

УДК 591 : 593.773.4 : 575.1

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ *ss* И *CG5017* В ПРОЦЕССЕ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА КОНЕЧНОСТЕЙ *Drosophila melanogaster*¹

© 2010 г. Б. А. Кузин, Е. А. Модестова*, Ю. Е. Воронцова, О. Г. Зацепина**, А. С. Микаелян, М. В. Слезингер, О. Б. Симонова

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

*Институт биологии гена РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

**Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта

119334 Москва, ул. Вавилова, д.32

E-mail: kuzinB@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.02.10 г.

Окончательный вариант получен 18.03.10 г.

Исследовали влияние *P*-элемента, встроенного в район гена *CG5017*, на проявление мутации гена *spineless* (*ss*). Показано, что инсерция *P*-элемента понизила уровень транскрипции *CG5017* примерно в два раза. При помощи модуляции уровня транскрипции гена *CG5017* впервые продемонстрировано его влияние на фенотипическое проявление мутации гена *ss*, что показывает их взаимодействие в процессе регуляции морфогенеза конечностей *Drosophila melanogaster*.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, гены *spineless* (*ss*) и *CG5017*, тарзус, ариста, шаперон.

Конечности насекомых формируются из эпителиальных структур. У насекомых с полным превращением они называются имагинальными дисками. Основные знания о генетической регуляции морфогенеза конечностей у насекомых были получены в результате исследования развития *Drosophila melanogaster*. Это обстоятельство определило наш выбор объекта для исследования регуляции морфогенеза дистальных структур конечностей насекомых, результаты которых изложены ниже. Рассматриваемые в статье данные имеют вполне конкретное значение в отношении процесса развития дрозофилы и довольно общее по отношению к остальным представителям класса насекомых.

Идентификация, а следовательно, приобретение морфологических и функциональных особенностей конечностей насекомых реализуется в результате экспрессии генов, контролирующих последовательное прохождение особью эмбриональной, личиночной и куколочной стадий развития. По мере их прохождения формируются переднезадняя и спинно-брюшная оси развития эмбриона. Затем происходит его сегментация и определение головного, грудного и брюшного отделов. Их границы в

большой степени определяются паттерном экспрессии генов, принадлежащих двум комплексам: *Antennapedia* (*ANT-C*) и *Bithorax* (*BX-C*). Каскад экспрессии генов *engrailed* (*en*), *hedgehog* (*hh*), *decapentaplegic* (*dpp*) и *wingless* (*wg/Wnt*) определяет переднезаднюю и спинно-брюшную ориентацию клеток внутри сегментов, а также паттерн экспрессии генов *Distal-less* (*Dll*) и *homothorax* (*hth*), чья экспрессия в имагинальных дисках необходима для формирования дистально-проксимальной оси сегментов ножных и антенных конечностей (Cohen, Jürgens, 1989; Diaz-Benjumea et al. 1994; Brook, Cohen, 1996; Lecuit, Cohen, 1997; Abu-Shaar, Mann, 1998; Wu, Cohen, 1999).

Гены *Dll* и *hth* регулируют гены-мишени, определяющие специфичность антенных и ножных структур во время личиночного периода развития. Мутации по одному из них – *spineless* (*ss*) – способны вызывать нарушение развития щетинок, дендритных структур нейронов, дистальных структур ноги и гомеозисную трансформацию дистальных структур антенны в тарзальные структуры ноги (Кузин и др., 1991; Balkashina, 1929; Grigliatti, Suzuki, 1971; Struhl, 1982; Crew, Brenman, 2006; Kim et al., 2006). Как выяснилось, ген *spineless* кодирует гомолог белка млекопитающих, который содержит структурный ДНК-связывающий домен bHLH-PAS и является диоксиновым рецептором. Этот белок вместе с белком Tango – гомологом транслокатора диокси-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 10-04-01120-а, 08-04-01768а) и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН “Биологическое разнообразие” (подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”).

Последовательности использованных зондов и праймеров

Название праймера/гена	Индивидуальный номер мРНК	Последовательности зондов и праймеров
Pry1	NM_143335	5'-CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT-3'
Pry2		5'-CTTGCCGACGGGACCACCTTATGTTATT-3'
1SS		5'-GCCCCGAAAACCTTACGGAAGG-3'
4SS		5'-TGTACACTAGGTTGCTGCTC-3'
<i>CG5017</i>		5'-AAATCAAGAGCCGTCGTTCTTTG-3' 5'-TTCTTCTCGCCGCCGCTTTTGCCA-3' 5'-GTCACAGTAGTTGGGGTCAAGG-3'
<i>RpL32</i>	NM_170461	5'-CCAGCATAACAGGCCCAAGATC-3' 5'-CGCACCAAGCACTTCATCCGCCAC-3' 5'-ACGCACTCTGTTGTCGATACC-3'
<i>ss</i>	NM_057400	5'-CGAAGGCGACGCAACGG-3' 5'-AGCCTGAAGCCGCCGCCAAG-3' 5'-GATGCCGCTTTGATGGATTGC-3'

нового рецептора в ядро – образует гетеродимер, который обладает активностью транскрипционного фактора (Duncan et al., 1998; Emmons et al., 1999). Фенотипическое проявление некоторых *ss*-мутантных аллелей зависит от воздействия окружающей среды (Grigliatti, Suzuki, 1971; Kuzin et al., 1997). Это обстоятельство позволяет предполагать возможность взаимодействия гена *ss* с другими генами в процессе контролируемой им регуляции развития структур дрозофилы. С целью выявления таких генов ранее мы выполнили скрещивания мутантных мух из линии *ss^{a40a}* с мухами супермутagenной дисгенной линии *w oc/FM4*. В потомстве от этого скрещивания мы выделили линию *ss^{aSc}* с усиленным фенотипическим проявлением мутации *ss^{a40a}* (Кузин и др., 1991). Результаты молекулярно-генетического анализа этой линии мы приводим в настоящей публикации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали линии мутантных (*ss^{aSc}*, *ss^{a40a}*) и диких (Oregon R) мух. Выделение и очистку ДНК и РНК осуществляли из личинок 3-го возраста. Для определения области локализации *P*-элемента в геноме мух был применен метод обратной полимеразной цепной реакции (инверс-ПЦР) с использованием протокола Berkeley *Drosophila* Genome Project (<http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>). Выделение геномной ДНК производили по стандартному протоколу (Gross-Bellard et al., 1973). Для определения области встраивания *P*-элемента геномную ДНК подвергали ферментативной обработке рестриктазами *Sau3A* и *HinP1* (“Fermentas”, Литва) с последующим лигированием ДНК-лигазой I (“Fermentas”, Литва) и постановкой ПЦР (“Силекс”, Россия) с применением специфических прямых (Pry1) и обратных (Pry2) праймеров (таблица). В результате ПЦР-амплификации мы

получили фрагменты ДНК, длина которых составляла около 800 п.о. (в случае обработки *Sau3A*) и около 600 п.о. (в случае обработки *HinP1*). Каждый из фрагментов ДНК был секвенирован и проанализирован с помощью компьютерной программы “DNA-STAR” и баз данных (BDGP, UCSC, Blast и др.).

Выделение тотальной РНК (тотРНК) осуществляли с помощью реактива TRI[®] Reagent (“Sigma”, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Для исключения контаминации образцов геномной ДНК тотРНК подвергали ферментативной обработке ДНКазой I (“Ambion”, США). Синтез кДНК проводили на 5–10 мкг тотРНК, используя набор реактивов для синтеза кДНК с олиго-dT (“Силекс”, Россия). Уровень экспрессии генов оценивали по изменению уровня мРНК с помощью постановки ПЦР в реальном времени на ДНК-амплификаторе ABI Prizm 7500 (“Applied Biosystem”, США), используя набор реактивов и специфических праймеров и зондов (“Синтол”, Россия) (таблица). Для нормализации ПЦР в качестве эндогенного контроля использовали ген *RpL32*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мутантные мухи линии *ss^{aSc}* отличаются от особей исходной линии *ss^{a40a}* более выраженной трансформацией дистальных частей антенны в тарзус, слиянием тарзальных сегментов, мультипликацией зубцов полового гребешка (Sex comb – Sc) первой ноги у самцов и уменьшением щетинок. Так как скрещивание с мухами дисгенной линии *w oc/FM4* индуцирует мутагенез, вызванный перемещениями мобильного генетического *P*-элемента, мы предположили, что усиление фенотипического проявления мутации *ss^{a40a}* вызвано внедрением *P*-элемента либо в локус *ss*, либо в локус гена, с которым *ss* взаимодействует. Для проверки нашего предположе-

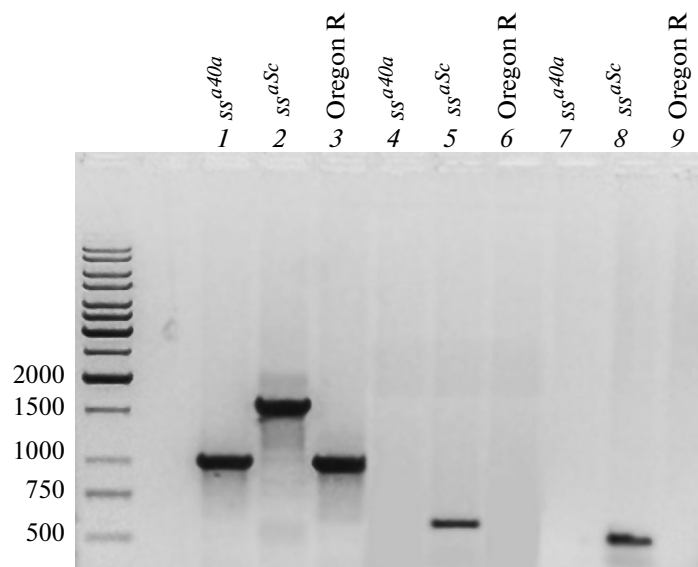


Рис. 1. Электрофорез ПЦР-продуктов, полученных при амплификации геномной ДНК из линий *ss^{a40a}*, *ss^{aSc}* и Oregon R праймерами: 1SS-4SS (1–3); 1SS-Pry1 (4–6) и 4SS-Pry2 (7–9). Праймеры 1SS-4SS идентичны геномной ДНК и расположены по краям встроившегося *P*-элемента; видно, что в линии *ss^{aSc}* (2) произошло встраивание участка *P*-элемента, о чем свидетельствует увеличение молекуляр. массы синтезированного фрагмента. ПЦР с парами праймеров из геномной ДНК и концами *P*-элемента (1SS-Pry1 и 4SS-Pry2) подтверждает встраивание *P*-элемента в линию *ss^{aSc}* (5, 8).

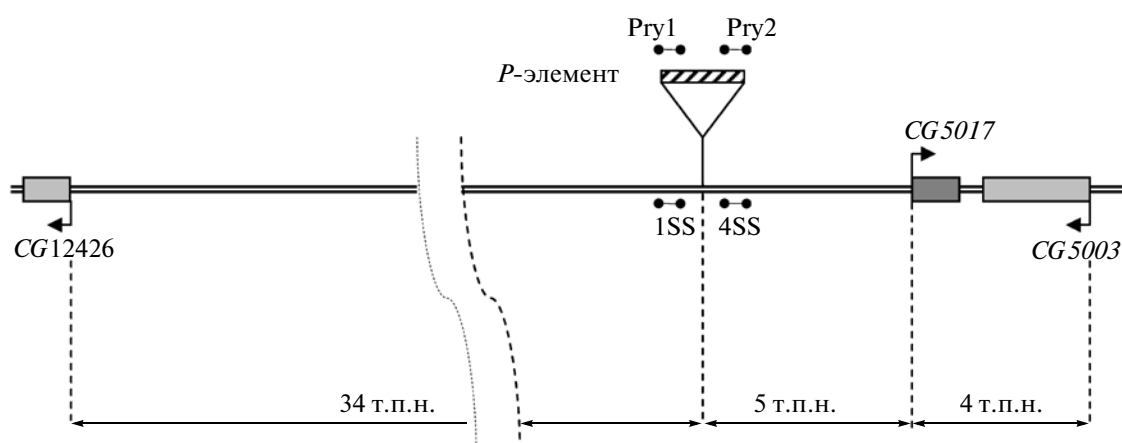


Рис. 2. Участок геномной карты третьей хромосомы в районе гена *CG5017* с обозначенным местом встраивания *P*-элемента (**zz**) и праймерами, используемыми в ПЦР-экспериментах.

ния мы воспользовались методом обратной ПЦР с использованием прямых и обратных праймеров, комплементарных районам *P*-элемента. Анализ амплифицированных независимых фрагментов, содержащих *P*-элемент, показал, что он находится в правом плече 3-й хромосомы в цитологическом районе 98B5 (внутри геномной последовательности **23731782-tcgaatgaatgtgtgccac-23731801**). Для уточнения локализации встроеного *P*-элемента мы подобрали праймеры для ПЦР, выбранные из области первичной локализации встраивания *P*-элемента. ПЦР выполнена с геномной ДНК, выделенной из мух линий *ss^{a40a}* и *ss^{aSc}* (рис. 1). На рисунке видно, что ПЦР-фрагмент, полученный на основе ДНК

мух линии *ss^{aSc}*, имеет большую молекулярную массу, чем из исходной линии *ss^{a40a}*, что свидетельствует о наличии в нем вставки *P*-элемента. После определения первичной нуклеотидной последовательности фрагмента была установлена точная локализация *P*-элемента (**23731782-tc↑gcaatgaatgtgtgccac-23731801** – место встраивания обозначено стрелкой).

Согласно геномной карте *D. melanogaster*, ближайшим к месту встраивания *P*-элемента является ген *CG5017*. Он расположен на расстоянии 5 т.п.н. от начала его транскрипции (координаты гена **CG5017 – 3R:23738169..23739505**) (рис. 2). Упоминаемые в компьютерной базе данных

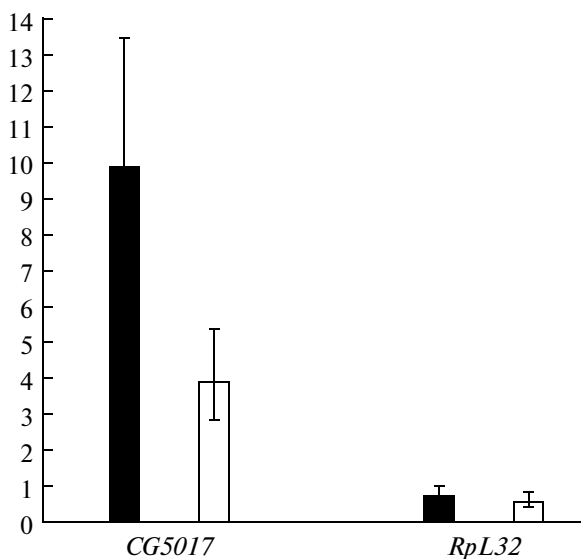


Рис. 3. Сравнительная характеристика экспрессии гена *CG5017* в линиях *ss*^{40a} и *ss*^{Sc}. Результаты ПЦР в реальном времени, предпринятой для оценки уровня транскрипции гена *CG5017* у личинок 3-го возраста в линиях *ss*^{40a} и *ss*^{Sc}, представленные в графической форме. Уровень относительной флуоресценции, отражающий количество продукта реакции, наработанного на основе мРНК, которая выделена из личинок линий *ss*^{40a} (■) и *ss*^{Sc} (□). Видно, что количество продукта гена *RpL32* в обеих линиях примерно одинаково, в то время как продукта гена *CG5017* в личинках линии *ss*^{40a} примерно в два раза больше.

(www.flybase.org) сведения об этой области генома говорят о ее слабой изученности и об отсутствии там данных о мутации с похожим фенотипическим проявлением. Мутаций гена *CG5017* с видимым фенотипическим проявлением на данный момент вообще не обнаружено. Таким образом, либо *P*-элемент в линии *ss*^{Sc} не имеет никакого отношения к усилению признаков, либо район его инсерции является регуляторной областью гена *CG5017*, мутации которого проявляются лишь при создании конкретных условий, например, на фоне подавления экспрессии генов-мишеней белка *CG5017*. Поэтому мы оценили влияние встроенного *P*-элемента на уровень транскрипции гена *CG5017*, используя ПЦР в реальном времени. Анализ полученных результатов показал, что уровень транскрипции гена *CG5017* в исходной линии *ss*^{40a} в два раза выше, чем в линии *ss*^{Sc} (рис. 3).

Обнаруженная разница в уровне транскрипции гена *CG5017* явилась основанием для предположения о влиянии уровня его транскрипции на фенотипическое проявление мутации гена *ss*. Для проверки этого предположения мы путем скрещивания ввели в геном мух линии *ss*^{Sc} мутацию гена *polyhomeotic* (*ph^{p1}*), кодирующую химерный белок P-Ph (Belenkaya et al., 1998). Этот белок имеет домен, обладающий транспозазной активностью, что позво-

ляет ему связываться с последовательностями *P*-элементов (*P*), и домен белка Polyhomeotic (*Ph*), который привлекает к месту локализации *P*-элемента остальные белки группы Polycomb, чья функция заключается в модификации гистонов и локальной конденсации участков хроматина. В результате подавляется любая транскрипция возле района инсерции *P*-элемента (Модестова и др., 2003). После внедрения мутации *ph^{p1}* в геном линии *ss*^{Sc} жизнеспособность мутантных мух существенно понизилась и резко усилилось фенотипическое проявление мутации гена *ss* (рис. 4). Эти результаты свидетельствуют о значении уровня транскрипции гена *CG5017* для регулируемых геном *ss* процессов формирования дистальных структур ноги и антенны, а также, возможно, о прямом контакте продуктов этих генов в организации транскрипционных комплексов, задействованных в процесс регуляции морфогенеза у *Drosophila*.

Предпринятые нами поиски генов, взаимодействующих с *ss* в процессе регуляции морфогенеза ножных и антенных структур, привели к гену *CG5017*. В научном мире о нем известно немного. В базе данных FlyBase, содержащей сведения о геноме дрозофилы, есть информация о структуре предположительного белкового продукта гена *CG5017*. Его открытая рамка считывания кодирует белок, состоящий из 283 аминокислот, подавляющая часть которых (от 46 до 252) формирует домен, гомологичный белкам суперсемейства NAP (Nucleosome assembly protein), участвующим в транспорте гистонов в ядро клетки и в сборке нуклеосом (Park, Luger, 2006). Эти белки относят к шаперонам, ассоциированным с нуклеосомами (Rodriguez et al., 1997). У дрозофилы известны две мутации по этому гену, которые не демонстрируют морфологические нарушения, но обнаруживают признаки его вовлеченности в механизмы регуляции поведения и вызывают нарушение памяти (Anholt, Mackay, 2001; Dubnau et al., 2003). Выявленное нами взаимодействие генов *ss* и *CG5017* не вызывает сомнений в его реальности и логичности. По-видимому, в основе таких взаимодействия лежат функциональные особенности кодируемых ими белков. Как было сказано выше, белок *Ss* вместе с белком Tango участвует в формировании транскрипционного комплекса, поэтому вполне уместно участие нуклеотропного шаперона *CG5017* в механизме функционального обеспечения работы транскрипционного комплекса. Одним из итогов такого взаимодействия можно считать формирование дистальных структур конечностей. На примере дрозофилы мы увидели, что степень соответствия морфологии ножных и антенных структур изначальному плану их строения зависит от уровня экспрессии генов *ss* и *CG5017*. Модуляция уровня экспрессии обоих генов содержит высокий потенциал влияния на морфогенез антенных и ножных структур. От уровня экспрессии этих генов зависит соответствие дистальных структур

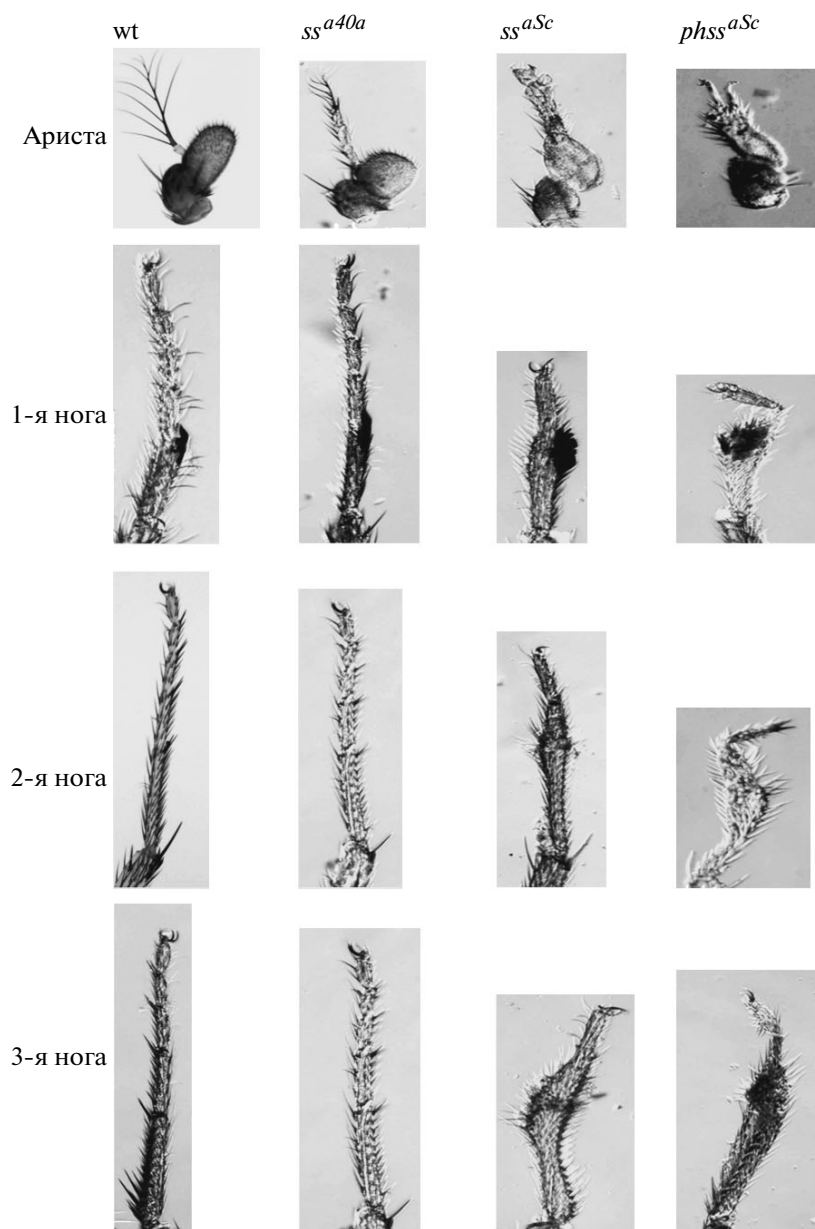


Рис. 4. Подавление экспрессии гена *CG5017*, приводящее к экстремальному фенотипическому проявлению мутации гена *ss*. *wt* — антенные и тарзальные структуры мух дикого типа; *ss^{a40a}* — те же структуры мух исходной мутантной линии *ss^{a40a}*; *ss^{aSc}* — усиление трансформации аристы в тарзус и слияния тарзальных сегментов ноги; *phss^{aSc}* — еще большее усиление проявления мутантного фенотипа.

антенны аристе или тарзусу и степень их сегментации. Рассматривая реальные структуры конечностей у различных видов насекомых, мы можем увидеть их фенокопии у дрозофилы, возникшие в результате модуляции уровня экспрессии генов *ss* и *CG5017*. На наш взгляд, это означает, что закреплявшиеся в ходе эволюции различные варианты регуляции уровней экспрессии этих генов оказались важным инструментом эволюционных преобразований морфогенеза конечностей членистоногих.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кузин Б.А., Досжанов К.Т., Симонова О.Б. и др. Новый аллельный вариант *ss^a* гена и его вовлеченность в контроль пролиферации стволовых клеток ножных и антенных имагинальных дисков *Drosophila melanogaster* // *Онтогенез*. 1991. Т. 22. С. 212–217.
- Модестова Е.А., Копытова Д.В., Георгиева С.Г., Симонова О.Б. Использование генетической системы химерного белка Р-Ph для репрессии транскрипции гена *leg-arista-wing complex* у дрозофилы // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 5. С. 713–716.

- Abu-Shaar M., Mann R.S.* Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila leg* development // *Development*. 1998. V. 125. P. 3821–3830.
- Anholt R.R., Mackay T.F.* The genetic architecture of odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster* // *Behav. Genet.* 2001. V. 31. P. 17–27.
- Balkashina I.* Ein Fall der Erbhomoosis (die Genovariation "Aristapedia") bei *Drosophila melanogaster* // *W. Roux. Arch. Entw. Org.* 1929. V. 115. P. 448–465.
- Belenkaya T., Soldatov A., Nabirochkina E. et al.* P-element insertion at the polyhomeotic gene leads to formation of a novel chimeric protein that negatively regulates *yellow* expression in P-element-induced alleles of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1998. V. 150. P. 687–697.
- Brook W.J., Cohen S.M.* Antagonistic interactions between wingless and decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila leg* // *Science*. 1996. V. 273. P. 1373–1377.
- Cohen S.M., Jürgens G.* Proximal-distal pattern formation in *Drosophila*: cell autonomous requirement for distal-less gene activity in limb development // *EMBO J.* 1989. V. 8. № 7. P. 2045–2055.
- Crew S., Brenman E.* Spineless provides a little backbone for dendritic morphogenesis // *Genes. Devel.* 2006. V. 20. P. 2773–2778.
- Diaz-Benjumea F.J., Cohen B., Cohen S.M.* Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila legs* // *Nature*. 1994. V. 372. P. 175–179.
- Dubnau J., Chiang A., Grady L. et al.* The *staufen/pumilio* pathway is involved in *Drosophila* long-term memory // *Curr. Biol.* 2003. V. 13. P. 286–296.
- Duncan D., Burgess E., Duncan I.* Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristapedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor // *Genes. Devel.* 1998. V. 12. P. 1290–1303.
- Emmons R., Duncan D., Estes P. et al.* The Spineless-Aristapedia and Tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila* // *Development*. 1999. V. 126. P. 3937–3945.
- Grigliatti T., Suzuki D.* Temperature sensitive mutations in *Drosophila melanogaster* VII. The homeotic mutant *ss^{a40a}* // *PNAS USA*. 1971. V. 68. P. 1307–1311.
- Gross-Bellard M., Oudet P., Chambon P.* Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells // *Eur. J. Biochem.* 1973. V. 36. № 1. P. 32–38.
- Kim M., Jan L., Jan Y.* The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of *Drosophila dendritic* arborisation neurons // *Genes. Devel.* 2006. V. 20. P. 2806–2819.
- Kuzin B., Dosdjanov K., Mazo A.* Interaction between spineless-aristapedia gene and genes from Antennapedia and Bithorax complexes of *Drosophila melanogaster* // *Int. J. Devel. Biol.* 1997. V. 41. P. 867–875.
- Lecuit T., Cohen S.* Proximal-distal axis formation in the *Drosophila leg* // *Nature*. 1997. V. 388. P. 139–145.
- Park Y.J., Luger K.* The structure of nucleosome assembly protein 1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 5. P. 1248–53.
- Rodriguez P., Munroe D., Prawitt D. et al.* Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone // *Genomics*. 1997. V. 44. № 3. P. 253–65.
- Struhl G.* Spineless-aristapedia a homeotic gene that does control the development of specific compartment in *Drosophila* // *Genetics*. 1982. V. 102. P. 737–749.
- Wu J., Cohen S.M.* Proximodistal axis formation in the *Drosophila leg*: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less // *Development*. 1999. V. 126. P. 109–117.

Interaction of the *ss* and *CG5017* Genes in the Regulation of Morphogenesis of Limbs in *Drosophila melanogaster*

B. A. Kuzin^a, E. A. Modestova^b, Yu. E. Vorontsova^a, O. G. Zatsepina^c, A. S. Mikaelyan^a, M. V. Slezingar^a, and O. B. Simonova^a

^a Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

^b Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, 119334 Russia

^c Engelgardt Institute of Molecular Biology, ul. Vavilova 32, Moscow, 119334 Russia
e-mail: kuzinB@yandex.ru

Abstract—The influence of the P-element built into the area of the *CG5017* gene on the mutation of the *spineless* (*ss*) gene was studied. It was shown that the insertion of the P-element decreased the level of transcription of *CG5017* approximately twofold. Modulation of the level of transcription of the *CG5017* gene helped demonstrate, for the first time, its influence on the phenotypic manifestation of the mutation of the *ss* gene, which shows their interaction in the process of regulation of morphogenesis of limbs in *Drosophila melanogaster*.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *spineless* (*ss*) and *CG5017* genes, tarsus, arista, chaperone