomas et al., 1993).

Возможно, *ECR* и *USP* могут осуществлять некоторые функции как гомодимеры, но с помощью окрашенных антител было показано, что все сайты, занимаемые *ECR* на политенных хромосомах, содержат белок *USP* (Talbot et al., 1993). Гетеродимер *ECR-USP* связывает экдизон и “садится” на ген-мишень *EcRE*, активируя тем самым промотор (Thummel, 1995).

Кроме позитивной, отмечены случаи и негативной регуляции активности генов с участием рецепторов гормонов и экдизона. Как правило, они осно-

ваны на конкурентных свойствах белков-рецепторов при их связывании с участками генов-мишеней или экдизонрецепторным комплексом.

*Рецепторы гормонов у других насекомых.* Можно сказать а priori, что в силу консервативности своих функций ядерные рецепторы гормонов других насекомых будут иметь почти идентичную структуру. Однако сравнительный анализ структуры рецепторов гормонов, несомненно, даст материал для понимания картины развития этой функции при адаптивной эволюции насекомых.

У *Manduca sexta* идентифицирован ген *esr2* (*ecdysteroid regulated*), кодирующий белок, анализ аминокислотной последовательности которого выявил сходство со стероидным орфанным рецептором дрозодилы *knrl*. Экспрессия этого гена подавляется экдистероидами *in vitro* и требует синтеза белков (Meszaros, Morton, 1996).

У *Galleria mellonella* обнаружены достаточно высокие уровни содержания мРНК гомологов рецепторов EcR-B1 и *usr*. Гомолог *usr* наиболее обилен во время линьки, но он не индуцируется 20-ОН-Э *in vitro* (Jindra, Riddiford, 1996).

Из библиотеки кДНК еловой листовертки-почкода *Choristoneura fumiferana* выделен клон ДНК, последовательность которой имеет высокую степень идентичности с таковой гена *E75A*, клонированной из *M. sexta*, *G. mellonella* и *D. melanogaster*, поэтому он назван *Choristoneura*-рецептором гормона 75A (CHR75A). У личинки 6-го возраста CHR75 мРНК обнаруживается в эпидермисе, жировых телах и средней кишке; максимум экспрессии наблюдается в течение предкуколического пика экдистероидов в гемолимфе. CHR75 мРНК индуцируется экдизоном в средней кишке, жировых телах и эпидермисе личинок, которые питались нестероидным агонистом экдизона RH-5992. С помощью транскрипции и трансляции CHR75 кДНК *in vitro* можно получить белок с молекуляр. массой 79 кДа, который связывается с рецептором ретиноевой кислоты (Palli et al., 1997a).

У этого же вида обнаружен другой *Choristoneura*-рецептор гормона 3 (CHR3), гомологичный рецепторам других насекомых: *M. sexta* (MHR3), *G. mellonella* (GHR3) и *D. melanogaster* (DHR3) (Palli et al., 1997b).

Из эмбриональной клеточной линии BRL-AG-2 хлопкового долгоносика *Anthonomus grandis* получены белки рецепторного комплекса, состоящего как из AgEcR, так и из AgUSP, которые связывали понастерон А и были гомологичны соответствующим белкам дрозодилы (Dhadialla, Tzertzinis, 1997).

Белок-рецептор экдистероидов выделен и охарактеризован из личинок *Chironomus thummi*, его содержание в теле личинки положительно коррелировало с титром экдизона (Deak, Laufer, 1995).

К членам суперсемейства ядерных гормональных рецепторов относится и фактор VmFTZ-F1, обнаруженный у *Bombux mori* и сходный по своим био-

химическим свойствам с фактором FTZ-F1 у *D. melanogaster*, последний также является ядерным рецептором гормонов (Sun et al., 1994). Падение количества мРНК для четырех белков шелка в шелкоотделительной железе *G. mellonella* тесно связано с ростом титра экдизона к концу последнего личиночного возраста. Это падение можно индуцировать преждевременно с помощью экзогенного 20-ОН-Э (Yang et al., 1995). Здесь видно сходство процессов, происходящих в слюнной железе дрозодилы и шелкоотделительной железе бабочек. Экдизон подавляет синтеза мРНК личиночных генов (очевидно, межличиночных) и индуцирует синтез генов, связанных с подготовкой личинки к метаморфозу. Программированная клеточная гибель передней шелкоотделительной железы у *B. mori* во время куколического метаморфоза запускается экдизоном (Tsuzuki et al., 2001).

Идентификация рецепторов экдизона у разных насекомых как членов суперсемейства ядерных рецепторов предполагает вероятную универсальную природу этих рецепторов у животных и показывает, что они эволюционировали еще до дивергенции позвоночных и беспозвоночных. Лучше всего структура и функция генов, кодирующих рецепторы, изучены у *D. melanogaster*. У других насекомых эти исследования только начинаются. Развитие данного направления, несомненно, даст обширный и интересный материал для сравнительного анализа механизма рецепции гормонов в процессе эволюции.

*Характеристика генов, регулируемых экдизоном.* Экдизон инициирует метаморфоз у дрозодилы посредством индукции обширных изменений в экспрессии генов. Однако уловить эти изменения можно только с помощью молекулярно-генетических методов, позволяющих определить начало транскрипции любого активированного гормоном гена. Особенно четкий ответ получен при воздействии 20-ОН-Э на культуры клеток и тканей *in vivo*. Здесь наблюдается взаимодействие между гормоном и клеткой-мишенью в чистом виде. Однако переоценивать эти данные также не следует, поскольку при культивировании клетки находятся в необычных условиях, при которых отсутствует нормальная иерархия взаимодействий между органами и тканями, характерная для целого организма.

**Ген *Eip28/29*.** У *D. melanogaster* при обработке экдистероидами культивируемой эмбриональной клеточной линии Кс-Н увеличивается относительный синтез трех экдистероидиндуцибельных полипептидов: EIP 40, EIP 29 и EIP 28. Усиление синтеза EIP заметно в пределах 45 (EIP 28) или 75 мин (EIP 40, EIP 29); оно достигает максимума на 4–8-м ч после начала воздействия и продолжается почти 2 сут. Белки EIP 28 и EIP 29 кодируются геном *Eip28/29*, который картирован в районе 71CD хромосомы 3L (Savakis et al., 1980). Кроме него столь же быстро реагирует на экдизон только ген *Eip40*, также найденный в клетках линии Кс (Cherbas et al.,

1991). Ген считывается как единая транскрипционная единица, но в результате сплайсинга продуцируются две зрелые РНК, кодирующие экдизониндуцируемые полипептиды – EIP 28 и 29. Если клетки культуры линии Кс обрабатываются гормоном экдизоном, число транскриптов *Eip28/29* и синтез разных форм EIP28 и EIP29 быстро увеличиваются.

Ген *Eip28/29* относится к генам, у которых один первичный транскрипт дает разные продукты сплайсинга с помощью использования донорных и акцепторных сайтов, что приводит к полиморфизму белка (Schultz et al., 1986).

Транскрипты *Eip28/29* представлены в небольших количествах в течение большинства стадий развития дрозофилы (Schultz et al., 1989). При изучении гена *Eip28/29* в культуре Кс дрозофилы изолирован элемент ответа на экдизон (ecdysone responsible element, EcRE). С помощью делеций установлена его последовательность. Вблизи гена *Eip28/29* идентифицированы три коротких участка связывания с рецептором: Prox, Dist и Upstream (Cherbas et al., 1991).

**Гены 2В.** Гены раннего экдизонового пуфа 2В являются настолько важными в передаче гормонального сигнала органам и тканям, что их структуре посвящено самое большое число публикаций. Генетический анализ этого участка проведен довольно полно благодаря работам Жимулева и Беляевой с сотрудниками (Zhimulev et al., 1995). К сожалению, для других видов дрозофил и других групп насекомых исследования такого рода вообще не проводились, и поэтому сравнительный анализ пуфов, хотя бы у разных видов дрозофил, провести невозможно.

Уже первые результаты генетического анализа показали, что этот пуф имеет сложную генетическую структуру и состоит из следующих групп комплементации: *broad (br)*, *reduced bristle number on palpus (rbp)*, *l(1)pp1*, *l(1)pp2*. Все четыре группы комплементации образуют комплекс *occ* (overlapping complementation complex). Поскольку некоторые мутации не комплементарны ни одной мутации из выделенных групп *occ*, он получил название локуса *ecdysterone sensitivity (esc)*. Кроме того, пуф включает мутации *singed wings (swi)*, *deep orange (dor)*, *non-upariating (npr)*. Мутации *br*, *npr*, *rbp*, *l(1)2Bc* и *l(1)2Bd* составляют локус *Broad-Complex (BR-C)*, синоним *esc* (Zhimulev et al., 1995). Мутации *br*, *npr* и *esc*, возможно, являются аллельными (Belyaeva et al., 1980). Локус *BR-C* занимает точно район 2В3-5 (Belyaeva et al., 1989). Мутации этих классов комплементарны друг другу, но не комплементарны классу мутаций *npr* (Belyaeva et al., 1980). Когда был изучен ответ мутаций в этих группах на 20-ОН-Э, то оказалось, что некоторые межлиночные пуфы не регрессируют в свое время, ряд ранних пуфов не достигают максимальных размеров после индукции гормоном, а некоторые поздние – не реагируют на экдизон. Таким образом, район 2В5 необходим для включения нор-

мальной последовательности пуфов (Belyaeva et al., 1980; Zhimulev et al., 1995).

Летальный период мутаций *BR-C* ранжирован от конца 3-го возраста до конца куколки. Наиболее крайняя группа аллелей *npr* (возможно, аллель *esc*) вызывает недоразвитие почти всех экдизоновых пуфов. Мутантные особи не окукливаются, но личинки продолжают личиночный возраст до гибели. Функции гена *BR-C* многообразны и всегда связаны с экдизоном.

*BR-C* включает более 115 т.о. и содержит, по крайней мере, три регуляторных элемента. Один элемент отвечает на 20-ОН-Э, что приводит к активации пуфов в слюнных железах, второй необходим для активации транскрипции, а третий – для нормальной фертильности (Zhimulev et al., 1995).

*BR-C* кодирует, по крайней мере, три белка, которые отличаются уникальными парами “цинковых пальцев”. Кроме того, каждая из мРНК *BR-C* содержит общий сердцевинный экзон, кодирующий белок, сходный по структуре с эукариотическими факторами транскрипции. Всего локус содержит 10 экзонов и кодирует 12 факторов транскрипции. Последовательность гена *BR-C* включает множественные промоторы и подвержена дифференциальному сплайсингу (Koelle et al., 1991).

Ген *BR-C* наряду с *E74* индуцируется прямо экдизоном, и оба они кодируют семейство факторов транскрипции, регулирующих гены первичного и вторичного ответа на экдизон. Мутации генов *E74* и *BR-C* летальны в течение метаморфоза и вызывают сходные летальные фенотипы и изменения в генах вторичного ответа. Гены *E74* и *BR-C* участвуют в формировании пупария, окукливании и индукции ранних генов. Транскрипционные факторы *E74* и *BR-C* прямо регулируют экспрессию генов клея и поздних генов в слюнной железе поздней личинки 3-го возраста. Возможно, *2Bc+* вносит прямой вклад в регуляцию транскрипции генов *L71-5* и *L71-6* у предкуколки (Fletcher, Thummel, 1995).

Ген *rbp* индуцирует транскрипцию шести генов в позднем пуфе 71Е. Кроме того, *rbp* необходим для транскрипции четырех межлиночных генов (*Sgs-3,4,5* и гена *VII* в пуфе 71Е). Мутации функций *broad*, *l(1)2Bc* и *l(1)2Bd* в локусе *BR-C* не оказывают никакого эффекта на экспрессию исследованных генов (Guay, Guild, 1991).

Ген *l(1)2Bc* необходим для индукции некоторых ранних мРНК (*BR-C*, *E74*, *E75*) и эффективной репрессии самой ранней мРНК в предкуколке. Подобно межлиночным генам вторичного ответа, индукция поздних генов вторичного ответа полностью зависит от *rbp*. *BR-C* играет ключевую роль в определении стадийспецифичности ответа на экдизон. Экдизонрецепторный белковый комплекс сам по себе недостаточен для индукции ранних генов первичного ответа. Экспрессия белков *BR-C* является ключевым регулятором активности генов в начале метаморфоза. Низкий титр экдизона в середи-

не 3-го личиночного возраста индуцирует активность *rbp* и *l(1)2Bc*, которые запускают межличиночные гены. Рост титра экдизона к концу возраста индуцирует синтез ранних РНК генов *E74A*, *E75A* и некоего компонента *BR-C*. Максимальная индукция этих транскриптов зависит от функции *l(1)2Bc* гена *BR-C*. Кроме того, синтезируется один или несколько репрессоров, которые нужны для репрессии межличиночных и ранних генов (Karim et al., 1993).

Своеобразно и взаимодействие *BR-C* с геном *Deformed (Dfd)* – гомеозисным селекторным геном, необходимым для идентичности сегментов головы. Оба гена содержат связывающие ДНК домены (гомеодомен и разновидность “цинкового пальца” соответственно) и регулируют транскрипцию генов-мишеней. Мутанты по этим локусам дают летали в течение метаморфоза, вызывая дефекты реорганизации ЦНС, развития вентрального отдела головы имаго и морфогенеза слюнной железы взрослых насекомых. Двойные мутанты по *Dfd; BR-C* синергически взаимодействуют при нарушении развития вентральной части головы, т.е. гормональная регуляция и идентификация сегментов взаимно пересекаются в постэмбриональном развитии (Restifo, Merrill, 1994).

К сожалению, локус *BR-C* исследован только у *D. melanogaster*. У других видов генетического анализа ранних экдизоновых пухов не было сделано, однако некоторые исследования в этом направлении уже начались. Кластер генов, соответствующих раннему стимулируемому экдизоном пуху 2В у *D. melanogaster*, в хромосоме X был локализован с помощью гибридизации *in situ* у восьми видов *Drosophila*. Гены *ecs*, *dor* и *swi* картированы у *D. funebris*, *D. virilis*, *D. hydei*, *D. repleta*, *D. mercatorum* и *D. paranaensis* в теломерных участках хромосомы X. У *D. kanekoi*, который является видом-двойником *D. virilis*, метка локализована проксимальнее, чем у *D. virilis*. Возможно, этот участок X-хромосомы инвертирован при образовании *D. kanekoi*. У *D. pseudoobscura* эти же гены локализованы в проксимальном районе хромосомы X. Предполагается, что организация этого кластера консервативна у всех видов. У *D. hydei* были обнаружены сайты множественной гибридизации проб ДНК этого участка хромосомы (Kokoza et al., 1992).

**Ген *E74*.** В раннем экдизоновом локусе *E74* экдизон прямо активирует промоторы *E74A* и *E74B*. Скорость удлинения цепи при транскрипции – 1.1 т.о/мин. Появление транскрипта *E74B* активируется очень низкой концентрацией экдизона, примерно в 25 раз меньшей, чем это требуется для активации *E74A*. *E74A* не подавляет *E74B* и функционирует и в личиночных тканях, и в имагинальных дисках. Оба гена расположены в пухе 74EF (Karim, Thummel, 1991). Имеются прямые экспериментальные доказательства того, что ранний ген *E74A* индуцирует транскрипцию позднего гена *L71-6*. В пределах 5'-участка *L71-6* идентифициро-

вано четыре сайта связывания с *E74A*. Таким образом, установлена прямая связь между транскрипционным фактором, индуцированным стероидом, и активацией промотора вторичного ответа. Это показывает, что стероидные сигналы у высших организмов могут быть переданы и амплифицированы посредством регуляторной иерархии (Umess, Thummel, 1990, 1995).

**Ген *E93*** определяет природу индуцируемого стероидом биологического ответа. У мутантов по *E93* личиночные слюнные железы не способны подвергаться индуцированной стероидами клеточной программированной гибели, а *E93* экспрессируется в клетках непосредственно перед началом гибели (Lee et al., 2000).

**Действие экдизона на метаморфоз.** Имагинальные диски *D. melanogaster* представляют собой выпячивания эмбрионального эпидермиса, состоящие примерно из 50 клеток. Основной пик делений имагинальных дисков приходится на 3-й личиночный возраст, причем в начале возраста диски включают примерно 10–20% того числа клеток, которое содержится в конце 3-го возраста. Самый крупный крыловой диск содержит 40–60, а ножной – около 10 тыс. клеток. Развитие дисков контролируется гормонами, и они становятся компетентными к экдизону примерно к середине 3-го возраста. Незрелые диски в ответ на гормон или развиваются только частично, или не развиваются совсем. При культивировании диска в брюшке взрослого самца он теряет способность к развитию в ответ на экдизон и становится похожим на незрелый диск. Компетентность диска восстанавливается при его трансплантации в личинку. Для метаморфоза необходим экдизон, который и является стимулятором развития имагинального диска (Silvert, Fristrom, 1980).

Клетки, однажды среагировавшие на экдистероиды и потом вошедшие в клеточный цикл вновь, становились нечувствительными к повторной стимуляции гормоном. Эта утрата ответа коррелирует с потерей чувствительности рецепторов экдистероидов в стимулированных клетках (Stevens et al., 1980).

В течение предкуколичной дифференцировки имагинальных дисков выделено четыре гена, обозначенных в соответствии с их локализацией на политенных хромосомах и отвечающих на экдизон: *EDG-42A*, *EDG-64CD*, *EDG-78E* и *EDG-84A-1*. Эти гены участвуют в формировании куколичной кутикулы. Транскрипты, комплементарные этим генам, накапливаются в имагинальных дисках в течение 18-часового культивирования *in vitro* под действием 20-ОН-Э. Транскрипты трех из них в культуре без экдизона длительное время не обнаруживались (Fechtel et al., 1988). Повторное добавление гормона в культуру дисков, активно синтезирующих мРНК *EDG*, вызывает быструю репрессию транскрипции *EDG*. Таким образом, 20-ОН-Э действует и как по-



зительный, и как негативный регулятор транскрипции *EDG*.

Регуляция генной транскрипции стероидным гормоном в некоторых случаях может зависеть от коротких палиндромных последовательностей, называемых гормонотвержными элементами (HRE, hormone responsible elements) и расположенных вблизи индуцируемого гена. Активация транскрипции гормоном происходит после связывания этого элемента с помощью гормон-рецепторного комплекса. Связывание гормон-рецепторного комплекса с этими сайтами может вызвать репрессию транскрипции под влиянием гормона. Участки генов *EDG 78* и *EDG 84*, сходные с *EcRE*, имеют следующую структуру (Apple, Fristrom, 1991):

*EcRE* – GACAAGGGTTCAATGGACTTGTC,

*EDG 78* – CgATGacCTTGTC,

*EDG 84* – CgATGacCTTGTC.

Эти данные показывают, что молекулярные механизмы индукции генетической активности в разных тканях имеют, возможно, общие черты.

В жировых телах экдизон индуцирует сравнительно немного генов. Во всяком случае при культивировании жировых тел из мутантных личинок *ecd<sup>1</sup> D. melanogaster* с помощью 20-ОН-Э индуцируется экспрессия двух генов – *LSP-2* и *P1* (*Larval Serum Protein-2* и *Protein-1*). Мутация *ecd<sup>1</sup>* чувствительна к температуре и проявляется только при содержании личинок при 29°C. В течение нормального развития ген *LSP-2* экспрессируется раньше гена *P1*, и этот порядок соблюдается при культивировании жировых тел (Nakanishi, Garen, 1983).

Синтез желточных белков в жировых телах *Aedes aegypti* опосредованно регулируется 20-ОН-Э (Deutsch et al., 1995). Гены группы *Sgs* кодируют белки, вырабатываемые слюнными железами личинок дрозофил, с помощью которых они прикрепляются к субстрату для окукливания (salivary gland secretion). Это типичные тканеспецифичные гены, которые связаны с межличиночными пучками и индуцируются низким титром экдизона. Гормональная регуляция некоторых генов *Sgs* изучена.

Экдизон контролирует как индукцию, так и репрессию “межличиночного” гена *Sgs-4* у дрозофилы. Межличиночные пучки и их гены зависят от раннего гена *BR-C*. Пучок 68С включает три гена *Sgs* (*Sgs-3*, *Sgs-7* и *Sgs-8*), а пучок 3С11-12 – ген *Sgs-4*. РНК гена *BR-C* накапливается в середине 3-го личиночного возраста в слюнной железе перед индукцией гена *Sgs-4*, поскольку он регулирует временные параметры активации гена *Sgs-4*. *BR-C* кодирует семейство регуляторов транскрипции, у которых идентифицирован ряд сайтов связывания с ДНК. Таким образом, *BR-C* обуславливает временной и тканеспецифичный ответ на экдизон по мере того как личинка становится готовой к метаморфозу (Kalm, von et al., 1994).

Поскольку ген *Sgs-4* также контролируется сайтом связывания *EcR/USP*, этот гетеродимер играет основную роль в проведении гормонального сигнала для всех генов *Sgs* (Lehmann, Korge, 1995; Lehmann et al., 1997).

Один из самых заметных и активных межличиночных пучков 3С содержит гены *ng* (*ng-1*, *ng-2* и *ng-3*), которые активно транскрибируются в начале 3-й личиночной стадии, тогда как другие межличиночные гены функционируют позже, когда личинка перестает активно питаться (Andres et al., 1993). Экспрессия генов *ng* не зависит от функции локуса *BR-C*, и они активно транскрибируются в присутствии 0-мутантов гена *BR-C*. Однако позже репрессия генов *ng* уже контролируется нормальными функциями *rbp* и *2Bc*. У личинок, гомозиготных по *2Bc*, активная транскрипция *ng-1,2,3* наблюдается вплоть до окукливания (D’Avino et al., 1995).

### ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ ЮВЕНИЛЬНОГО ГОРМОНА (ЮГ)

Как показано в многочисленных исследованиях, эффекты ЮГ и ювеноидов существенно варьируют у разных насекомых и клетки-мишени отвечают на воздействие достаточно разнообразно. В целом о физиологических эффектах ЮГ известно гораздо больше, чем о его действии непосредственно на генетический аппарат клетки. Из *Manduca sexta* выделен ядерный белок (молекуляр. масса 28 кДа), который связывается с ЮГ (см. обзор: Riddiford, 1994).

Можно отметить, что ювеноиды блокируют экспрессию генов, влияющих на реализацию последующих процессов развития и морфогенеза. С другой стороны, ЮГ индуцирует синтез вителлогенина и оотецина. Кроме того, ювеноиды изменяют свойства мембран таким образом, что вызывают изменения в фолликулярных клетках яйца или активности протеинкиназы С в репродуктивной системе самцов (Kumaran, 1990).

У сверчка *Modicogryllus confirmatus* ЮГ и ЮГ-эстераза играют важную роль в детерминации крыловых морф (длиннокрылой или короткокрылой). Разовые или многократные введения ЮГ-III вновь отродившимся длиннокрылым особям в течение первых нескольких дней развития последней стадии существенно изменяют направление развития от длинных к коротким крыльям (Zera, Tanaka, 1996).

Все эти сведения общего плана о действии ЮГ на развитие вполне согласуются с генетическими данными, полученными при анализе фенотипики ЮГ-дефицитных мутаций у *D. melanogaster*.

Мутации гена *apterous* (*ap*) у *D. melanogaster* приводят к нехватке ЮГ и связаны с нарушением гистологического личиночных жировых тел, остановке вителлогенеза, стерильностью и неправильным брачным поведением – все признаки зависят от ЮГ (Shtorch et al., 1995).

ЮГ и его аналоги подавляют хромосомные пуффы, индуцированные экдизоном в слюнных железах *D. melanogaster* (Richards, 1978). Анализ включения меченного тритием ЮГ-I в клетки слюнных желез личинок *D. virilis* показал, что он проникает и в цитоплазму, и в ядро. Специфика влияния ЮГ на пуффинг у *D. virilis* заключается в усилении экспрессивности трех пуффов в хромосомах 3, 4 и 5 и модификации 11 пуффов (Полуэктова и др., 1985).

При трансплантации желез личинок *D. virilis* в брюшко самок почти половина чувствительных к гормонам районов хромосом реагирует на оба гормона. Во всяком случае той четкой специфики, которая характерна для действия экдизона, не наблюдалось. Вполне возможно, что ЮГ специфически действует на определенные органы, и слюнные железы для него не являются основной мишенью. Цитологические данные свидетельствуют, что ЮГ служит модификатором экдизона, хотя прямых экспериментальных подтверждений этого нет.

У *Ch. tentans in vitro* ЮГ стимулирует пуффинг, однако для этого требуется присутствие экдистерона (Lezzi, 1974).

Достаточно хорошо изучен механизм действия ЮГ на синтез вителлогенина и активацию генов, кодирующих этот белок. Он синтезируется в жировом теле, а в яйце накапливается вителлин, который и преобразуется в желточные белки. Вителлогенин представляет собой димерный гликопротеин, собранный из субъединиц с молекулярной массой 185 кДа. Гены вителлогенина (*Vg*) у *Leucophaea*, *Blattella* и *Locusta* регулируются только ЮГ, но у двукрылых *Aedes* и *Drosophila* в регуляции синтеза белка участвуют как ювеноиды, так и экдистероиды. В жировых телах самок *D. melanogaster* активируются специфичные для пола гены, продукты которых связываются с 5'-регуляторным участком вителлогенинового гена. Поскольку экдистероиды контролируют метаморфоз жировых тел, он усиливает и синтез желточных белков, однако механизм участия экдизона в этом процессе неясен и вполне возможно, что экдизон регулирует синтез желточных белков косвенным образом (Bownes et al., 1988).

Некоторую ясность в проблему регуляции синтеза белков с помощью ЮГ могут внести молекулярно-генетические исследования. Из геномной библиотеки ДНК саранчи *Locusta migratoria* изолировано два вителлогениновых гена: *VgA* и *VgB*. Оба гена локализованы в X-хромосоме и содержат интроны: два в гене *A* и один – в гене *B*. Различия в рестрикционных картах последовательностей этих генов свидетельствуют об их довольно существенной дивергенции, что и подтверждается отсутствием кросс-гибридизации между фрагментами по большому числу кодирующих участков.

Координированная активация обоих генов предполагает, что они обладают эквивалентными регуляторными сигналами, возможно, в их 5'-фланкиру-

ющих участках ДНК. Вблизи генов *VgA* и *VgB* обнаружены повторяющиеся последовательности. В пределах 500 п.о. к 5'-концу от сайтов начала транскрипции фланкирующие последовательности генов *VgA* и *VgB* имеют несколько сходных блоков.

Однако прямая активация гена ЮГ еще не означает, что гены *Vg* непосредственно связываются с комплексом гормон-рецептор. Существует довольно длинный лаг-период перед появлением транскрипта *Vg* после введения в организм насекомого ЮГ. Это может свидетельствовать о косвенном механизме активации генов ЮГ. У саранчи обнаружена корреляция между подъемом и спадом титра ЮГ в гемолимфе и скоростью транскрипции гена *VgB* (Glinka, Wyatt, 1996).

У *Galleria mellonella* низкомолекулярные белки шелка с молекулярной массой 24 и 30 кДа выделяются задним отделом шелкоотделительной железы и кодируются мРНК из 1100 нуклеотидов. Синтез начинается в первые дни последнего возраста, когда титр эндогенного экдизона очень низкий. Сначала синтезируется белок с молекулярной массой 24 кДа, а затем – с 30 кДа. В первый день последнего личиночного возраста личинки чувствительны к экзогенному 20-ОН-Э *in vitro*, однако на третий они уже теряют эту чувствительность. Концентрация 20-ОН-Э в 0,57 мкг увеличивает содержание мРНК из 1100 нуклеотидов, а синтез белка с молекулярной массой 30 кДа возрастает. Если параллельно вводить в систему ЮГ, то он подавляет стимулирующий эффект 20-ОН-Э (Grzelak et al., 1993).

Вероятный рецепторный белок ЮГ идентифицирован в мембранах фолликулярных клеток. Антигонадотропин, малый нейропептид, является антагонистом действия ЮГ на фолликулярные клетки (Davey, 1996).

*Индукция активности генов ювенильным гормоном.* Из геномной библиотеки *Locusta migratoria* выделены два полных гена вителлогенинов (*A* и *B*) вместе с 3'- и 5'-фланкирующими последовательностями. Гены *A* и *B* у этого вида имеют 12 и 10,5 т.п.о. соответственно. Оба гибридизируются с идентифицированной вителлогениновой мРНК, состоящей из 6300 нуклеотидов. Каждый ген содержит большой интрон вблизи 5'-конца, который включает повторяющиеся Lm1-элементы, сходные по своей структуре с повторами *Alu* у человека. Однако основные участки последовательностей обоих генов, кодирующих мРНК, не дают перекрестной гибридизации. Секвенирование 5'-концевых экзонов и фланкирующих районов генов *A* и *B* показало, что оба они содержат короткие (56–58) экзон-лидеры, которые в отличие от остальных кодирующих районов консервативны и идентичны на 87%. Оба гена содержат слева в 5'-фланкирующих районах короткие сходные последовательности, которые, возможно, включены в регуляцию экспрессии ЮГ (Locke et al., 1987).

Кордированная активация генов *VgA* и *VgB* у *L. migratoria* наводит на мысль о том, что они имеют эквивалентные регуляторные сигналы. Действительно, в пределах 500 п.о. в направлении к 5'-концу от сайта инициации транскрипции идентифицировано 11 последовательностей в блоках из 6–12 нуклеотидов, которые сходны в генах *A* и *B* (Locke et al., 1987). У таракана *Periplaneta americana* клонирован ген оотецина – белка, секретлируемого левой коллестериальной железой оотеки. Синтез его регулируется так же, как и синтез вителлогенина и ЮГ. В 5'-фланкирующем участке ДНК найдены два участка по 12 п.о., которые фактически идентичны блокам *Vg* у саранчи и находятся в том же положении относительно начала транскрипции:

оотецин таракана – ATGGATTTGAGG (–342)  
AGGGTTCGGTAA (–245);

*VgA* саранчи – AATGGTTTTTATGT(–677)  
AAGGGTTCGGTAAAC(–228);

*VgB* саранчи – AATCGATTTGATGT(–483)  
AAGAGTTCTATAAC(–228)

(по: Pau et al., 1987).

Следует иметь в виду, что синтез желточных белков довольно сильно подвержен модификации со стороны других генов. У *D. melanogaster*, например, связывающий участок гена *suppressor of Hairy-wing* [*su(Hw)*] влияет на экспрессию гена *ur*, контролирующего синтез желточных белков (Scott, Geyer, 1995).

Кроме генов желточных белков у самок *L. migratoria* под действием ЮГ обнаружен резкий рост синтеза еще двух белков гемолимфы с молекуляр. массой 75 и 20 кДа. Основным компонентом возрастающего количества белка является устойчивый белок накопления (PSP). Если взрослым насекомым, обработанным прекоценом, ввести метопрен, то в гемолимфе повышается уровень PSP, но не аполипофорина III, причем этот процесс характерен для обоих полов. Таким образом, аналог ЮГ индуцирует синтез следующих белков: *Vg* и белка с молекуляр. массой 21 кДа (только у самок), PSP и белка с молекуляр. массой 19 кДа у обоих полов (Wyatt et al., 1992). Еще один ген, который зависит от ЮГ, связан собственно с его метаболизмом – это ЮГ-эстераза. Здесь обнаруживается естественная связь со стадией развития насекомого. У *Heliothis virescens* количество мРНК ЮГ-эстеразы на 2-й день развития личинки 5-го возраста увеличивается в интегументе в три раза по сравнению с мРНК ЮГ-эстеразы в жировых телах. Однако в жировых телах на 4-й день развития мРНК было больше уже в девять раз, чем на 2-й день, тогда как в интегументе она осталась на прежнем уровне. Обработка личинок 5-го возраста на 2-й день развития эпофеноном (аналог ЮГ) приводит к 7- и 14-кратному росту мРНК в интегументе и жировых телах соответственно. Жировые тела – основной источник ЮГ-эстеразы (Wroblewski et al., 1990).

*Рецепторы ЮГ.* Ювенильные гормоны представлены группой терпеновых лигандов, регулирующей трансляцию в развитии насекомых. Поиск и идентификация специфических рецепторов ЮГ оказались менее обнадеживающими, чем в случае экдистероидов. Это обстоятельство, очевидно, и определило характер исследований; они проводились менее интенсивно, чем таковые на экдистероидах. Некоторые положительные результаты все же были получены. Предполагается, что ЮГ связывается с ядерным рецептором USP (ultraspiracle) (Jones, Sharp, 1997).

*Совместное действие экдизона и ЮГ на активацию генов.* Было изучено влияние 20-ОН-Э и ЮГ-III на синтез полипептидов в добавочных репродуктивных железах (accessory reproductive glands) у *Melanoplus sanguinipes*. Исследование проводили в условиях *in vitro*, а железы выделяли из взрослых насекомых 1–7 сут развития. Синтез полипептидов контролировали с помощью меченных изотопами аминокислот. Если гормоны добавляли в среду по отдельности, то они усиливали или подавляли синтез специфических полипептидов либо вызывали синтез новых полипептидов. Для подавляющего большинства полипептидов, синтез которых находится под гормональным контролем, 20-ОН-Э и ЮГ-III оказывают противоположный эффект. Проводили также опыты по влиянию различных концентраций 20-ОН-Э ( $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  М) на 9–10-е сут развития. В большинстве случаев эффект 20-ОН-Э зависел от концентрации, хотя на нее реагировали только немногие полипептиды. В течение полового созревания уровни гормонов колебались довольно значительно (Ismail, Gillot, 1995). Инъекция экдизона молодым личинкам 4-го возраста хирономуса *Chironomus tentans* приводит к появлению специфических пухов (1-18-С и IV-2-В) и синтезу в них РНК. Цитологический и радиоавтографический анализ хромосом показал, что экдизон стимулирует также кольцо Бальбиани 1 (BR1); ЮГ приводит к снижению активности BR1 и индукции пуха в участке 1-19-А. Очевидно, оба гормона являются антагонистами (Lezzi, Gilbert, 1969).

Кольцо Бальбиани BR1 у *Ch. tentans* активируется экдизоном и ингибируется ЮГ (Lezzi, Gilbert, 1969). У *M. sexta* каждый личиночный кутикулярный ген выключается высоким уровнем 20-ОН-Э; присутствие или отсутствие ЮГ определяет, является ли эта супрессия перманентной в некоторых или во всех клетках (Riddiford et al., 1986).

Сравнивая механизмы действия обоих гормонов, можно сделать следующие выводы, которые, естественно, не могут быть окончательными. Экдистероиды действуют более непосредственно на генном уровне. Они проходят через плазменную мембрану вместе с белком-рецептором, и затем гормон-рецепторный комплекс связывается со специфическими сайтами ДНК генов-мишеней, транскрипцию которых гормон активирует или подавляет. Про-

должительный лаг-период перед тем, как появится транскрипт ЮГ-чувствительного гена, предполагает косвенное действие ЮГ на активность гена-мишени. Тот факт, что ЮГ непосредственно входит в ядро клеток, в свою очередь предполагает наличие модуляции активности генов со стороны ЮГ, но ЮГ в разных тканях может действовать на разном уровне. Что касается взаимодействия этих двух ключевых гормонов на пуффинг политеменных хромосом, то вполне вероятно, что ЮГ блокирует синтез рецепторов экдистероидов, специфичных для поздних экдистероновых пуфов (Richards, 1978). Более детально о взаимодействии экдизона и ювеноидов в развитии можно ознакомиться в специальных работах (Zhou, Riddiford, 2001; Hiruma, Riddiford, 2001, 2004; Bayer et al., 2003).

Как видно из этого довольно краткого обзора молекулярно-генетических механизмов действия основных гормонов насекомых на их развитие, довольно значительные успехи достигнуты в понимании действия экдизона и экдистероидов вообще. Однако обращает на себя внимание тот факт, что исследования проводились с довольно узким кругом объектов: основные факты получены на дрозофиле. Несомненно, представители других отрядов насекомых могут стать объектом исследований такого рода и дать более многообразное представление об эволюционных механизмах действия гормонов на развитие насекомых. По сравнению с ЮГ пока только анализ действия экдизона дал более конкретные результаты, однако действие экдизона происходит на фоне постоянного присутствия ювеноидов, поэтому исследование их совместного действия на геном насекомых может выявить новые аспекты в их влиянии на развитие.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кикнадзе И.И. Онтогенетические изменения активности генов колец Бальбиани и их гормональная регуляция // Организация и экспрессия генов тканеспецифической функции у *Diptera* / Под ред. Салганик Р.И. Новосибирск: Наука, 1985. С. 131–138.
- Полуэктова Е.В., Митрофанов В.Г., Какпаков В.Т. Действие гормонов насекомых на пуффинг хромосом слюнных желез *Drosophila virilis* Sturt., культивируемых *in vitro*. 2. Действие экдистерона и ювенильного гормона // Онтогенез. 1980. Т. 11. № 4. С. 392–401.
- Полуэктова Е.В., Поликарпова С.И., Кожанова Н.И. и др. Включение ювенильного гормона I в клетки слюнных желез личинок *Drosophila virilis* Sturt. // Там же. 1985. Т. 16. № 1. С. 60–66.
- Полуэктова Е.В., Муховатова Л.М., Какпаков В.Т., Митрофанов В.Г. Кинетика пуффинга районов-индикаторов экдистерона в хромосомах слюнных желез личинок *Drosophila virilis* Sturt., культивируемых *in vitro* // Там же. 1987. Т. 18. № 2. С. 140–146.
- Alvarenga C.A.S., Winter C.E., Stocker A.J. et al. *In vivo* effects of ecdysone on puff formation, and RNA and protein synthesis in the salivary glands of *Rhynchosciara americana* // Braz. J. Med. Biol. Res. 1991. V. 24. P. 985–1002.
- Andres A.J., Fletcher J.C., Karim F.D., Thummel C.S. Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription // Devel. Biol. 1993. V. 160. № 1. P. 388–404.
- Apple R.T., Fristrom J.W. 20-hydroxyecdysone is required for and negatively regulates transcription of *Drosophila* pupal cuticle protein genes // Ibid. 1991. V. 146. № 2. P. 569–582.
- Asaoka M., Myohara M., Okada M. Two-step regulation of ecdyson-inducible late puffs in salivary glands of *Drosophila melanogaster* // Devel. Growth Differ. 1995. V. 37. № 2. P. 669–677.
- Ashburner M. Puffs, genes, and hormones revisited // Cell. 1990. V. 61. № 1. P. 1–3.
- Ashburner M., Berendes H.D. Puffing of polytene chromosomes // The genetics and biology of *Drosophila*. V. 2. L.: Acad. Press, 1978. P. 319–395.
- Ashburner M., Richards G. The role of ecdysone in the control of gene activity in the polytene chromosomes of *Drosophila* // Insect development / Ed. Lawrence P.A. N.Y.: Wiley & Sons, 1976. P. 203–225.
- Bayer C., Zhou X., Zhou B. et al. Evolution of the broad locus: the *Manduca sexta* broad Z4 isoform has biological activity in *Drosophila* // Devel. Genes Evol. 2003. V. 213. № 10. P. 471–476.
- Belyaeva E.S., Aizenson M.G., Semeshin V.F. et al. Cytogenetic analysis of region 2D3-4-2D11 of the X-chromosome of the *Drosophila melanogaster*. I. Cytology of the region and mutant complementation groups // Chromosoma. 1980. V. 81. № 3. P. 281–306.
- Belyaeva E.S., Protopopov M.O., Dubrovsky E.B., Zhimulev I.F. Cytogenetic analysis of ecdysteroid action // Ecdysone; from chemistry to mode of action / Ed. Koolman J. Stuttgart; N.Y.: Georg Thieme Verlag, 1989. P. 368–376.
- Berendes H.D. The control of puffing in *Drosophila hydei* // Results and problems in cell differentiation. V. 4. Developmental studies on giant chromosomes / Ed. Beerman W. N.Y.: Springer Verlag, 1972. P. 181–207.
- Biyasheva Z.M., Belyaeva E.S., Zhimulev I.F. Cytogenetic analysis of region 2D3-4-2D11 of the X-chromosome of the *Drosophila melanogaster*. V. Puffing disturbances carried by lethal mutants of gene dor due to ecdysterone deficiency // Chromosoma. 1985. V. 92. № 5. P. 351–356.
- Blackford M., Dinan L. The tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) detoxifies ingested 20-hydroxyecdysone, but is susceptible to the ecdysteroid agonists RH5849 and RH-5992 // Insect Biochem. Mol. Biol. 1997. V. 27. № 2. P. 167–177.
- Bownes M., Shirras A.D., Blair M. et al. Evidence that insect embryogenesis is regulated by ecdysteroid released from yolk protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 5. P. 1554–1557.
- Carney G., Bender M. Isolation of ecdysone receptor (EcR) mutations specific to the EcR-A isoform by local P element mobilization // 38th Annual *Drosophila* Res. Confer. Chicago, Illinois, 1997. P. 149.
- Cherbas L., Lee K., Cherbas P. Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila* *Eip28/29* gene // Genes Devel. 1991. V. 5. P. 120–131.

- Davey K.G. Hormonal control of the follicular epithelium during vitellogenin uptake // *Invert. Reprod. Devel.* 1996. V. 30. № 1–3. P. 249–254.
- D'Avino P.P., Crispi S., Furia M. Hormonal regulation of the *Drosophila melanogaster* ng-genes // *Eur. J. Entomol.* 1995. V. 92. P. 259–261.
- Deak P., Laufer H. Ecdysteroid receptor in *Chironomus thummi* (Diptera: Chironomidae) // *Ibid.* 1995. V. 92. P. 251–257.
- Deitsch K.W., Dittmer N., Kapitskaya M.Z. et al. Regulation of gene expression by 20-hydroxyecdysone in the fat body of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) // *Ibid.* 1995. V. 92. P. 237–244.
- Dhadialla T.S., Tzertzinis G. Characterization and partial cloning of ecdysteroid receptor from a cotton boll weevil embryonic cell line // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1997. V. 35. № 1–2. P. 45–57.
- Fechtel F., Natzle J.E., Brown E.B., Fristrom J.W. Prepupal differentiation of *Drosophila* imaginal discs, identification of four genes whose transcripts accumulate in response to a pulse of 20-hydroxyecdysone // *Genetics.* 1988. V. 120. № 2. P. 465–474.
- Fisk G.J., Thummel C.S. Isolation, regulation, and DNA-binding properties of three drosophila nuclear hormone receptor superfamily members // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 23. P. 10604–10608.
- Fletcher J.C., Thummel C.S. The ecdysone-inducible broad-complex and e74 early genes interact to regulate target gene transcription and *Drosophila* metamorphosis // *Genetics.* 1995. V. 141. № 3. P. 1025–1035.
- Forman B.M., Samuels H.H. Interaction among a subfamily of nuclear hormone receptors: The regulatory sipper model // *Mol. Endocrinol.* 1990. V. 4. P. 1293–1301.
- Fristrom D., Fekete E., Fristrom J. Imaginal disc development in a non-pupariated lethal mutant in *Drosophila melanogaster* // *Wilhelm Roux's Arch.* 1981. V. 190. № 1. P. 11–12.
- Garen A., Kauvar L., Lepesant J.A. Roles of ecdysone in *Drosophila* development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 11. P. 5099–5103.
- Glinka A.V., Wyatt G.R. Juvenile hormone activation of gene transcription in locust fat body // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1996. V. 26. № 1. P. 13–18.
- Grzelak K., Kludkiewicz B., Lasota Z. The effect of 20-hydroxyecdysone on expression of genes coding for low molecular weight silk proteins of *Galleria mellonella* // *Ibid.* 1993. V. 23. № 2. P. 211–216.
- Guay P.S., Guild G.M. The ecdysone-induced puffing cascade in *Drosophila* salivary glands, a Broad-complex early genes regulates intermolt and late gene transcription // *Genetics.* 1991. V. 129. № 1. P. 169–175.
- Hiruma K., Riddiford L.M. Regulation transcription factors MHR4 and  $\beta$ FTZ-F1 by 20-hydroxyecdysone during a larval molt in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* // *Devel. Biol.* 2001. V. 232. № 1. P. 265–274.
- Hiruma K., Riddiford L.M. Differential control of MHR3 promoter activity by isoforms of the ecdysone receptor and inhibitory effects of E75A and MHR3 // *Ibid.* 2004. V. 272. № 2. P. 510–521.
- Horner M., Chen T., Thummel C.S. Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members // *Ibid.* 1995. V. 168. № 2. P. 490–502.
- Ismail P.M., Gillot C. 20-Hydroxyecdysone and juvenile hormone regulation of specific protein synthesis in the male accessory reproductive gland of melanoplus sanguinipes under *in vitro* conditions // *J. Insect Physiol.* 1995. V. 41. № 10. P. 911–920.
- Jindra M., Riddiford L.M. Expression of ecdysteroid-regulated transcripts in the silk gland of the wax moth, *Galleria mellonella* // *Devel. Genes Evol.* 1996. V. 206. № 5. P. 305–314.
- Jones G., Sharp P.A. Ultraspiracle: An invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 25. P. 13499–13503.
- Kalm L., von, Crossgrove K., Seggern D., von et al. The broad-complex directly controls a tissue-specific response to the steroid hormone ecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis // *EMBO J.* 1994. V. 13. № 15. P. 3505–3516.
- Karim F.D., Thummel C.S. Ecdysone coordinates the timing and amounts of E74A and E74B transcription in *Drosophila* // *Genes Devel.* 1991. V. 5. № 6. P. 1067–1079.
- Karim F.D., Guild G.M., Thummel C.S. The *Drosophila* broad-complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis // *Development.* 1993. V. 118. № 3. P. 977–998.
- Koelle M.R., Talbot W.S., Segraves W.A. et al. The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily // *Cell.* 1991. V. 67. № 1. P. 59–77.
- Koelle M.R., Segraves W.A., Hogness D.S. DHR3: A *Drosophila* steroid receptor homologue // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. № 13. P. 6167–6171.
- Kokoza E.B., Belyaeva E.S., Zhimulev I.F. Localization of genes *ecs*, *dor* and *swi* in eight *Drosophila* species // *Genetica.* 1992. V. 87. № 1. P. 79–85.
- Kumaran A.K. Mode of action of JH in insects at the cellular and molecular levels // *Recent advances in comparative arthropod morphology, physiology and development* / V. 1 / Ed. Gupta A.P. New Brunswick; L.: Rutgers Univ. Press, 1990. P. 182–227.
- Lam G., Thummel C.S. Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila* // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. № 16. P. 957–963.
- Lavorgna G., Ueda H., Clos J., Wu C. FTZ-F1, steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of *fushi-tarazu* // *Science.* 1991. V. 252. № 5007. P. 848–851.
- Lavorgna G., Karim G.D., Thummel C.S., Wu C. Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 7. P. 3004–3008.
- Lee C.Y., Wendel D.P., Reid P. et al. E93 directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila* // *Mol. Cell.* 2000. V. 6. № 2. P. 633–643.
- Lehmann M., Korge G. Ecdysone regulation of the *Drosophila Sgs-4* gene is mediated by the synergistic action of ecdysone receptor and SEP3 // *EMBO J.* 1995. V. 14. № 4. P. 716–726.
- Lehmann M., Wattler F., Korge G. Two new regulatory elements controlling the *Drosophila Sgs-3* gene are potential ecdysone receptor and fork head binding sites // *Mech. Devel.* 1997. V. 62. № 1. P. 15–27.
- Lezzi M. *In vitro* effects of juvenile hormone on puffing in *Chironomus* salivary glands // *Mol. Cell Endocrinol.* 1974. V. 1. № 1. P. 189–207.

- Lezzi M., Gilbert L.I. Control of gene activities in the polytene chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone and juvenile hormone // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1969. V. 64. № 2. P. 498–503.
- Locke J., White B.N., Wyatt G.R. Cloning and 5' end nucleotide sequences of two juvenile hormone-inducible vitellogenin genes of the African migratory locust // DNA (N.Y.). 1987. V. 6. № 4. P. 331–342.
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M. et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade // Cell. 1995. V. 83. № 6. P. 835–839.
- Meszáros M., Morton D.B. Identification of a developmentally regulated gene, *esr16*, in the tracheal epithelium of *Manduca sexta*, with homology to a protein from human epididymis // Insect Biochem. Mol. Biol. 1996. V. 26. № 1. P. 7–11.
- Mlodzik M., Hiromi Y., Weber U. et al. The drosophila seven-up gene, a member a steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates // Cell. 1990. V. 60. № 2. P. 211–224.
- Nakanishi Y., Garen A. Selective gene expression induced by ecdysterone in cultured fat bodies of *Drosophila* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 10. P. 2971–2975.
- Nauber U., Pankratz M.J., Kienlin A. et al. Abdominal segmentation of the *Drosophila* embryo requires a hormone receptor-like protein encoded by the gap gene *knirps* // Nature. 1988. V. 336. № 6198. P. 489–492.
- Ohno C.K., Petkovich M. FTZ-F1 7b, a novel member of the *Drosophila* nuclear receptor family // Mech. Devel. 1992. V. 40. P. 13–24.
- Oro A.E., Ong E.S., Margolis J. S. et al. The *Drosophila* gene *knirps*-related is a member of the steroid-receptor gene superfamily // Nature. 1988. V. 336. № 6198. P. 493–496.
- Oro A.E., McKeown M., Evans R.M. Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor // Ibid. 1990. V. 347. № 6290. P. 298–301.
- Ortego F., Bowers W.S. Induction of autotomy in the american bird grasshopper *Schistocerca americana* (Drury) by the ecdysone agonist RH-5849 and investigation of its mode of action // Experimentia. 1996. V. 52. № 1. P. 42–50.
- Palli S.R., Ladd T.R., Ricci A.R. et al. Cloning and developmental expression of Choristoneura hormone receptor 75: A hormone of the *Drosophila* E75 A gene // Devel. Genet. 1997a. V. 20. № 1. P. 36–46.
- Palli S.R., Ladd T.R., Retnakaran A. Cloning and characterization of an isoform of Choristoneura hormone receptor 3 from the spruce budworm // Arch. Insect Biochem. Physiol. 1997b. V. 35. № 1–2. P. 33–44.
- Restifo L.L., Merrill V.K.L. Two *Drosophila* regulatory genes, deformed and the broad-complex, share common functions in development of adult CNS, head, and salivary glands // Devel. Biol. 1994. V. 162. № 2. P. 465–485.
- Richards G. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. VI. Inhibition by juvenile hormones // Ibid. 1978. V. 66. № 1. P. 32–42.
- Riddiford L.M. Cellular and molecular action of juvenile hormone I. Considerations and premetamorphic actions // Adv. Insect Physiol. 1994. V. 24. P. 213–274.
- Riddiford L.M., Baeckmann A., Hice R.E., Rebers J. Developmental expression of three genes for larval cuticular proteins of the tobacco hornworm *Manduca sexta* // Devel. Biol. 1986. V. 118. № 1. P. 82–94.
- Rothe M., Nauber U., Jackle H. Three hormone receptor-like *Drosophila* genes encode an identical DNA-binding finger // EMBO J. 1989. V. 8. № 10. P. 3087–3094.
- Savakis C., Demetri G., Cherbas P. Ecdysteroid-inducible polypeptides in a *Drosophila* cell line // Cell. 1980. V. 22. № 3. P. 665–674.
- Schneider S., Wunsch S., Schwab A., Oberleithner H. Rapid activation of calcium-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange induced by 20-hydroxyecdysone in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster* // Mol. Cell Endocrinol. 1996. V. 116. № 1. P. 73–79.
- Schubiger M., Carney G., Bender M., Truman J. Phenotypic analysis of ecdysone receptor B1/B2-isoform specific mutants generated by P-element excision // 38th Annual *Drosophila* Res. Confer. Chicago, Illinois, 1997. P.163.
- Schultz R.A., Cherbas L., Cherbas P. Alternative splicing generates two distinct *Eip28/29* gene transcripts in *Drosophila* Kc cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 2. P. 9428–9432.
- Schultz R.A., Shlomchuk W., Cherbas L., Cherbas P. Diverse expression of overlapping genes: the *Drosophila* *Eip28/29* gene and its upstream neighbors // Devel. Biol. 1989. V. 131. № 2. P. 515–523.
- Schwartz M.B., Imberski R.B., Kelly T.J. Analysis of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. Characterization of giant, an ecdysteroid-deficient mutant // Ibid. 1984. V. 103. № 1. P. 85–95.
- Scott K.S., Geyer P.K. Effects of the *su(hw)* insulator protein on the expression of the divergently transcribed *Drosophila* yolk protein genes // EMBO J. 1995. P. 14. № 24. P. 6258–6267.
- Segraves W.A., Hogness D.S. The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily // Genes Devel. 1990. V. 4. P. 204–219.
- Shtorch A., Werczberger R., Segal D. Genetic and molecular studies of apterous: a gene implicated in the juvenile hormone system of *Drosophila* // Arch. Insect Biochem. Physiol. 1995. V. 30. № 2–3. P. 195–209.
- Silvert D.J., Fristrom J.W. Biochemistry of imaginal discs: retrospect and prospect // Insect Biochem. 1980. V. 10. P. 340–355.
- Sliter T.J., Gilbert L.I. Developmental arrest and ecdysteroid deficiency resulting from mutations at the *dre4* locus of *Drosophila* // Genetics. 1992. V. 130. № 3. P. 555–568.
- Stevens B., Alvarez C.M., Bohman R., O'Connor J.D. An ecdysteroid-induced alternation in the cell cycle cultured *Drosophila* cells // Cell. 1980. V. 22. № 3. P. 675–682.
- Stone B.L., Thummel C.S. The *Drosophila* 78C early late puff contains E78, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor superfamily // Ibid. 1993. V. 75. № 2. P. 307–320.
- Sun G.-C., Hirose S., Ueda H. Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori* // Devel. Biol. 1994. V. 162. № 2. P. 426–437.
- Talbot W.S., Swyryd E.A., Hogness D.S. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms // Cell. 1993. V. 93. № 7. P. 1323–1337.
- Thomas H.E., Stunnenberg H.G., Stewart A.F. Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X

- receptor and ultraspiracle // *Nature*. 1993. V. 362. № 6419. P. 471–475.
- Thummel C.S. From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members // *Cell*. 1995. V. 83. № 6. P. 871–877.
- Tsuzuki S., Iwami M., Sakurai S. Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2001. V. 31. № 4–5. P. 321–331.
- Umess L.D., Thummel C.S. Molecular interactions within the ecdysone regulatory hierarchy: DNA binding properties of the *Drosophila* ecdysone-inducible E74A protein // *Cell*. 1990. V. 63. № 1. P. 47–61.
- Umess L.D., Thummel C.S. Molecular analysis of a steroid-induced regulatory hierarchy: the *Drosophila* e74a protein directly regulates 171-6 transcription // *EMBO J.* 1995. V. 14. № 24. P. 6239–6246.
- Walker V.K., Ashburner M. The control of ecdysone-regulated puffs in *Drosophila* salivary glands // *Cell*. 1981. V. 26. № 2. P. 269–277.
- Wieland C., Mann S., von Besser H., Saumweber H. The *Drosophila* nuclear protein Bx42, which is found in many puffs on polytene chromosomes, is highly charged // *Chromosoma*. 1992. V. 101. № 8. P. 517–525.
- Woodard C.T., Baehrecke E.H., Thummel C.S. A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone // *Cell*. 1994. V. 79. № 4. P. 607–615.
- Wright L.G., Chen T.H., Thummel C.S., Guild G.M. Molecular characterization of the 71e late puff in *Drosophila melanogaster* reveals a family of novel genes // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 255. № 3. P. 387–400.
- Wroblewski V.J., Harshman L.G., Hanzlik T.N., Hammock B.D. Regulation of juvenile hormone esterase gene expression in the tobacco budworm (*Heliothis virescens*) // *Arch. Biochem. Biophys.* 1990. V. 278. № 2. P. 461–466.
- Wyatt G.R., Kanost M.R., Chin B.C. et al. Juvenile hormone analog and injection effects on locust hemolymph protein synthesis // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1992. V. 20. № 1. P. 167–180.
- Yang C., Krishnan M., Zurovec M. et al. Correlation between ecdysteroid titre and silk gene expression in the last instar larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) // *Eur. J. Entomol.* 1995. V. 92. P. 229–234.
- Yao T., Forman B.M., Jiang Z. et al. Functional ecdysone receptor is a product of EcR and *Ultraspiracle* genes // *Nature*. 1993. V. 366. № 1. P. 476–479.
- Yu R.T., McKeown M., Evans R.M., Umesono K. Relationship between *Drosophila* gap gene *tailless* and a vertebrate nuclear receptor Tlx // *Ibid.* 1994. V. 370. № 6488. P. 375–379.
- Zera A.J., Tanaka S. The role of juvenile hormone and juvenile hormone esterase in wing morph determination in *Modicogryllus confirmatus* // *J. Insect Physiol.* 1996. V. 42. № 9. P. 909–915.
- Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Mazina O.M., Balasov M.L. Structure and expression of the br-c locus in *Drosophila melanogaster* (Diptera; Drosophilidae) // *Eur. J. Entomol.* 1995. V. 92. P. 263–270.
- Zhong W., Sladek F.M., Darnell J.E., Jr. The expression pattern of a *Drosophila* homolog to mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 3. P. 537–544.
- Zhou B., Riddiford L.M. Hormonal regulation and patterning of the broad-complex in the epidermis and wing of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* // *Devel. Biol.* 2001. V. 231. № 1. P. 125–137.

## Molecular-Genetic Mechanisms of the Effect of Developmental Hormones in Insects

© 2007 г. V. G. Mitrofanov

Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences,  
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

E-mail: vgmitro1936@mail.ru

Received April 18, 2006; in final form July 17, 2006

**Abstract**—A review of the available data on molecular mechanisms underlying the regulation of gene expression by the developmental hormone ecdysone and juvenile hormone. Heterodimer ESP/USP is the main ecdysone receptor in *D. melanogaster*. Structures similar to ESP/USP were found in other insects. The information about molecular-genetic mechanisms of the effect of juvenoids is less definite. It has been proposed that the juvenile hormone in insects is a modulator of the ecdysone effect.

**Key words:** ecdysone, juvenile hormone, *Drosophila*, insects, development.