



На правах рукописи
УДК 577.21:595.773.4

Модестова Елена Андреевна

**ПОЛУЧЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА
LEG-ARISTA-WING COMPLEX
У *DROSOPHILA MELANOGASTER***

03.00.26 - молекулярная генетика

Автореферат
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2005

Работа выполнена в лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена РАН

Научные руководители:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор **Л. И. Корочкин**
кандидат биологических наук **О. Б. Симонова**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, **Б. А. Кузин**
кандидат биологических наук **Н. М. Груздева**

Ведущая организация:

Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН

Защита диссертации состоится 27 мая 2005 г. в 12.00 на заседании Диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, 32.

Автореферат разослан 27 апреля 2005 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
канд. фарм. наук

 **Грабова Л.С.**

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Проблема получения достаточного количества мутаций при изучении функционирования генома дрозофилы много лет не теряет своей актуальности. Активное секвенирование генома дрозофилы и компьютерный анализ показывают наличие множества открытых рамок считывания, выявляют гомологии последовательностей. Но эти методы в настоящий момент позволяют лишь строить предположения, какие процессы затрагиваются ими *in vivo*. Мутагенез с одной стороны и молекулярные данные о структуре ДНК, синтезе белков и регуляции экспрессии позволяют соединить молекулярный и организменный уровни изучения работы генов.

Ранее был открыт новый *транс*-регуляторный ген дрозофилы - *leg- arista-wing complex (lawc)*, мутации которого нарушают правильную экспрессию многих локусов, в частности, пронейральных *achaete* и *scute* генов и гомеобоксодержащего локуса *cut*. Ряд фактов указывает на непосредственную роль нового локуса как в органогенезе, так и в раннем эмбриогенезе дрозофилы: одним из многочисленных фенотипических признаков его мутаций явилась гомеозисная трансформация аристы в элементы тарзуса; небольшая делеция в области экзона вызывает нарушение финальных этапов пролиферации клеток крылового имажинального диска, приводя к сильным аномалиям развития торакса дрозофилы.

Район локализации гена *lawc* (7E район цитологической карты X-хромосомы дрозофилы) содержит блок нескольких леталей, порядок и функциональная значимость которых до сих пор не установлена. Все они являются точечными, что сильно осложняет клонирование соответствующих генов. Поэтому открытие видимых, инсерционных мутаций в "летальных зонах" генома дает возможность молекулярно и генетически исследовать структуры и функции подобных областей.

По предварительным молекулярным данным, основной транскрипт гена *lawc* имеет большие размеры (более 9 т.н.). В настоящий момент у дрозофилы известно мало локусов, имеющих транскрипты подобного размера, и все они имеют очень сложную структуру. Поэтому новый локус

является уникальной моделью для изучения функциональных особенностей сложно организованных локусов.

Цель работы.

Целью настоящей работы являлось:

- Создание генетической системы скрещиваний, позволяющей эффективно получать мутации в различных районах X-хромосомы.
- Получение коллекции мутантов в исследуемом районе и её молекулярно-генетический скрининг.
- Выявление генетических взаимодействий *lawc* с другими генами и районами генома дрозофилы.
- Подавление экспрессии *lawc* при помощи химерного белка P-Pn.
- Детализация фенотипического проявления *lawc*-мутаций.

Научная новизна и практическая ценность.

В данной работе помимо сугубо прикладной задачи - создания коллекции мутаций, была решена более глобальная проблема - увеличение эффективности мутагенеза у дрозофилы. Разработанная генетическая система позволяет с высокой частотой проводить мутагенез у *Drosophila melanogaster* в X-хромосоме. Она была с успехом опробована для получения мутаций в гене *leg-arista-wing complex*, в то время как стандартными методами добиться успеха не удавалось. С помощью Саузерн-блот анализа мы установили молекулярную природу полученных мутаций. Впервые выявлены межгенные взаимодействия *lawc* с рядом генов и делециями, для чего применялась коллекция линий *Deficiency Kit*. Также с успехом применена пионерская методика инактивации генов при помощи химерного белка P-Pn, разработанная в лаборатории П.Г. Георгиева (ИБГ РАН), и проведено снижение транскрипции в исследуемом нами районе, подтверждающее эффективность метода.

Апробация работы.

Результаты работы докладывались на 40-й, 41-й, 42-й, 44-й, 46-й Ежегодных исследовательских конференциях по дрозофиле (Сиэтл, 1999 г.,

Питтсбург, 2000 г., Вашингтон, 2001, Чикаго, 2003 г., Сан-Диего, 2005 г.), на I и II Международных симпозиумах (Новосибирск, 1999, 2000 гг.), на 16th Европейской исследовательской конференции по дрозофиле (Цюрих, 1999 г.), VI и VII Всероссийских школах молодых учёных «Актуальные проблемы нейробиологии» (Казань, 1999, 2000 гг.), Международном симпозиуме памяти академика Павлова «Механизмы адаптивного поведения» (Санкт-Петербург, 1999г), Международном симпозиуме «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология», (Москва-Минск, 2001) и международной конференции «Молекулярная генетика эукариот» (Москва, 2003).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ (3 статьи и 13 тезисов).

Структура диссертации.

Диссертация содержит 123 страницы машинописного текста и состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов», «Результатов и обсуждения», «Выводов», «Заключения» и «Списка цитируемой литературы» (69 ссылок). Диссертация содержит 25 рисунков, 6 таблиц и 1 приложение.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Ранее подробно описанные фенотипические изменения у *lawc*-мутантов основывались на множестве гетерогенных аллелей, полученных в системе нестабильности. Мы не могли с точностью быть уверены в том, что изучаемые мутации не сопровождаются изменениями в других локусах, и что эти мутации не влияют на фенотип особей.

Так, наиболее сильная трансформация аристы наблюдалась при работе с эмбриональной леталью *l(1)EF520* (синоним *lawc*^{EF520}) у гетерозиготных полулетальных самок *l(1)EF520/cⁿlawc^{p1}*. В гетерозиготе аллели *lawc* не комплементируют, сочетание слабой жизнеспособной и

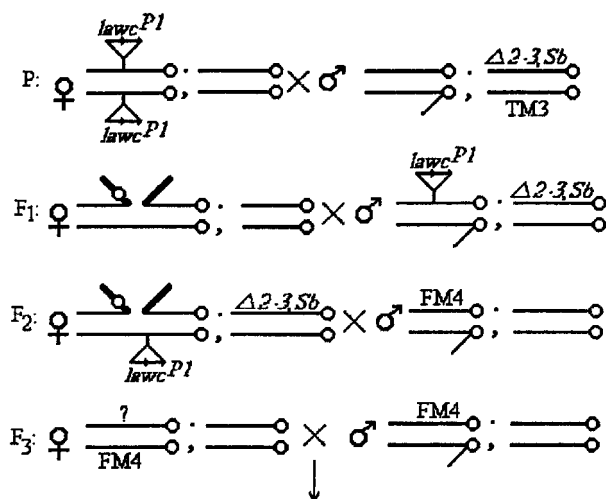
сильной летальной мутаций приводит к сильным морфологическим изменениям (включая гомеозисную трансформацию аристы) и снижению жизнеспособности. Имевшаяся в мировой коллекции EMS-индуцированная мутация *l(1)EF520* ранее считалась единичной. Тем не менее, когда мы вплотную занялись изучением линии, несущей *l(1)EF520*, оказалось, что в ней присутствует не одна, а целый комплекс мутаций, локализованных в X-хромосоме. Используя *Dp(1;2)sn⁺72d* для дупликационного картирования, мы обнаружили, что наличие в аутосоме дупликации по исследуемому району не обеспечивает выживания особей *l(1)EF520/Y; Dp(1;2)sn⁺72d/+*. Далее, получая кроссоверных особей с целью ввести в хромосому с *l(1)EF520* более удобные маркеры, мы часто получали X-хромосомы с летальными, комплементирующими с аллелями *lawc*, и эти мутации опять же выходили за пределы дупликации. На основе генетических данных нами было сделано предположение, что в исходной линии существует как минимум 3 летальные мутации, в том числе и в исследуемом локусе. Так как EMS чаще всего индуцирует точечные мутации, их картирование затруднено, и постановка корректных экспериментов с линией *l(1)EF520/FM7c* была признана нами невозможной. *Отсутствие летальных мутаций затрудняло дальнейшую работу.*

С целью изучения получения единичных летальных мутаций в исследуемом локусе, мы:

- 1) провели работу по получению летальных мутаций;
- 2) изучили модельную систему со снижением транскрипционной активности в линии со слабой мутацией (так называемая репрессия при помощи химерного белка Р-РН, данная система функционально заменяет мутагенез).

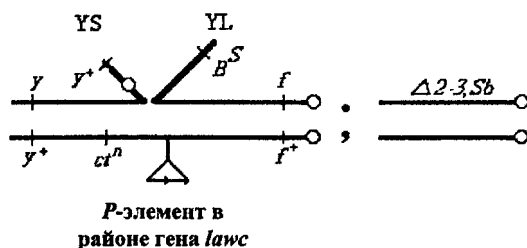
Получение летальных мутаций.

Мутагенез проводили в условиях Р-М-гибридного дисгенеза при помощи разработанной в лаборатории методики, предотвращающей репарацию разрывов по механизмам гомологичной рекомбинации или конверсии после вырезания копии Р-элемента (рис. 1).



анализ полученных в F3 линий

Рисунок 1. Схема скрещиваний при проведении мутагенеза. *lawc*^{P1} – исходный слабый аллель, стрелками обозначена инсерция Р-элементов, $\Delta 2-3$ - не способный перемещаться Р-элемент, кодирующий трнспозазу, *Sb* - маркерная мутация *Stubble*, *TM3*, *FM4* - балансерные хромосомы, утолщенная линия обозначает материал Y-хромосомы, вопросом обозначена хромосома, в которой могли возникнуть мутации.



Р-элемент в районе гена *lawc*

Рисунок 2. Генотип самок F3 (детализировано): *YS* - короткое плечо Y-хромосомы, *YL* - длинное плечо Y-хромосомы, *y*⁺, *y*, *B*^S, *f* — маркеры транслокации, *ct*ⁿ — маркер X-хромосомы с Р-элементом, $\Delta 2-3$ - не способный перемещаться Р-элемент, кодирующий трнспозазу, *Sb* - маркерная мутация *Stubble*, треугольником со стрелками обозначено место инсерции Р-элемента, кружками обозначены центромеры.

Идея эксперимента заключалась в дестабилизации Р-элемента у особей, гомологичные Х-хромосомы которых несли: одна - встройку Р-элемента в интересующем районе, а другая - разрыв в той же самой, или близлежащей области (рис 2). У мутанта *lawc^{o1}* единственная потенциально активная копия Р-элемента изначально находилась в районе гена *lawc* [7E5-11], а оппозитная хромосома несла разрыв в прилежащем районе [7E2-3] и транслокацию по месту разрыва плеч У-хромосомы *T(1;Y)W31*.

Результаты мутагенеза представлены в таблице 1. Хотя мы ожидали большой стабильности от всех полученных линий, тем не менее, часть линий, в которых были обнаружены летальные мутации, в дальнейшем мутировала с восстановлением жизнеспособности. Мы не акцентировали внимание на этих процессах, так как нашей задачей было получение именно стабильных мутаций, позволяющих проводить длительные эксперименты. Фенотипически самцы с прошедшей через систему дисгенеза Х-хромосомой представляли весь спектр *lawc*-мутантного фенотипа - от полной летальности до реверсии к дикому типу.

Таблица 1. Результаты мутагенеза.

Общее количество индивидуальных линий, полученных от самок F3	1147
Число полученных летальных мутаций	93 (8% от общего количества)
Число распавшихся линий	11
Число проанализированных леталей (дупликационное картирование)	82
Число леталей, выживающих при введении в геном дупликации <i>Dp(1;2)sn^{+72d}</i>	33 (40% от тестируемых линий)

В целом примененная нами схема скрещиваний подходит для получения мутаций в большинстве локусов Х-хромосомы *Drosophila melanogaster*. Транслокации плеч У-хромосомы по месту разрывов в Х-хромосоме отнюдь не единичны, их насчитывается более 300. Можно

рекомендовать примененную нами схему скрещиваний для эффективного локуспецифичного мутагенеза без применения ионизирующего излучения.

Для отнесения полученных летальных мутаций к определенному цитологическому району мы использовали дупликационное картирование. Как правило, наличие в геноме дупликации по району рецессивной летальной мутации восстанавливает жизнеспособность исследуемого класса. Таким образом, при совмещении в одном геноме летальной хромосомы и хромосомы с дупликацией должны были выживать самцы с летальной хромосомой, если леталь совпадала с районом дупликации.

Используемая нами дупликация при совмещении с сильными мутациями восстанавливает нормальный фенотип. Единственная ранее доступная летальная мутация *l(1)EF520*, являющаяся аллельным вариантом *lawc*, не выживала в присутствии дупликации, и для линии из мировой коллекции была показана множественность мутаций.

Значительная часть протестированных нами линий (40%) характеризовалась летальными мутациями, не выходящими за пределы дупликации.

Молекулярная природа полученных мутаций

Исходная мутация *lawc^{p1}* представляет собой инсерцию 2 tandemно расположенных копий неполноразмерного Р-элемента/ Мы ожидали обнаружить полную эксцизию Р-элементов, изменение их копийности, а также возникновение делеций, возникающих за счет расширения бреши при эксцизии. Все мутации исследовались в гетерозиготе с хромосомой-балансером, содержащей интактный аллель, поэтому мы легко могли идентифицировать появление отличных от дикого типа полос, но в случае делеций, полностью затрагивающих область зонда, изменения будут не видны. В таких случаях эти аллели дополнительно тестировались в гетерозиготе с аллелем *lawc^{p1}*, у которого анализируемый район отличался по размеру от дикого типа благодаря инсерции двойной копии Р-элемента.

Были проанализированы районы гена, лежащие в непосредственной близости к месту инсерции Р-элемента, а также прозондирована область, расположенная примерно в 10 т.п.н. от исходной вставки и кодирующая ОРС гена *TRF2* (рис. 3).

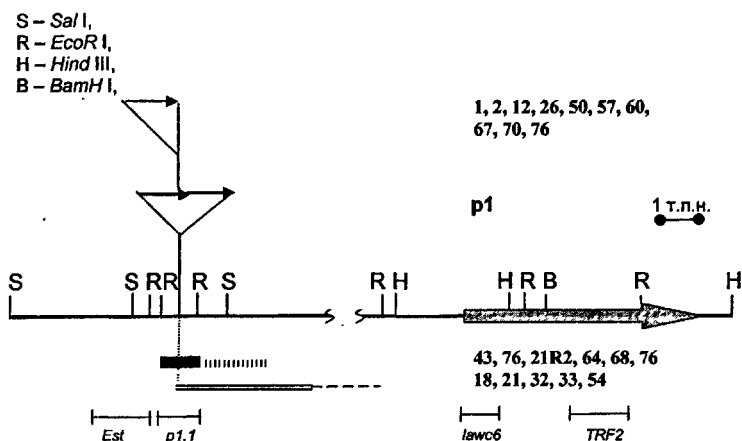


Рисунок 3. Рестриктивная карта района /lawc. Треугольниками показаны инсерции Р-элемента, вертикальной волнистой чертой - разрыв карты длиной 7 т.п.н., *Est*, *p1.1*, *lawc6* и *TRF2* - использованные зонды, серой стрелкой обозначен район ближайшей предполагаемой рамки считывания (ген *TRF2*), черным прямоугольником и штриховкой - делеции, двойной линией и пунктиром — инверсии, цифры справа от различных типов перестроек соответствуют номерам мутантных линий.

Рестрикция *Sal* I и гибридизация с зондом *Est* дает полосы ~2,3 и ~3,0 т.п.н. в контроле, и на уровне ~3,0 и ~4,0 т.п.н. - у исходной мутации *lawc^{p1}*. Появление на фильтре дополнительных полос размером ~8.0 т.п.н. после гибридизации с зондом *Est* при обработке ДНК рестриктазой *Sal* I позволяло предположить пространственное разнесение последовательностей зонда, т.е. перестройку района по типу инверсий. На основании результатов гибридизации часть линий была отобрана для дальнейших генетических экспериментов. Для линий с аллелями *l(1)lawc18* *l(1)lawc21* и *l(1)lawc54* была проведена дестабилизация имеющихся в линии Р-элементов с целью получить реинверсии и восстановить жизнеспособность особей (см. ниже).

Гибридизация фильтров с рестрицированной при помощи *EcoR* I ДНК с зондом *p1.1* также оказалась очень информативной, так как именно область этого зонда совпадала с локализацией исходной вставки Р-элементов. В норме гибридизуется фрагмент ~1.0 т.п.н., у дестабилизируемой мутации

Таблица 2. Возникшие в линиях перестройки (обобщенный анализ результатов гибридизации по Саузерну).

Инверсии	Делеции	Изменение размера исходной вставки	Изменения не обнаружены
<i>l(1)lawc18</i>	<i>l(1)lawc43</i>	<i>l(1)lawc1</i> <i>l(1)lawc2</i>	<i>l(1)lawc4</i> <i>l(1)lawc16</i>
<i>l(1)lawc21</i>	<i>l(1)lawc76</i>	<i>l(1)lawc12</i> <i>l(1)lawc26</i>	<i>l(1)lawc19</i> <i>l(1)lawc53</i>
<i>l(1)lawc32</i>	<i>lawc^{21R2}</i>	<i>l(1)lawc50</i> <i>l(1)lawc57</i>	<i>l(1)lawc66</i> <i>l(1)lawc69</i>
<i>l(1)lawc33</i>	<i>l(1)lawc64</i>	<i>l(1)lawc60</i> <i>l(1)lawc67</i>	<i>l(1)lawc72</i> <i>l(1)lawc73</i>
<i>l(1)lawc54</i>	<i>l(1)lawc68</i>	<i>l(1)lawc70</i> <i>l(1)lawc76</i>	<i>l(1)lawc75</i> <i>l(1)lawc90</i>
		<i>l(1)lawc82</i>	

он утяжелен за счет наличия Р-элементов до ~3.6 т.п.н. Промежуточный вариант ~2.3 т.п.н. свидетельствует о вырезании одной копии Р-элемента. Вырезание сайта рестрикции *EcoR I* у *l(1)lawc43* *l(1)lawc64* *l(1)lawc68* приводит к объединению соседних рестриктных фрагментов в один и появлению тяжелых полос (5-6 т.п.н.), в этих случаях мы предположили наличие небольших делеций. Аллельные варианты, не дающие отличных от дикого типа полос, были дополнительно тестированы в гетерозиготе с *lawc^{P1}*, и для линии *l(1)lawc76* было доказано наличие делеций, размером ~950 п.н. или больше.

Гибридизация с удаленными зондами *lawc6* и *TRF2* (рестрикция по сайтам *Hind III* + *BamH I*, а также по *EcoR I*) не показала наличия видимых делеций или инсерций в рестриктных фрагментах.

Таким образом, разработанная система мутагенеза позволила получить коллекцию аллельных вариантов, имеющих структурные изменения в исследуемом районе, в том числе инверсии, делеций и инсерций. Рамка считывания ближайшего гена *TRF2* при этом не затрагивалась. Однако дальнейшие генетические rescue-эксперименты с трансгенными конструктами, кодирующими домены гена *TRF2*, показали, что в ряде полученных нами линий (*l(1)lawc19*, *l(1)lawc33*, *l(1)lawc43*, *l(1)lawc57*, *l(1)lawc60*, *l(1)lawc69*, *l(1)lawc73*) восстанавливается выживаемость летального класса. Саузерн-блот гибридизация ДНК с меченым зондом района Р-элемента не выявила его копий в геноме трёх из этих аллелей

l(1)lawc19, *l(1)lawc69*, *l(1)lawc73*. Каких-либо перестроек в этих линиях также не было обнаружено. Возможно, данные мутации вызваны перестройками, выходящими за пределы использованных зондов, либо нарушения столь малы, что их невозможно определить методом блот-гибридизации по Саузерну.

Получение и анализ реинверсий и спонтанных мутаций

Инверсии, получившиеся в результате активизации мобильного генетического элемента, часто оказываются заключены между двумя его копиями. В таких случаях инверсии являются нестабильными и могут ревертировать к исходному состоянию.

Для того, чтобы доказать факт наличия инверсий в полученных нами линиях, мы провели повторную дестабилизацию линий *l(1)lawc18*, *l(1)lawc21*, *l(1)lawc54*. В результате для каждой инверсии было независимо получено по несколько реинверсий, восстанавливающих жизнеспособность особей. Все они фенотипически были сходны с *cl^olawc^{P1}*, за исключением *lawc^{18rev1}* (производная *l(1)lawc18*), где самцы часто имеют более сильно обрезанные и расставленные крылья, а также нарушения формирования аристы.

Помимо целенаправленного получения этих аллельных вариантов, мы не пренебрегли спонтанно возникшими в линии *l(1)lawc2* жизнеспособным вариантом *lawc^{2rev1}*, и в линии *l(1)lawc60* - *lawc^{60rev1}*. В настоящее время последний является наиболее сильной мутацией, сохраняющей жизнеспособность.

Репрессия экспрессии гена-мишени при помощи химерного белка P-Ph

Чтобы доказать главную роль Р-элемента в сложном плейотропном фенотипическом проявлении гена *lawc*, мы использовали репрессию транскрипции нашего гена *in vivo* при помощи системы химерного белка P-Ph. Этот белок, вырабатываемый мутантным аллелем гена *polyhomeotic* (pl), имеет домен, обладающий транспозазной активностью, что позволяет ему связываться с последовательностями Р-элементов (Р), и домен белка Polyhomeotic (Ph), который взаимодействует с белками группы Polycomb. Белки этой группы вызывают локальную конденсацию участков хроматина, делая его недоступным для других регуляторных факторов. В результате

эксперимента мы получили и исследовали экстремальные фенотипические проявления мутации гена *lawc*, а также продемонстрировали уменьшение уровня транскрипции этого локуса, опосредованное влиянием химерного белка P-Ph

Оказалось, что самцы *ph^{P1}lawc^{P1}/Y* характеризуются низкой жизнеспособностью, усилением всех фенотипических проявлений мутации *lawc*, а гомозиготные самки ещё и стерильны. Фенотипические изменения, вызываемые слабой мутацией *lawc^{P1}* в присутствии химерного белка P-Ph, наглядно иллюстрирует рисунок 4

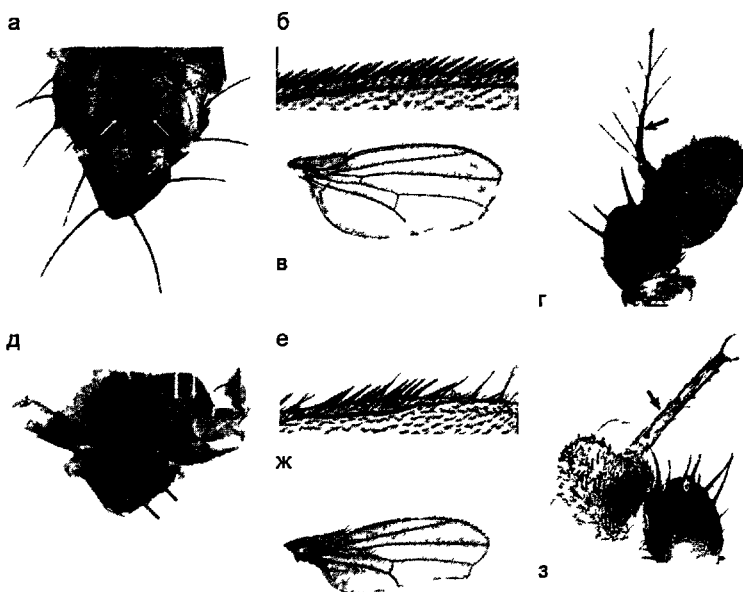


Рисунок. 4. Фенотипические изменения у компаундов *ph^{P1}lawc^{P1}*. а - торакальная часть кутикулы особей *ac¹ph^{P1}* (отсутствие задних дорзоцентральных щетинок показано стрелками), б - край крыла (дикий тип), в - крыло особи *ctⁿlawc^{P1}*, г - антенна, стрелкой указана ариста (дикий тип), д - торакальная часть кутикулы особей *ac¹ph^{P1}lawc^{P1}* (нет редукции макрохет, дополнительные щетинки указаны стрелками), е - край крыла особей *ph^{P1}ctⁿlawc^{P1}*, ж - крыло о *ph^{P1}ctⁿlawc^{P1}*, з - антенна особи *ph^{P1}lawc^{P1}* (трансформированная членистая ариста указана стрелкой)

У мутантных мух наблюдалось усиление крыловых дефектов: расставленные крылья (*Dichaete*-подобный фенотип), вырезки на крыле углубились и почти слились, приближая крылья отдельных особей к форме треугольника, аномалии распространились на наружный край крыла, выражаясь в наличии мелких вырезок, нарушении регулярного расположения щетинок (отсутствие микрохет, размывание паттерна, возникновение эктопических макрохет).

Усилилась степень трансформации аристы. У исходной линии аномалии на протяжении множества поколений сгладились, и в настоящее время едва заметны, в основном выражаются в слабом искривлении аристы. В присутствии химерного белка наблюдались аристы с заметным утолщением, возникновением членистых структур, завершающиеся характерным для лапки коготком.

Результаты генетических экспериментов были подтверждены при помощи Нозерн-блот анализа в лаборатории Ю.В. Ильина. Сравнивали уровень транскрипции гена *lawc* у дрозофил дикого типа, мутантов *lawc^{P1}* и *ph^{P1}lawc^{P1}*. Тотальную РНК выделяли из самцов и гибридизовали с радиоактивным фрагментом (730 пн), соответствующим району гена *lawc*, куда встроилась копия Р-элемента. Было показано, что уровень транскрипции гена *lawc* в линии с инсерционной */awe*-мутацией и продуцирующей химерный белок Р-Ph ниже, чем просто в линии с инсерционной */awc*-мутацией. Снижение транскрипции, очевидно, и привело к возникновению экстремальных фенотипических проявлений у инсерционных */awe*-мутантов.

Нарушения в репродуктивной системе

Гомозиготные самки *ph^{P1}ct^{P1}lawc^{P1}* оказались стерильны. Исследование яичников обнаружило наличие яиц у 3-5-дневных самок. Морфологический анализ репродуктивной системы самок показал аномальное развитие гонад - многоцистовость (когда в одной яйцевой камере развивается более одного овоцита). У самок 7-10-дневного возраста в яичниках наблюдается отсутствие ранних форм, т.е. созревание ограниченного числа овоцитов без их воспроизводства. Мы предполагаем, что мутация гена *lawc* приводит к нарушению дифференцировки стволовых

герминативных клеток, в силу чего у мутантных самок может развиваться только ограниченное количество яиц. Многоцистовость скорее всего вызвана неправильным развитием соматических фолликулярных клеток.

Следует отметить, что у мутантных самцов этой же линии (генотип *pt^{P1}lawc^{P1}/Y*) наблюдается задержка в прохождении I мейотического деления, в семенниках накапливаются сперматоциты первого порядка, в семяприемниках обнаруживается небольшое количество спермы, и потомство эти особи оставляют, даже несмотря на сокращенную продолжительность жизни.

Стерильность самцов наблюдалась в экспериментах по поиску межгенных взаимодействий у компаундов *lawc^{P1}e(y)1/Y*. Она была вызвана нарушением дифференцировки герминативных клеток (сперматоцитов первого порядка) на стадии I мейотического деления. Сперматоциты II порядка у таких особей практически отсутствуют.

Поиск межгенных взаимодействий

Для изучения взаимодействия гена *lawc* с другими трансрегуляторными генами - факторами транскрипции группы *enhancer of yellow - Taf40* (синоним *e(y)1*), *e(y)2*, *e(y)3* при помощи кроссинговера были созданы генетические компаунды, содержащие комбинации жизнеспособных мутаций этих генов с мутацией по гену *lawc*. Оказалось, что совмещение мутаций по этим генам приводит либо к гибели или резкому снижению жизнеспособности (*e(y)2*, *e(y)3*), либо к нарушению фертильности полученных компаундов в сочетании со взаимоусилением мутантных признаков *Taf40/e(y)1*.

Чтобы обнаружить локусы, имеющие с геном *lawc* общую функциональную нагрузку, были проведены крупномасштабные генетические эксперименты по скринированию генома дрозофилы. Для этого мы использовали набор музейных линий (Deficiency Kit - более 400 линий), с делециями, в сумме перекрывающими значительную часть генома. Анализировались самцы *ct^mlawc^{P1}/Y; Df/+*, несущие в гетерозиготе делеции

Таблица 3. Классификация описанных в «летальных» зонах генов, которые могут взаимодействовать с *lawc*.

Эндопептидазы убиквитарно- протеиноазного комплекса	Факторы комплекса РНК-полимеразы II	Гипотетические факторы комплекса РНК-полимеразы II	Специфические факторы транскрипции и факторы, участвующие в компактизации хроматина	Гены митоза
<i>Pros3T</i>	<i>MAT</i> (TFIIH)	<i>net</i>	<i>kis (kismet)</i> - хеликаза	<i>Top2</i> (<i>Topoisomerase2</i>)
<i>Dox-A2</i> (<i>DiphenoloxidaseA2</i>)	<i>Ssl1</i> (TFIIH)	<i>bsh</i> (<i>brain-specific homeobox</i>)	<i>Top3alpha</i> (<i>Topoisomerase3alpha</i>)	<i>Vis</i> (<i>valois</i>)
<i>Pros5</i>	<i>Tfb4</i> (TFIIH)	<i>E2f2</i> (<i>E2Ftranscription factor2</i>)	<i>spir</i> (<i>spire</i>) / организация и биогенез актиновых компонентов цитоскелета	<i>barr</i> /конденсация хромосом
<i>Pros20S-3t</i> (<i>Proteasome20S3t subunit</i>)	<i>Tfb2</i> (TFIIH)	<i>Mio</i> (<i>Mixinteractor1</i>)	<i>dia</i> (<i>diaphanous</i>) /организация актиновых компонентов цитоскелета	<i>CG2508</i> /анафаза митоза
<i>subunitPros25</i> (<i>Proteasome25kD</i>)	<i>Hay</i> (TFIIH)	<i>crc</i> (<i>cryptocephal</i>),	<i>Df31</i> (<i>Decondensation factor31</i>) / ремоделирование хроматина	спп/сборка веретенаделения

<i>Pros28.1A/Pros!</i>	<i>Taf60(TBP-associated factor60kD)-TFIID</i>	<i>Mistr(Mist1-related)</i>	<i>tsh(teashirt)-</i> специфический фактор транскрипции (комплекс РНК-полимеразы II)	<i>Sse(Separase)/</i> протеиназа, основной белок, контролирующий расхождение хромосом
<i>Pros28.2 (Proteasome28kD subunit 2)</i>	<i>Taf150(TBP-associated factor 150kD)-TFIID</i>	<i>Bin(binious)</i>	<i>lola(lola like -)</i> специфический фактор транскрипции (комплекс РНК-полимеразы II)	<i>CG17498/чек-пойнт митотического веретена деления</i>
<i>Rpn11</i>	<i>Taf110(TBP-associated factor 110kD)-TFIID</i>	<i>Jra(Jun-related antigen)</i>	<i>MTF-1</i> - специфический фактор транскрипции (комплекс РНК-полимеразы II)	<i>Bj1/конденсация митотических хромосом</i>
<i>Uch-L3/1(3)j2B8 (UbiquitinC-terminal hydrolase)</i>	<i>Taf30a(TBP-associated factor30kD)-TFIID</i>	<i>vis(vismay)</i>		<i>eIF-4E</i>
<i>Ubc47D(Ubiquitin-conjugating-enzyme-47D)</i>	<i>e(y)1/Taf40(TBP-associated factor40kD)-TFIID</i>	<i>achi(achintya)</i>		<i>Gap1</i>
<i>GammaTry (gammaTrypsin)</i>	<i>Taf12L/Taf30-2(TBP-associated factor30kD subunit-2))-TFIID</i>	<i>bic(bicaudal)</i>		
<i>Mdr49(Multidrug resistance 49) - суперсемейство AAA-АТФаз</i>	<i>Taf18(TBP-associated factor 18kD)-TFIID</i>			

или мутации в отдельных генах (опыт). Альтернативный класс самцов (контроль) был представлен особями, не несущими делеций или мутаций. Он идентифицировался по стандартным маркерным мутациям, характерным для аутосомных хромосом-балансеров. В результате были выявлены 15 «летальных» цитологических зон, содержащих локусы, возможно, участвующих с геном *lawc* в одних и тех же процессах: [21B6; 21B8], [25A2-3; 25A5], [37B; 37C1], [39E7-F1; 40A4], [46E1-2; 46E1-F11], [47D1-2; 47D3], [49A1; 49A13], [49F15; 50C1], [55C1; 55D2-4], [64E1-13; 65C], [66D10-11; 66E], [67B1; 67D13], [75B8; 75F1], [86F1; 87B1-3], [92B3; 92D3-6]. Среди известных генов, локализованных в этих районах много факторов как базовой, так и специфической транскрипции, а также генов, участвующих в протеолизе, в компактизации хроматина и правильном расхождении хромосом при митозе и мейозе (табл. 3).

Сами по себе делеций в гетерозиготе не вызывают гибели особей или сильных фенотипических нарушений. Таким образом, отклонения в скрещиваниях от стандартного расщепления или морфологические аномалии указывают на некие межгенные взаимодействия. Следует отметить, что мы не претендуем на обнаружение всех генов, задействованных в биохимически связанных процессах - это невозможно в силу ограниченности метода. Многие взаимодействия в принципе невозможно проследить, наблюдая мутации в гетерозиготном состоянии (применительно к нашим экспериментам, это означает, что отсутствие выявленных взаимодействий не означает их отсутствия вообще). Карта делеций, составляющих Deficiency Kit, перекрывает отнюдь не все цитологические районы. И, тем не менее, полученные данные важны для определения направления дальнейших исследований.

Так как среди генов, локализованных в «летальных» зонах было много транскрипционных факторов, мы провели подобный эксперимент с рядом мутаций в генах, кодирующих основные компоненты (транскрипционные факторы, TF), участвующие в базовой транскрипции с TATA-промоторов (TFIIA, TFIIB, TFIIE, *TFIIH*, *TATA-box binding protein (TBP)*), и с мутациями группы генов *taf* (*TBP associated factor*) - *taf30*, *taf60*, *tafWO*, *taf250* и т.д. Обнаружены следующие взаимодействия: *Ssl1(H)*

[79F5-6] - аномалия тергитов, микрохет и дорзоцентральных макрохет, *Tfb4(H)* [21E3-4] - слегка грубоватые глаза, слабое усиление трансформации аристы, *hay* [67E3-4] - сильная трансформация аристы с высокой пенетрантностью.

Было обнаружено, что в одних случаях происходит сильное взаимоусиление фенотипических признаков, даже приводящее к летальности компаундов (компоненты комплекса TFIIN и ряд генов семейства *taf* (*taf30ct*, *taf40*, *taf60*, *taf110*, *taf150*), в случае *TBP* (TATA-binding protein) [57B7-10] происходит супрессия мутантного фенотипического проявления *lawc^{p1}* - аномалии формирования крыла, расставленные крылья, а в остальных случаях никаких взаимодействий не наблюдалось (TFIIA, TFIIB, TFIIE, и ряд *taf* (*taf30p*, *taf250* и др.). Данные суммированы в сводной таблице 4.

Таблица 4. Взаимодействие *lawc^{p1}* с мутациями и/или делециями ряда основных транскрипционных факторов РНК-полимеразы II. Подчёркнуты локусы, мутации в которых приводят к летальному исходу на фоне *lawc^{p1}*.

Сильные взаимодействия	Нетвзаимодействий
TFIIN (<i>Ssl1</i> , <u><i>MAT1</i></u> <i>Tfb4</i> , <i>Tfb2</i> , <i>hay</i>) e(y)2 e(v)3	TFIIE (TFIIEct, TFIIEP) TFIIB TFIID (TBP (TATA-binding protein))
Tafs (TBP-associated factors):	
<u><i>Taf60</i></u> , <u><i>Taf150</i></u> , <i>Taf110</i> , <u><i>Taf30a</i></u> , e(v)1/Taf40	<i>Taf250</i> , <i>Taf30p</i>

Таким образом, взаимоусиление фенотипических мутантных признаков является надёжной гарантией того, что эти гены участвуют в одних и тех же процессах, в данном случае, продукт гена *lawc* участвует в процессе регуляции базовой транскрипции. Факт того, что взаимоусиление проявляется не со всеми компонентами, входящими в состав базовой

транскрипционной машины, говорит о том, что это участие, по-видимому, ограничивается определённым набором белок-белковых взаимодействий.

Считается, что основным и универсальным фактором базовой транскрипции является белок TBP, связывающийся с ТАТА последовательностью, входящей в состав большинства промоторов. Совсем недавно у человека и дрозофилы обнаружены ещё 2 гена, продукты которых имеют структурное сходство ДНК-связывающего домена и, как полагают, выполняют схожую функцию, проявляя при этом некоторую тканевую специфичность. Это гены *TBP related factor 1* и 2 (*Trf1* и *Trf2*). В настоящее время границы локализации гена *Trf2* до конца не установлены. В частности, не известен район локализации начала его транскрипции (5' область). Анализ компьютерной базы данных, содержащей сиквенс генома дрозофилы показал, что часть последовательности гена *lawc* лежит на расстоянии примерно 10 т.п.н. от ОРС гена *Trf2*, в его 5' зоне. В предыдущих исследованиях мы выявили картину экспрессии гена *lawc*, которая выглядит довольно сложно, насчитывая до 13 вариантов транскриптов, три из которых лежат в области 12,5 тн, различаясь у самцов и самок. По данным Георгиевой С.Г. Нозерн-блот гибридизация этого же фильтра с зондами районов 77/2 и с зондом из «промежуточной» 10 т.п.н. области показал транскрипционный профиль, совпадающий с локализацией трёх крупных транскриптов гена *lawc*. Таким образом, было установлено, что ген *lawc* кодирует необыкновенно большой транскрипт, в состав которого, возможно, входит область гена 77/2, кодирующая ДНК-связывающий домен, гомологичный TBP. Естественно, что такой ген может быть многофункционален. Одна из функций его продукта, возможно, - связывание с промоторами в процессе осуществления базовой транскрипции при участии РНК-полимеразы II, возможно, конкурируя с белком TBP на ТАТА-промоторах.

ВЫВОДЫ

1. Разработана генетическая система скрещиваний, позволяющая эффективно получать мутации в различных районах X-хромосомы.
2. Получена коллекция летальных мутаций (33 линии) в районе гена *leg-arista-wing complex*, а также осуществлен молекулярно-генетический скрининг делеций и инверсий.
3. Выявлены 15 цитологических зон генома дрозофилы, содержащих локусы, взаимодействующие с геном *lawc*.
4. Обнаружены генетические взаимодействия *lawc* с базовыми и специфическими факторами транскрипции TFIИИ {*Ssl1*, *MAT1*, *Tfb4*, *Tfb2*, *hay*), *e(y)2*, *e(y)3*, *Taf60*, *Taf150*, *Taf110*, *Taf30a*, *e(y)1/Taf40*.
5. Проведено подавление экспрессии *lawc* при помощи химерного белка Р-Ph.
6. Показано, что стерильность самок, мутантных по гену *lawc*, вызвана нарушением структуры яйцевых камер и созреванием ограниченного числа овоцитов без их воспроизводства.
7. Установлено, что стерильность самцов *lawc^{p1}e(y)1/Y* вызвана нарушением формирования сперматоцитов второго порядка.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. O. Simonova, T. Sukhoverkhova, E. Modestova, L. Korochkin. Olfactory and taste response of homeotic *lawc* mutants in *D. melanogaster* II 40th Annual Drosophila Research Conference. 1999. Sietle, USA. P. 589C.
2. O. Simonova, T. Sukhoverkhova, E. Modestova, L. Korochkin. Behavioral and molecular analysis of homeotic *lawc* mutants in *D. melanogaster* // International Symposium on X chromosom Inactivation in Mammals. Novosibirsk, Russia. 1999. P. 30-31.

3. O. Simonova, T. Sukhoverkhova, E. **Modestova**, L. Korochkin. Olfactory and taste response of homeotic *lawc* mutants in *D. melanogaster* // 16th European Drosophila Research Conference. Zurich, Switzerland. 1999. P. 118.
4. Суховерхова Т.И., Симонова О.Б., **Модестова Е.А.**, Корочкин Л.И. Исследование вкусовой и ольфакторной чувствительности у гомеозисных мутантов гена *leg-arista-wing complex* у *D. melanogaster* // Актуальные проблемы нейробиологии. VI Всероссийская школа молодых учёных. Казань, Россия. 1999. С. 111 - 112.
5. O. Simonova, T. Sukhoverkhova, E. **Modestova**, L. Korochkin. Olfactory and taste response in homeotic *lawc* mutants in *Drosophila melanogaster* // International Symposium dedicated to Academician Ivan Pavlov's "Mechanisms of Adaptive Behavior" St. Petersburg, Russia. 1999. P.70.
6. Simonova O., T. Sukhoverkhova, E. **Modestova**, L. Korochkin. Behavioral analyses of homeotic *lawc*-mutants in *D. melanogaster* // 41st Annual Drosophila Research Conference. Pittsburgh, USA. 2000. P.a267.
7. Simonova O., T. Sukhoverkhova, E. **Modestova**, L. Korochkin. Behavioral analysis of homeotic *lawc*-mutants in *D. melanogaster* // Second International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. Novosibirsk, Russia. 2000. P. 49.
8. **Модестова Е.А.**, Суховерхова Т.И., Корочкин Л.И., Симонова О.Б. Анализ транскрипционной активности нового нейрогена дрозофилы *leg-arista-wing complex* и репрессия его транскрипции *in vivo* при помощи гибридного белка Р-Ph // Актуальные проблемы нейробиологии. VII Всероссийская школа молодых учёных. Казань, Россия. 2000. С.71.
9. Павлова Г. В., **Модестова Е. А.**, Венгрова С. П., Ефанов А. А., Рыбцова Н. Н., Корочкин Л. И. Экспрессия человеческого гена *gdnf* трансгенной линии *Drosophila melanogaster* // 2001. ДАН, Т. 376, N 5. - С. 694-696.
10. Simonova **О.Б.**, **Modestova Е.А.**, Sukhoverkhova Т.И., Korochkin Л.И. Analysis of the P-Ph protein-mediated repression of *leg-arista-wing complex* gene expression in *Drosophila* // 42nd Annual Drosophila Research Conference. Washington. USA. 2001. P.a126.
11. Е.А. **Модестова**, Л.И. Корочкин, О.Б. Симонова. Анализ экстремальных фенотипических проявлений гена *leg-arista-wing complex* после репрессии

- его транскрипции *in vivo* у дрозофилы // Международный симпозиум «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология». Минск (Белорусия), Москва (Россия). 2001. С. 98.
12. **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. №5. С.713-716.
 13. О. Simonova, **E. Modestova**. Identification of genes, involved in the same processes as *leg-arista-wing complex*. II 44th Annual Drosophila Research Conference. Chikago. USA. 2003. 33 OC.
 14. **Modestova E.**, Mertsalov I., Kopytova D., Simonova O. *LEG-ARISTA-WING COMPLEX*: Destabilization of cytological region, analysis of mutant alleles, rescue experiments and screening of genes with related function // International conference "Molecular genetics of eucariotes" Moscow. 2003. P. 13.
 15. Simonova O., **Modestova E.**, Vorontsova J., Korochkin L. *leg-arista-wing complex* mutations cause not only morphological abnormalities, but also chromosome non-disjunction. //46th Annual Drosophila Research Conference. San Diego. USA. 2005. 170B. P. 144.
 16. **Модестова Е.А.**, Ю.Е. Воронцова, Л.И. Корочкин, О. Б. Симонова. Получение летальных мутаций гена *leg-arista-wing complex* у *Drosophila melanogaster* II ДАН, 2005, в печати.

Подписано в печать 28.04.2005
Объем 1.5 печ.л.
Тираж 100 экз. Заказ № 77
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992, г. Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к.102

19 МАЙ 2005

1018