

УДК 591

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ *t*-ГАПЛОТИПОВ У МЫШЕЙ¹

© 2009 г. Л. Д. Сафронова

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

119019 Москва, Ленинский пр-т, д. 33

E-mail: safronova@sevin.ru

Поступила в редакцию 03.03.2006 г.

Окончательный вариант получен 24.07.2008 г.

Описаны эффекты *t*-гаплотипов домашней мыши *Mus musculus* на морфологию зародышей. Летальные мутации, *t*-гаплотипы, в гомозиготах вызывают нарушения в эмбриогенезе и гибель зигот на разных стадиях развития, что обусловлено временем их действия в онтогенезе. Гибель обычно наступает в первом семестре беременности в период от стадии морулы до сформированного эмбриона (9–10 сут), причем нарушения эмбриогенеза и время их проявления характерны для определенного *t*-гаплотипа. Такие мутации анализировали, чтобы выявить генные продукты (белки), действие которых может нарушать развитие нервной системы. В *t*-комплексе обнаружены тандемные последовательности, которые кодируют регуляторные факторы, влияющие на экспрессию специфических структурных генов в нервных клетках мыши.

Ключевые слова: эмбриогенез мышей, *t*-комплекс, ген *Brachyury (Tail)*, *T*-боксы.

Исследование мутаций, влияющих на развитие, – это прежде всего анализ генов, позволяющий дать представление о взаимодействии различных процессов (действие генов в развитии). Эмбриогенез мыши представляет особый интерес, так как может служить модельной системой для изучения механизмов развития.

Особенно интересны в этом смысле *t*-комплексные мыши, на которых проведены многие исследования, посвященные генетическому контролю развития (Gluecksohn-Schoenhermer, 1944; Dunn, 1956; Gluecksohn-Waelsch, Erickson, 1970; Yanagisawa et al., 1981; Silver, 1985; Sugimoto et al., 2003).

t-Комплекс мыши представляет собой область в проксимальном районе IX группы сцепления 17-й пары хромосом, где насчитывается в настоящее время более 400 аллелей, фенотипически тестируемых по воздействию на форму хвоста (Dunn, 1956; Bennett et al., 1959; Spiegelman, Bennett, 1974; Bennett, 1975). Мутации локуса делятся на доминантные (*T*) и рецессивные (*t*). Доминантные мутации в сбалансированном состоянии (*T/+*) укорачивают хвост или изменяют его форму у мышей и имеют рецессивный летальный эффект: гомозиготы (*T/T*) летальны. Рецессивные мутанты в гетерозиготном состоянии фенотипически не отличаются от животных дикого типа *+/+*. У компаундов (*T/t*) в большинстве случаев хвост утрачивается. Точковые *T*-мутации представлены серией

аллелей или группой комплементации, в которых рецессивные (*t*-аллели) структурные мутации (хромосомные перестройки), занимающие район дистальнее *T*, фенотипически выявляются с помощью доминантной мутации *T* (Dunn, 1956; Bennett et al., 1976; Lyon, Mason, 1977).

Эта сложная генетическая система, локализованная в хромосоме 17 домашней мыши, впервые обнаружена Добровольской-Завадской (Dobrovolskaya-Zavadskaya, Kobozieff, 1927) и до сих пор является эффективной моделью для генетических и эволюционных исследований. *t*-Комплекс в наиболее общем виде можно рассматривать как серию микроаббераций по отношению к “дикому типу” организации хромосомы 17. Он представляет собой сложную комбинацию хромосомных перестроек (четыре неперекрывающиеся инверсии), занимающих проксимальную треть хромосомы, общей протяженностью около 20 сМ, т.е. примерно 0.7% всего генома домашней мыши *Mus musculus* (Fox et al., 1985; Herrmann et al., 1986).

Внутри этой области локализованы сайты, которые определяют разнообразное воздействие *t*-комплекса на эмбриональное развитие, сперматогенез, менделевское наследование, материнский эффект и поведенческие особенности, – все эти эффекты наследуются в большинстве случаев как единое целое благодаря наличию тесного сцепления генов (Демин, Сафронова, 1980; Dunn, 1956; Silver, 1985; Lyon, 2003). В результате сцепления генов, входящих в состав *t*-комплекса, и супрессии рекомбинации между входящими в состав

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 06-04-48866, 05-04-49926).

Основные нарушения эмбриогенеза и летальный период у гомозигот по *t*-гаплотипам домовый мыши

Группа комплементации	Летальный период	Основные нарушения эмбриогенеза
t^0	Стадия удлиненного цилиндра	Нарушение формирования экто- и мезодермы
t^{l2}	Стадии от морулы до ранней бластулы	Гибель нервных тканей
t^9	Стадия удлиненного цилиндра	Дезорганизация зародышевых листков
t^{w1}	Варьирует от 8-го до 19-го дней эмбриогенеза	Нарушение развития нервной трубки
t^{w5}	Стадия удлиненного цилиндра	Нарушение формирования экто- и мезодермы
t^{w73}	Стадия двух зародышевых листков	Нарушения развития трофэктодермы
t^{wPa-1}	Стадия удлиненного цилиндра	Дезорганизация трофобласта

этого комплекса инверсиями и соответствующими проксимальными фрагментами хромосомы 17, этот и другой геномный район H2 представляют собой генный комплекс, адаптивное значение которого для вида еще предстоит выяснить.

Рецессивные летальные мутации *t*-гаплотипов не однородны, но в зависимости от времени гибели зигот в эмбриогенезе объединяются в одну группу комплементации. При сочетании в зиготе гамет, несущих *t*-гаплотипы, летали которых принадлежат к одной и той же группе комплементации, эмбрионы погибают (таблица). В случае слияния гамет, гаплотипы которых принадлежат к разным группам комплементации, происходит взаимная компенсация летальных эффектов и, хотя число выживших сложных гетерозигот (компаундов) обычно ниже ожидаемого, они имеют нормальный фенотип (Bennett, 1975). К настоящему времени насчитывается до 16 групп комплементации и более 400 входящих в них *t*-гаплотипов (Klein, Hammerberg, 1977; Klein, 1992).

Можно отметить три стадии развития, на которых наиболее ярко проявляется активность *t*-комплекса и его влияние на фенотип: 1) эмбриогенез, в течение которого проявляется гомозиготная летальность *t*-гаплотипов; 2) ранний сперматогенез в тех случаях, когда гаплотипы комплементарны по выживаемости, но не по стерильности, и 3) мейоз, в течение которого предположительно осуществляется такая функция *t*-комплекса, как нарушение правильной передачи генетической информации (transmission distortion ratio).

Предполагается, что *t*-комплекс связан с контролем клеточных делений в онтогенезе (Bennett, 1975). Также вполне возможно, что он представляет собой довольно цельную и единую структуру, где группы комплементации характеризуются различными признаками (жизнеспособность, стерильность) (Hood et al., 1985). Нарушение переда-

чи информации связано с разными сайтами повреждения внутри *t*-комплекса. Гены стерильности и жизнеспособности не существуют как самостоятельные структурные единицы, и их функциональные различия связаны с тем, в какие взаимодействия вовлекается весь *t*-комплекс в ходе онтогенеза (Lyon, 2003).

Согласно предположению Мозер и Глюкшон-Вайлеш (Mozer, Gluecksohn-Waelsch, 1967), изучавших амфибий, в эктодерме эмбрионов осуществляется индукция подлежащей хордомезодермы, которую рассматривали как регуляторный фактор.

Одна из мутаций, локализованная в *t*-комплексе на хромосоме 17, приводит к развитию аномалий нервной системы в результате возможного нарушения эмбриональной индукции (Gluecksohn-Schoenhermer, 1940). Были проведены экспериментальные исследования с целью проанализировать эти мутации и определить продукты генов, которые могут быть причиной таких эффектов. Оказалось, что обнаруженные последовательности ДНК элементов *t*-комплекса кодируют регуляторные факторы, которые связаны с экспрессией специфических структурных генов в нервных клетках мыши. Такие мутации регуляторных генов характеризуются плеiotропными эффектами.

ВЛИЯНИЕ *t*-КОМПЛЕКСА НА МОРФОЛОГИЮ ЗАРОДЫШЕЙ

На рис. 1 представлена схема раннего эмбрионального развития мыши. Эктодерма удлиненного яйцевого цилиндра разделяет цилиндр на два района (эмбриональный и внезародышевый), которые отделяются неглубокой бороздой, и приблизительно на этой стадии *tcl*-гены оказывают летальные эффекты на эмбрион. Примерно в это же время проявляется действие гена *tcl*⁰.

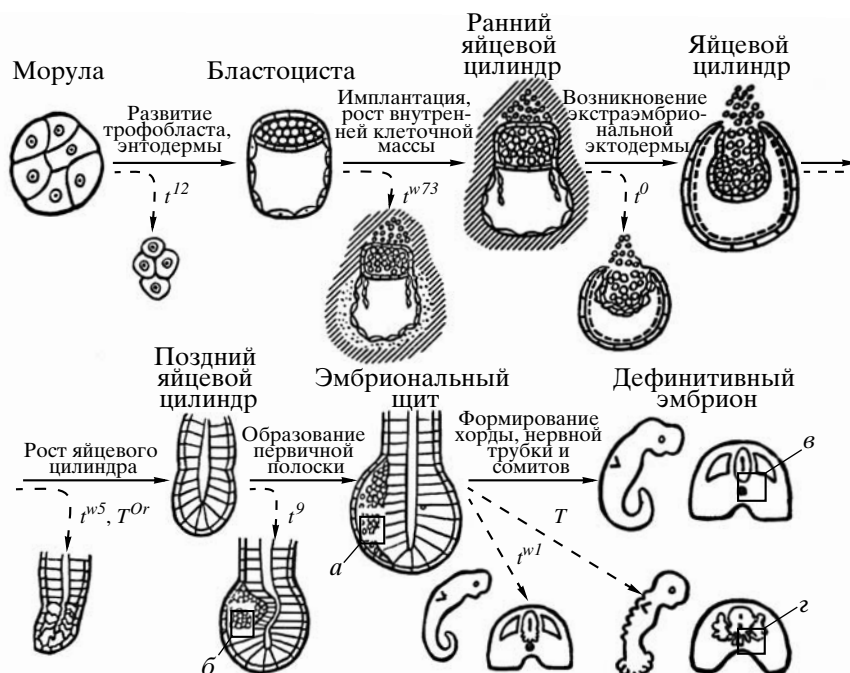


Рис. 1. Схема раннего эмбрионального развития мыши и нарушения, которые проявляются у гомозигот по летальным гаплотипам *T/t*-локуса (а–г – см. также на рис. 2); (---) – стадия летального эффекта, характерная для данной группы комплементации (по: Bennett, 1975, с изменениями).

У гомозигот tcl^0/tcl^0 внешняя клеточная масса не разделяется на два типа эктодермы, энтодерма как бы приподнимает недифференцированную эктодерму, клетки становятся пикнотичными, и эмбрион дегенерирует, резорбируется и погибает (Gluecksohn-Schoenhermer, 1940). Эмбрион tcl/tcl в возрасте около 126 ч развития отличается от нормального эмбриона и погибает через 40 ч, а его резорбция начинается примерно через 7 дней после оплодотворения. Оказалось, что ген *Tcl* первоначально воздействует на дифференцировку эктодермы (Bennett, 1964).

У нормального эмбриона яйцевой цилиндр продолжает развиваться до стадии удлинения и “впячивается” более глубоко в желточный мешок. У плода в возрасте около 6 дней в цилиндре образуется маленькая полость – сначала в эмбриональной, а позже в экстраэмбриональной эктодерме, – затем две полости сливаются, образуя проамниотическую полость. У эмбриональных гомозигот по tcl^{w5} дифференцировка далее не продолжается (Dunn, Bennett, 1958). У эмбрионов, которые не развиваются до стадии яйцевого цилиндра, клетки эмбриональной эктодермы начинают дегенерировать и сильно резорбируются, в то время как эмбрион сохраняет жизнеспособность

и может продолжать развитие еще 2–3 дня. Аномалии развития эмбриона tcl^{w5}/tcl^{w5} впервые становятся заметны на 6.5–7-й дни развития, а на 8–10-й дни эмбрион погибает. Оказалось, что tcl^{w5} в основном затрагивает дифференцировку эмбриональной эктодермы.

В ходе эмбриогенеза формирование первичной полоски находится под воздействием гена tcl^{w18} (Bennett, Dunn, 1960). У эмбриона tcl^{w18}/tcl^{w18} она простирается дальше, чем у нормального, и выпячивается как высокий гребень в проамниотическую полость, таким образом вызывая удвоение некоторых участков, особенно нервной трубки (гребень давит через среднюю линию нервной трубки и расщепляет ее пополам). Это первая аномалия, которая, как оказалось, может морфологически выявляться у эмбрионов tcl^{w18}/tcl^{w18} на 7-й день развития. Аномальные эмбрионы погибают на 8–11-й дни развития после оплодотворения. Сходный эффект был описан для факторов tcl^9 и tcl^{l8} (Mozer, Gluecksohn-Waelsch, 1967), которые принадлежат к тем же самым группам tcl^{w18} (9-я группа комплементации).

Развитие нервной трубки находится под воздействием гена tcl^{w5} (Bennett et al., 1959). Оказа-

лось, что у гомозигот tcl^{w5}/tcl^{w5} аномалии являются пикнотичными; происходит дегенерация вентральной области нервной трубки в задней части мозга, от которой дегенеративный процесс распространяется по продольной оси эмбриона в обоих направлениях. Процесс начинается на 9-й день и достигает пика к 11-му, причем приблизительно половина эмбрионов мыши находится под его воздействием, вторая же половина может пережить эти повреждения, но при этом уменьшается размер эмбрионов, наблюдаются гидро- и микроцефалия, хотя эмбрионы могут даже дожить до рождения.

Первичной мишенью гена *T*, возможно, является хорда (Chesley, 1935; Gluecksohn-Schoenherimer, 1940), потому что у большинства эмбрионов *T/T* хорда полностью отсутствует или значительно редуцирована. Гомозиготы *T/T* могут быть обнаружены примерно в возрасте 8.5 дней беременности по наличию пузырьков или сосудов, расположенных в основном в боковых производных нервной трубки, отходящей от главной оси. Пузырьки позже исчезают (на 11-й день), а сосуды остаются в нервной трубке и увеличиваются в размере, особенно в заднем конце тела эмбриона. Затем следует редукция заднего отдела тела эмбриона, в результате чего аллантоис не соединяется с организмом матери и эмбрион погибает примерно через 10.5 дней после оплодотворения.

Хорда оказывается под воздействием *T*-генов (Gluecksohn-Schoenherimer, 1944; Gluecksohn-Waelsch, Erickson, 1970), потому что главными аномалиями эмбрионов T^{ki}/T^{ki} являются не только нарушение развития продольной оси эмбриона, но и гиперплазия эмбриональной ткани, особенно нейральной эктодермы и мезодермы. Наибольшая дупликация эмбриональных осей может привести к полному разделению эмбрионов-близнецов или к формированию единственного эмбриона с двумя сердцами, двойным аллантоисом и даже двумя головами. Неконтролируемый рост эмбриональной ткани производит массу неорганизованной ткани шароподобной формы. Эмбриональная мембрана также сильно повреждается, и эмбрионы часто прикрепляются к наружной мембране. Эмбрионы T^r/T^r погибают между 8-м и 10-м днями после оплодотворения.

Гены *tcl* действуют последними и принадлежат к полулетальным группам (t^{w2} , t^{w8} , t^{w38} , t^{w40} и др.) (Dunn, Bennett, 1958). Свойства этих генов сходны, но неясно, являются ли они идентичными. Эмбриональные аномалии, вызванные полулетальными генами, могут быть различимы к 14-му дню развития, возможно, даже ранее. У гомозигот tsl/tsl

под действием этих генов находится головной мозг, особенно его передняя часть. В эмбрионе наблюдается отоцефалия (дефект развития нижней челюсти, приблизительно по направлению к ушным раковинам), тогда как акофалия и микроцефалия (отсутствие одного или двух глаз, одно или два глазных яблока аномальных размеров) наблюдаются реже. Большинство подверженных воздействию этих генов эмбрионов имеют также маленький размер и задерживаются в своем развитии. Выживаемость гомозигот tsl/tsl составляет от 51% для t^{w12} до 1.7% – для t^{w40} . Вероятно, полулетальные *t*-гаплотипы действуют на дифференцировку нейральной эктодермы. Можно предположить, что гены *tcl* являются многофункциональной группой летальных генов, действующих на эмбриональное и, возможно, даже на раннее постнатальное развитие. Единственной известной их особенностью является то, что они локализованы в центромерном районе хромосомы 17, однако механизм действия этих генов еще неизвестен. Необходимо также выяснить, действуют ли эти гены на все клетки или только на некоторые.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ *t*-КОМПЛЕКСА

В начале 1970-х гг. была сформулирована дифференциальная гипотеза (Gluecksohn-Waelsch, Erickson, 1970; Artzt, Bennett, 1975), согласно которой *t*-гены (*t*-комплекса), локализованные в прицентромерном районе хромосомы 17, вовлекаются в межклеточные взаимодействия и распознавание клеток на критических стадиях развития. Например, выяснилось, что гены t^{l2} контролируют дифференцировку внутренней клеточной массы и трофэктодермы (Dunn, 1956).

Беннетт (Bennett, 1975) предложила гипотезу действия *t*-мутаций (*t*-гаплотипов) на эмбриогенез мыши. Рассматривая эффект *t*-мутаций гомозигот, принадлежащих к разным группам комплексов, можно представить, как происходит блокировка последующих стадий развития. Вероятно, каждый *t*-гаплотип блокирует развитие на стадии, когда появляются новые межклеточные взаимодействия или межклеточные связи рвутся (рис. 2, 3). Согласно Беннетт, *t*-комплекс в норме контролирует развитие путем изменения свойств поверхностей клеток и таким образом приводит к образованию новых клеточных ассоциаций. Кроме того, каждый *t*-гаплотип у гомозиготных эмбрионов (t^x/t^x) нарушает развитие в течение первых 9 дней от стадии морулы с тремя зародышевыми листками до осевых структур.

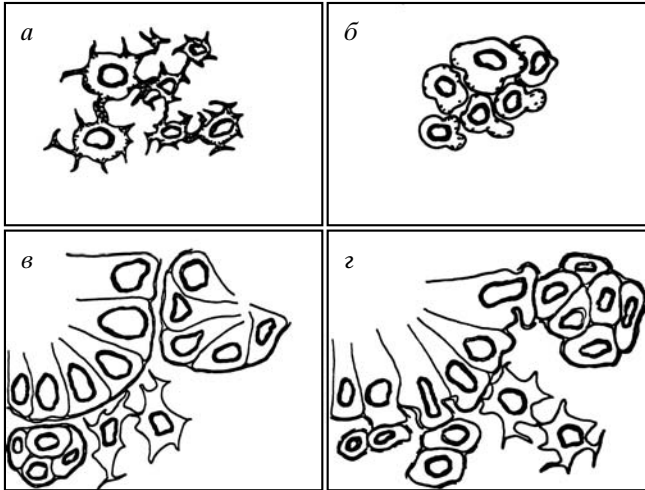


Рис. 2. Схема тонкой структуры аномальной мезодермы от 8-дневного t^9/t^9 -эмбриона (а) и нормальной мезодермы (б); аксиальных районов 9-дневной гомозиготы T/T (в) и нормального эмбриона (z) (по: Bennett, 1975, с изменениями).

Различные t -гаплотипы так же влияют на спермиогенез, поскольку гетерозиготные самцы переносят измененные гены (рецессивные мутации), которые затем вызывают развитие аномального потомства. Электронно-микроскопические данные свидетельствуют об изменении клеточных мембран, находящихся в “беспорядочном” состоянии. В сперматиде как внутренняя, так и внешняя поверхности мембраны оказываются аномальными. У мутантных эмбрионов наблюдается образование клеточных соединений – псевдоподий или выпячиваний (мембранозависимый феномен), субповерхностная микронитевая организация аномальных клеток нарушается. Предполагалось, что под действием t -гаплотипов эти аномальные поверхностные мембранные антигены становятся специфичными, действуя только в клетках зародышевых листков. В соответствии с гипотезой Беннетт, аномалии спермато- и спермиогенеза, как и многие другие аномалии эмбрионального развития, вызванные t -генами, явля-

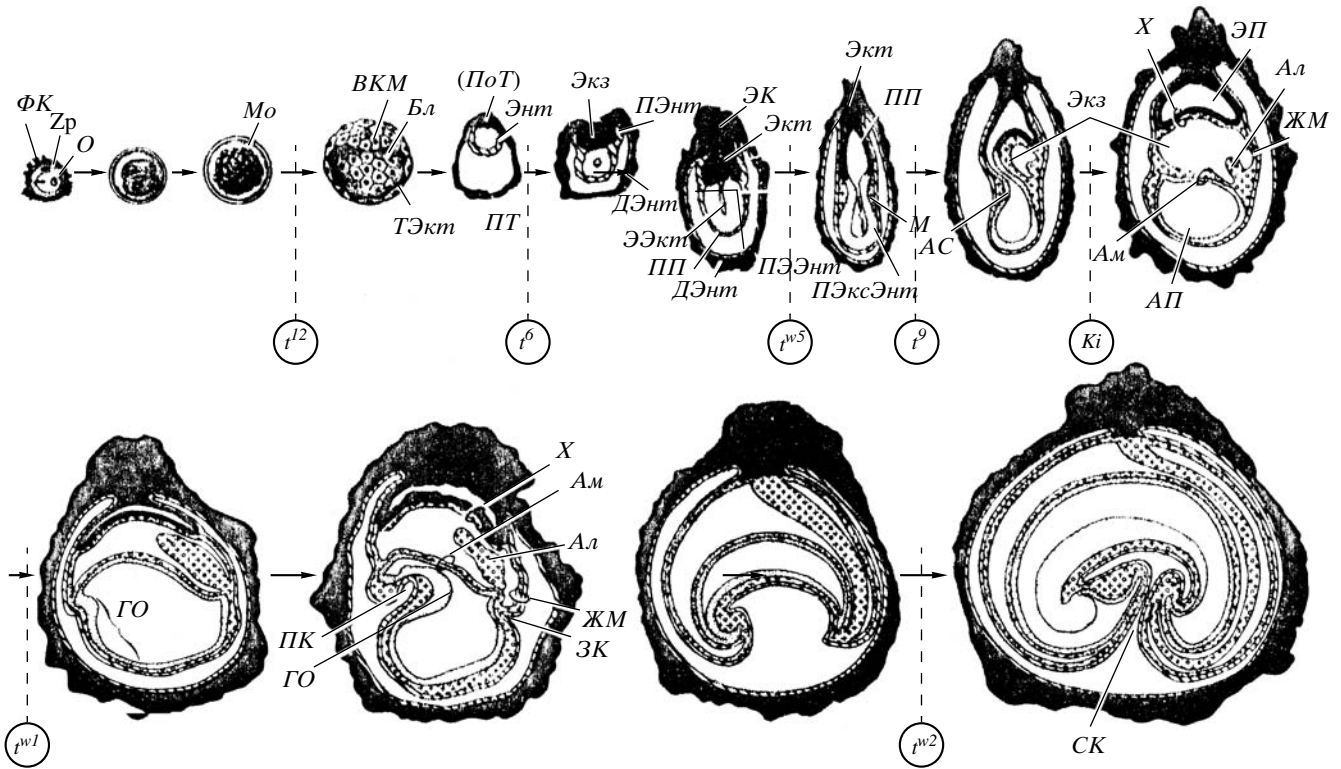


Рис. 3. Индивидуальные действия генов t -комплекса на определенных стадиях развития мыши.

АП – амниотическая полость; АС – амниотическая складка; Ал – аллантоис; Ам – амнион; Бл – бластоциста; Х – хорин; ДЭнт – дистальная энтодерма; ЭП – эктоплацентарная полость; Энт – энтодерма; Экт – эктодерма; ЭЭкт – эмбриональная эктодерма; ЭксЭкт – экстраэмбриональная эктодерма; ЭК – эктоплацентарный конус; Экз – экзоцелом; ПК – передняя кишка; ФК – фолликулярные клетки; ЗК – задняя кишка; ГО – головной отросток; ВКМ – внутренняя клеточная масса; М – мезодерма; СК – средняя кишка; Мо – морула; ПТ – пристеночный трофобласт; О – ооцит; ПП – проамниотическая полость; ПЭЭнт – проксимальная эмбриональная энтодерма; ПЭксЭнт – проксимальная экстраэмбриональная энтодерма; ПЭнт – проксимальная энтодерма; ПоТ – полярный трофобласт; Тэкт – трофэктодерма; ЖМ – желточный мешок; Зр – zona pellucida (по: Wudl, Sherman, 1976, с изменениями).

ются следствием специфических изменений в компонентах клеточной поверхности. Конечно, развитие генетически нормальных эмбрионов, особенно комплекс молекул клеточной поверхности, контролируется этими генами в ходе ранней дифференцировки.

Другая гипотеза (Ben-Shaul et al., 1983) основана на изучении погибших эмбрионов с помощью световой микроскопии и установлении причин нарушения морфогенеза. Оказалось, что ген t^{w5} контролирует дифференцировку внешней клеточной массы; такие взаимодействия существуют между молекулами клеточной поверхности и могут быть выявлены с помощью антител против этих молекул. Клетки *t*-гомозиготных эмбрионов имеют измененные поверхностные антигены; они не узнают другие клетки на некоторых стадиях развития, что вызывает нарушение нормального морфогенеза и гибель эмбриона.

Вудл и Шерман (Wudl, Sherman, 1976) задают вопрос: действуют ли эти гены во всех клетках или только в некоторых и являются ли разные гены (tcl^{l2} , tcl^0 , tcl^{w5}) общими клеточными летелями, которые при прямом действии вызывают гибель эмбриона, нарушая его основные жизненные процессы, например метаболизм. Так как эти процессы являются существенными для выживания всех клеток, их нарушение ведет к клеточной гибели. Оказалось, что при культивировании *in vitro* бластоцист tcl^{w5}/tcl^{w5} все клетки погибают приблизительно в одно и то же время. Если tcl^{w5} не все были клеточными летелями, то, по мнению авторов, некоторые клетки должны были бы жить дольше, чем другие.

Подобные результаты согласуются с данными, полученными в экспериментах по культивированию внутренней клеточной массы эмбрионов t^{w5}/t^{w5} (Hogan et al., 1980); по культивированию *in vitro* эмбрионов t^{l2}/t^{l2} (Minz, 1964); по культивированию *in vitro* эмбрионов t^6/t^6 (Wudl, Sherman, 1978), а также с результатами других исследователей. Мутантные и клетки дикого типа у химер ведут себя независимо друг от друга; в то время как мутантные клетки погибают, нормальные могут жить, несмотря на присутствие погибших клеток.

Другие исследователи считают, что гены *tcl* воздействуют только на эмбриональные клетки. Так, клетки *t/t*, не подвергшиеся воздействию этих генов, могут быть спасены и расти дальше стадии, при которой эмбрионы *t/t* погибают, иногда растут даже *in vivo*, а иногда как перевиваемые линии. Арцт и Беннетт (Artzt, Bennett, 1975) смогли получить опухоли у эмбрионов t^{w18}/t^{w18} путем их имплантации в эктопические сайты. Опухоли не содержали

производных мезодермы, которые у гомозигот t^{w18}/t^{w18} не развиваются, но их содержали дифференцируемые клеточные линии, происходящие от других зародышевых слоев.

Келли с соавт. (Kelly et al., 1979) даже получили перевиваемую линию клеток мезодермального происхождения у гомозиготных эмбрионов t^{w18} с помощью трансформации вируса SW40. Линии были способны к миобластической и адипоцитной дифференцировке. Это показывает, что эффект гена может быть выявлен с помощью SW40-трансформации.

Жакоб-Кочен и др. (Jakobs-Kochen et al., 1983) вырастили сомиты от эмбриона *T/T* в органной культуре и показали, что эксплантаты могут дифференцироваться в хрящ.

Магнусон с соавт. (Magnuson et al., 1982) использовали метод, разработанный Мартином (Martin, 1981), чтобы вырастить тотипотентные эмбриональные стволовые клеточные линии от бластоцист t^{w5}/t^{w5} . Эти исследователи с помощью культивирования внутренней клеточной массы этих бластоцист в среде, кондиционированной тератокарциномой, смогли выделить стабильно растущую линию. Когда они вводили эти клетки мышам *nu/nu*, то получали опухоли, содержащие недифференцированные стволовые клетки, так же как и дифференцированные производные всех первичных зародышевых листков, включая нервные, пигментные и клетки цилиндрического эпителия, мезодерму желточного мешка, хрящ, мышцы и соединительную ткань. Многие из этих клеток у эмбрионов t^{w5}/t^{w5} не формируются, потому что эмбрион погибает прежде, чем три зародышевых листка могут сформироваться.

В соответствии с представлениями Клайна (Klein, 1992), центромерная область хромосомы 17 мыши содержит ряд *t*-генов, которые непосредственно не экспрессируются в эмбриогенезе, однако могут вызывать метаболические и другие нарушения, приводящие к гибели эмбриона. Аллели генов дикого типа могут кодировать ферменты, гормоны или структурные белки, которые не управляют дифференцировкой, но требуются для создания клетки или ткани на некоторых стадиях развития. Так, например, показано (Patermiti, 1983), что хромосома t^{w73} кроме летального гена tcl^{w73} несет еще комбинированную недостаточность липазы (ген *cld*), которая приводит к гибели гомозигот *cld* вскоре после рождения. Гибель вызывается накоплением и слиянием маленьких частиц жира в сывотке крови, отсутствием капилляров, кровотечением в сердце, легких и печени, а также диффузным инфарктом. Эти гомозиготы погибали в течение 48 ч

после рождения. Указанные симптомы были описаны ранее как результат дефектной выработки двух энзимов – липопропротеина и печеночной триглицерид липазы (LPL и HTGL соответственно), которые представлены в капиллярах эндотелия большинства внепеченочных тканей (т.е. в сердце, мышцах и жировых тканях). Недостаточность выработки этих ферментов у человека приводит к гетеротриглицеродемии, которая наступает сразу же после потребления жирной пищи.

Барбияз с соавт. (Barbiaz et al., 1982) наблюдали, что при скрещиваниях $T^{hp}/+$ X $+/t^{w73}$ мыши не способны давать бесхвостое потомство T^{hp}/t^{w73} . При изучении гистологических препаратов авторы обнаружили аномальный класс эмбрионов, которые не способны имплантироваться между 6.5 и 7.5 днями развития и не отличимы от гомозигот t^{w73} . У этих особей хромосомы T^{hp} несут делецию в районе *tcl*, следовательно, ген *tcl* t^{w73} картирован в районе *tcl* и эмбрионы T^{hp}/t^{w73} погибают из-за того, что утрачивают функциональный гаплотип t^{w73} (таблица).

Гены *tcl* являются разнообразной группой летальных генов, проявляющих эффекты в эмбриональном и, возможно, даже в раннем постнатальном развитии. Их объединяет только локализация в прицентромерной части хромосомы 17 мыши. Точный механизм действия этих генов неизвестен.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ Т-БОКСГЕНОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Новое семейство транскрипционных факторов, Т-боксы, играет важную роль в развитии животных, это следует из гомологии ДНК-связывающих доменов *Brachyury* с продуктом гена Т-локуса. Филогенетические исследования показали, что это семейство генов, вероятно, появилось во время дивергенции Metazoa от общего предка. Т-боксы были идентифицированы в геноме различных позвоночных и беспозвоночных: *C. elegans*, *Drosophila*, морского ежа, асцидии, тритона, шпорцевой лягушки, данио (Papaioannou, Silver, 1998; Smith, 1999), а также у курицы и человека – и будут, возможно, обнаружены у всех животных.

Папаионноу и Силвер (Papaioannou, Silver, 1998) представили обзор исследований Т-боксов и их продуктов на различных модельных системах. Оказалось, что белки, кодируемые Т-боксами, играют роль триггеров в ходе онтогенеза. Показано, что Т-мутация является лишь небольшой составной частью семейства Т-боксов, которое наследуется сцепленно (Корж, 1998; Agulnik et al., 1996, 1998; Papaioannou, Silver, 1998; Papaioannou,

1999; Ruvinsky et al., 2000). Семейство Т-боксов играет важную роль в индукционных взаимодействиях на многих стадиях эмбриогенеза млекопитающих (Papaioannou, Silver, 1998; Papaioannou, 1999). Эти гены вовлечены в регуляцию развития различных клеточных линий и тканей, осевых структур и регуляторных сигналов и т. д.

Чампмен с соавт. (Champman et al., 1996) идентифицировали новые гены, характеризующиеся присутствием гомологичного района (продукта домена локуса *Brachyury* (Т)), названного Т-боксом, и новые мышечные гены, содержащие этот домен, получили название Т-бокс-1-6. У млекопитающих ген *Bra* регулирует дифференцировку туловищной мезодермы в ходе гастрюляции. Было показано, что ген мыши *Tbx-6* необходим для выбора между мезодермальным и нейральным путями дифференцировки (Champman, Papaioannou, 1998). Ген *Tbx-3* экспрессируется во внутренней клеточной массе бластоцист. Четыре гена из этого семейства экспрессируются в мезодерме и мезодерме-энтодерме в течение гастрюляции (*Tbx-1* и *Tbx-3-5*) и характеризуются высокоспецифичной экспрессией в позднем эмбриогенезе. В некоторых случаях наблюдали комплементарную экспрессию разных генов: например, в легочном эпителии (*Tbx-1*) и легочной мезодерме (*Tbx-2-5*), а также в почках (*Tbx-3*) и строме (*Tbx-2*).

В это же время Агульник с соавт. (Agulnik et al., 1996) идентифицировали пять Т-боксов мыши (*Tbx1-5*), которые были картированы на различных участках хромосом и экспрессировались в разные периоды эмбриогенеза. Авторы сообщили об открытии трех новых членов этого мышечного семейства – *Tbx-4*, *Tbx-5*, *Tbx-6*. Два из этих вновь открытых генов – *Tbx-4* и *Tbx-5* – были тесно сцеплены с Т-боксами. Авторы (Agulnik et al., 1998) ранее сообщали о неустановленных шести генах, экспрессирующихся в течение эмбриогенеза, и о новом гене семейства Т-боксов – *TBX15*. Этот ген продуцирует транскрипты размером 3.7 т.п.н. с открытой рамкой считывания, кодирующей полипептид с 602 аминокислотными остатками. Филогенетический анализ локализации сайтов гена *TBX15* выявил, что семейство Т-боксов включает также ген мыши *Tbx-1*. Затем картировали ген *Tbx-15* на 3-й хромосоме, положение которого – 49 сМ от центромеры. Транскрипты *Tbx-15* были впервые обнаружены примерно на 9-й день эмбрионального развития. Ген экспрессировался первоначально в черепно-лицевом районе и в развивающихся конечностях.

Сравнение геномов разных организмов обнаружило, что эволюция комплексов генов происходила не только путем нуклеотидных замеще-

ний, но скорее всего посредством интенсивных генных дупликаций (Haldane, 1922). В эти дупликации могли вовлекаться индивидуальные гены, небольшие хромосомные сегменты или целые геномы. Оно (1973) предположил, что этот процесс может играть особенно важную роль в эволюции хордовых. Сравнивая количество ДНК в ядрах разных видов животных, Оно отметил, что увеличение содержания ДНК сопровождалось переходом от беспозвоночных к примитивным хордовым и к позвоночным, и высказал предположение, что этот феномен можно объяснить двумя раундами дупликации целого генома (тетраплоидизацией). Недавно было установлено, что современные позвоночные имеют порядка 100 тыс. генов, в то время как беспозвоночные – всего около 15–20 тыс.

Изучение гена *TCTE1* семенников эмбриона мыши (Juneja et al., 1998) показало, что *t*-комплекс, связанный с экспрессией этого гена, кодирует новый специфический полипептид (*TCTE1*), который сохраняется при скрещивании разных видов. *TCTE1* необходим для оплодотворения и экспрессируется на ранних стадиях эмбриогенеза.

Найше с соавт. (Naiche et al., 2005) охарактеризовали действие *T*-боксенов в онтогенезе позвоночных. Роль огромного транскрипционного фактора генов развития, сохраненная этим семейством, приводит к детерминации. Представленные у всех Metazoa, *T*-боксены вовлечены в разделение разных эмбриональных клеток, регуляцию развития экстраэмбриональных структур, эмбриональных паттернов и во многие аспекты органогенеза. У человека мутации *T*-боксенов ответственны за развитие полового диморфизма, некоторые из генов этого семейства участвуют в неопластических процессах. В настоящее время показано, что *t*-комплекс, локализованный в прицентромерном районе хромосомы 17, содержит генетическую информацию, необходимую для эмбрионального развития. Чао и др. (Chao et al., 2003) скрещивали мышей линий De (117) и T (7J) в различных комбинациях для идентификации и картирования гена, необходимого для нормального течения эмбриогенеза. Было установлено положение перекрывающейся делеции в *T*-локусе – D17 Aus 9(df 10J), D17 Aus 9(df 13J). Полученные результаты показали, что имеются по крайней мере две функциональные единицы внутри района D17 размером 1 сМ. Мутация Aus 9117J1 является предимплантационной и летальной внутри района хромосомы, делетированного в D17 Aus 9(df 13J). Мутантные эмбрионы гибнут приблизительно через 10.5 сут, а их развитие характеризуется дефектной осевой ротацией, аномальной структурой хорды и сердца.

Несмотря на обилие гипотез, механизмы действия генов *t*-комплекса остаются неясными, кроме уже доказанного факта: они влияют на определенные этапы эмбрионального развития животных (в частности мышей). Пока лишь установлено, что эти гены кодируют поверхностные белки клеток, участвующих в нормальной дифференцировке. Очень важным аспектом исследования является получение мутаций каждого конкретного гена этого семейства. В настоящее время уже проводятся работы по клонированию различных генов *t*-комплекса (Lyon, 2003). Только сочетание разных подходов – иммунологического, мутационного и молекулярного – приведет к пониманию механизмов действия этих генов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Демин Ю.С., Сафронова Л.Д. Генетика локуса *T* домашней мыши (*Mus musculus* L.) // Успехи современной генетики. 1980. Т. 9. С. 97–142.
- Корж В.П. Множественная роль генов *Xenopus* у позвоночных: данные анализа мутаций // Онтогенез. 1998. Т. 29. № 5. С. 329–334.
- Оно С. Генетические механизмы эволюции. М.: Мир, 1973.
- Agulnik S., Garvey N., Hancock S. et al. Evolution of mouse *T*-box genes by tandem duplication and cluster dispersion // Genetics. 1996. V. 44. № 1. P. 249–254.
- Agulnik S.I., Papaioannou V.E., Silver L.M. Cloning, mapping, and expression analysis of *TBX15*, a new member of the *T*-Box gene family // Ibid. 1998. V. 51. № 1. P. 68–75.
- Artzt K., Bennett D. Analogies between embryonic (*T/t*) antigens and adult major histocompatibility (H-2) antigens // Nature. 1975. V. 256. P. 518–547.
- Barbiaz B., Garrisi G.J., Bennett D. Genetics analysis of the *t^{w73}* haplotype of the mouse using deletion mutations: evidence for a parasitic lethal mutation // Genet. Res. 1982. V. 39. P. 11–120.
- Bennett D. Abnormalities association a chromosome region in the mouse. II. The embryological effects of lethal alleles at the *t*-region // Science. 1964. V. 3661. P. 263–267.
- Bennett D. *T*-locus of the mouse // Cell. 1975. V. 6. P. 441–454.
- Bennett D., Dunn L.C. A lethal mutation (*t^{w18}*) in the house mouse showing partial duplication // J. Exp. Zool. 1960. V. 143. P. 203–219.
- Bennett D., Dunn L.C., Basenhansen S. The embryological effects of four late lethal *t*-alleles in the mouse // J. Morphol. 1959. V. 195. P. 105–143.
- Bennett D., Dunn L.C., Artzt K. Genetic change in mutations at the *T/t* locus in the mouse // Genetics. 1976. V. 83. P. 361–372.
- Ben-Shaul Y., Artzt K., Bennett D. Immunoscanning electron microscopy of antigenic determinants of *T/t*-complex (*t^{w18}*) mouse embryos // Cell Differ. 1983. V. 13. № 2. P. 159–170.

- Chapman D.L., Papaioannou V.E. Three neural tube in mouse embryos with mutations in the *T*-box gene *Tbx6* // Nature. 1998. V. 391. P. 695–697.
- Chapman D.L., Garvey N., Hancock S. et al. Expression of the *T*-box family genes, *Tbx1-Tbx-5*, during early mouse development // Development. 1996. V. 206. № 4. P. 379–390.
- Chao H.H., Mentzer S.E., Schimenti J.C., You Y. Overlapping deletions define novel embryonic lethal loci in the mouse *t*-complex // Genesis. 2003. V. 35. P. 133–142.
- Chesley P. Development of the short-tailed mutant in the house mouse // J. Exp. Zool. 1935. V. 70. P. 429–459.
- Dobrovolskay-Zavadskay N., Kobozieff N. Sur la reproduction des souris anoures // Comp. Rend. Soc. Biol. 1927. V. 97. P. 116–118.
- Dunn L.C. Analysis of a complex gene in the house mouse // P. Quant. Biol. 1956. V. 21. P. 187–195.
- Dunn L.C., Bennett D. Effects on embryonic development of a group of genetically similar lethal alleles derived from populations of wild house mice // J. Morph. 1958. V. 103. P. 135–158.
- Fox H.S., Martin G.R., Lyon M. et al. Molecular probes define different regions of the mouse *t*-complex // Cell. 1985. V. 40. P. 63–69.
- Gluecksohn-Schoenhermer S. The effect of an early lethal embryos (to)in the house mouse // Genetics. 1940. V. 25. P. 391–400.
- Gluecksohn-Schoenhermer S. The development of normal and homozygous brachy (*T/T*) mouse embryos in the extraembryonic coelom of chick // PNAS USA. 1944. V. 30. P. 134–140.
- Gluecksohn-Waelsch S., Erickson R.P. The *T*-locus of the mouse: Implication for mechanisms of development // Curr. Top. Devel. Biol. 1970. V. 5. P. 281–316.
- Haldane J.B.C. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals // Genetics. 1922. V. 7. P. 101–109.
- Herrmann B., Bucan M., Mains P.E. Genetic analysis of the proximal part of the mouse *t* complex: evidence for a second inversion within *t*-haplotypes // Cell. 1986. V. 44. P. 469–476.
- Hogan B., Spiegelman M., Bennett D. *In vitro* development of inner cell masses isolated from t^0/t^6 and t^{w5}/t^{w5} mouse embryos // J. Embryol. Exp. Morphol. 1980. V. 60. P. 419–428.
- Hood J.H., Campbell S.C., Elgin R. The organization, expression and evolution of antibody genes and other multigen // Ann. Rev. Genet. 1985. V. 9. P. 303.
- Jacobs-Cohen R.J., Spiegelman M., Bennett D. Abnormal of cells and extracellular matrix of *T/T* embryos // Cell Differ. 1983. V. 25. № 1. P. 48–55.
- Juneja R., Agulnik S., Silver L.M. Sequences divergence with the sperm-specific polypeptide TCTE1 is correlated with species-specific differences in sperm binding to zone – intact eggs // J. Androl. 1998. V. 19. № 2. P. 183–188.
- Kelly F., Guenet J., Condamine H. Karyologically undetected homozygous t^{w18} embryos: extruterine growth properties and transformation by SV40 // Cell. 1979. V. 16. P. 919–927.
- Klein J. Polymorphism distinguishing different mouse *t*-haplotypes // Genet. Res. 1992. V. 60. P. 43–52.
- Klein J., Hammerberg G. The control differentiation by the *t*-complex // Immunol. Rev. 1977. V. 33. P. 70–104.
- Lyon M.F. Transmission ratio distortion in mice // Ann. Rev. Genet. 2003. V. 37. P. 393–408.
- Lyon M., Mason I. Information on the nature *t*-haplotypes from the interaction of mutant haplotypes in male fertility and transmission ratio // Genet. Res. 1977. V. 29. P. 255–268.
- Magnuson N., Epstein Ch., Silver L., Martin G. Pluripotent embryonic stem cell lines may be derived from t^{w5}/t^{w5} blastocysts // Nature. 1982. V. 298. P. 750–753.
- Martin G.R. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // PNAS. 1981. V. 78. P. 7634–7638.
- Mintz B. Formation of genetically mosaic mouse embryos and early development of lethally (t^{l2}) // J. Exp. Zool. 1964. V. 157. P. 273–284.
- Mozer G.C., Gluecksohn-Waelsch S. Developmental genetics of a recessive allele at the complex *T*-locus in the mouse // Devel. Biol. 1967. V. 16. P. 564–576.
- Naiche L.A., Harrelson Z., Kelly R.G., Papaioannou V.E. *T*-box genes in vertebrate development // Ann. Rev. Genet. 2005. V. 39. P. 219–239.
- Papaioannou V.E. The ascendancy of developmental genetics, or how the *T*-complex educated a generation of developmental biologist // Ibid. 1999. V. 151. P. 421–425.
- Papaioannou V.E., Silver L.M. The *T*-box family // BioEssays. 1998. V. 20. P. 9–19.
- Patermiti J.R. Combined lipase deficiency: a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse // Science. 1983. V. 221. № 4606. P. 167–169.
- Ruvinsky I., Silver L.M., Gibson-Brown J.J. Phylogenetic analysis of *T*-Box genes demonstrates the importance of amphioxus for understanding evolution of the vertebrate genome // Genetics. 2000. V. 156. P. 1249–1257.
- Silver L.M. Mouse *t*-haplotypes // Ann. Rev. Genet. 1985. V. 19. P. 179–208.
- Smith J. *T*-box genes: what they do and how they do it // TIG. 1999. V. 15. № 4. P. 154–158.
- Spiegelman M., Bennett D. Fine structural study of cell migration in the early mesoderm of normal mutant mouse embryos *T*-locus t^0/t^{6h} // J. Embryol. Exp. Morphol. 1974. V. 32. P. 723–738.
- Sugimoto M., Karashima Y., Abe K. et al. Tetraploid embryos rescue the early defects of t^{w5}/t^{w5} mouse embryos // Genetics. 2003. V. 4. P. 162–171.
- Wudl L.R., Sherman M.I. *In vitro* studies of mouse embryos bearing mutations at the *T*-locus: t^{w5}/t^{l2} // Cell. 1976. V. 9. P. 523–531.
- Wudl L.R., Sherman M.I. *In vitro* studies of mouse embryos bearing mutations at the *T*-complex: t^6 // J. Embryol. Exp. Morphol. 1978. V. 48. P. 127–151.
- Yanagisawa K.O., Fujimoto H., Urushihara H. Effect of the *Brachyury* (*T*) mutation on morphogenetic movement in the mouse embryo // Devel. Biol. 1981. V. 8. P. 242–248.

Embryonal Effects of *t*-Haplotypes in Mice

L. D. Safronova

Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119019 Russia
e-mail: safronova@sevin.ru

Abstract—The effects of *t*-haplotypes on embryonic morphology in house mouse *Mus musculus* were described. Lethal mutations, *t*-haplotypes, in homozygotes induce abnormal embryogenesis and zygotic death at different developmental stages, which depends on the time of their action in ontogeny. Death commonly occurs in the first semester of pregnancy from the morula to the mature embryo stage (day 9–10), and the embryogenetic abnormalities and their timing were specific for each *t*-haplotype. Such mutations were analyzed to identify the gene products (proteins) affecting the nervous system development. The *t*-complex proved to contain tandem repeats coding for regulatory factors modulating the expression of specific structural genes in mouse neurons.

Key words: mouse embryogenesis, *t*-complex, *Brachyury (Tail)* gene, *T*-box genes.