

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
МУТАЦИЙ ГЕНА TRITHORAX-LIKE И ИХ ВЛИЯНИЕ НА  
ООГЕНЕЗ DROSOPHILA MELANOGASTER**

Огиенко Анна Александровна

Представление диссертации на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: к.б.н. Баричева Э.М.

Новосибирск 2006

# Введение

Оогенез – сложный, многоэтапный процесс, который контролируется скоординированным действием большого числа генов, начиная с эмбриональной стадии и заканчивая взрослой мухой.

Ген *Trithorax-like (Trl)* обеспечивает экспрессию многих генов *D. melanogaster*.

Активная экспрессия гена *Trl* в яичниках необходима для запасания в растущем ооците.

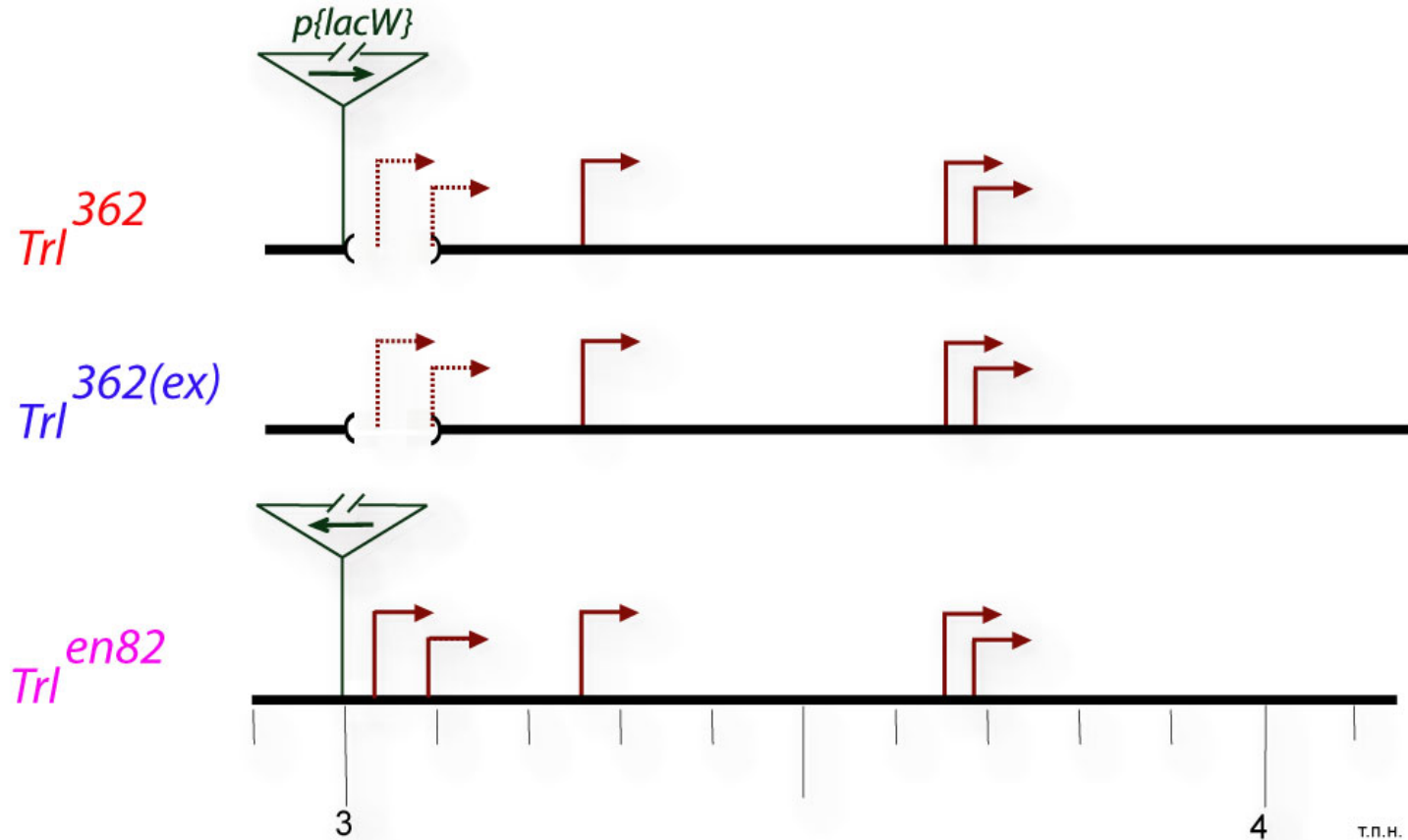
Косвенные данные об участии гена *Trl* в оогенезе *D. melanogaster* (анализ гетерозигот и генетических мозаиков).

Целью данной работы является изучение влияния новых мутаций гена *Trl* на оогенез *D. melanogaster*.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

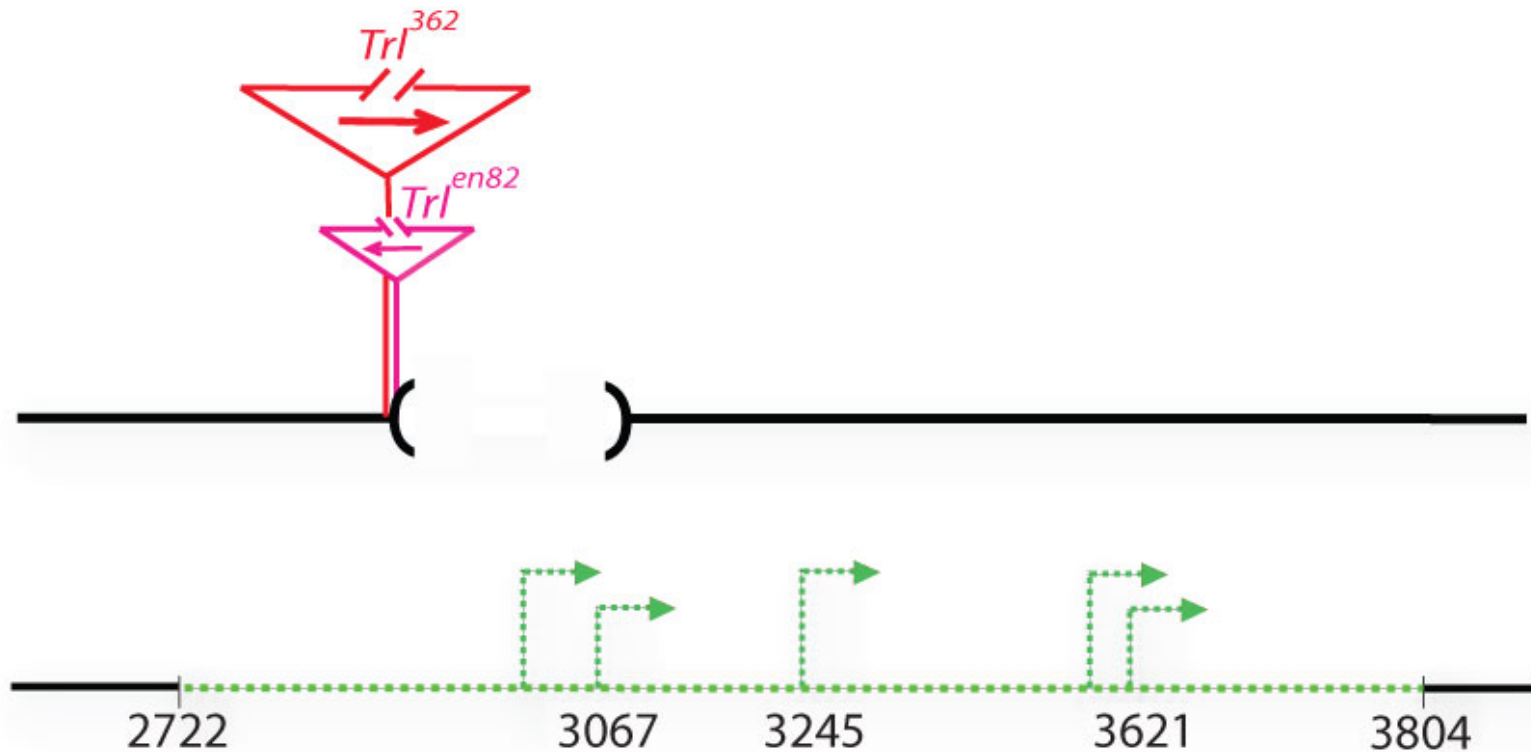
- Получить новые гипоморфные мутации гена *Trl*, влияющие на оогенез дрозофилы, и провести их картирование;
- Провести анализ влияния этих мутаций на экспрессию гена *Trl* как на уровне мРНК, так и на уровне белка;
- Провести анализ влияния этих мутаций на оогенез дрозофилы;
- Доказать, что именно изменение в экспрессии гена *Trl* приводит к выявленным нарушениям.

# Схема 5' района гена *Trithorax-like*. Локализация мутаций, используемых в работе



Стрелками указаны сайты инициации транскрипции,  
используемые в яичниках взрослых мух.

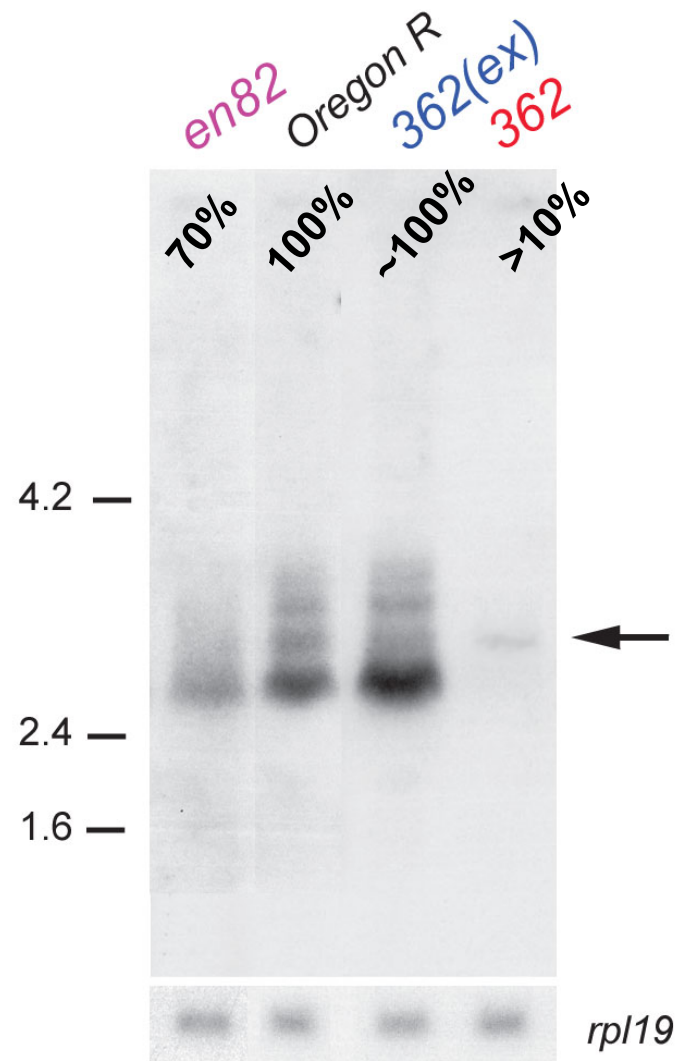
# Область минимального функционального промотора гена *Trl*

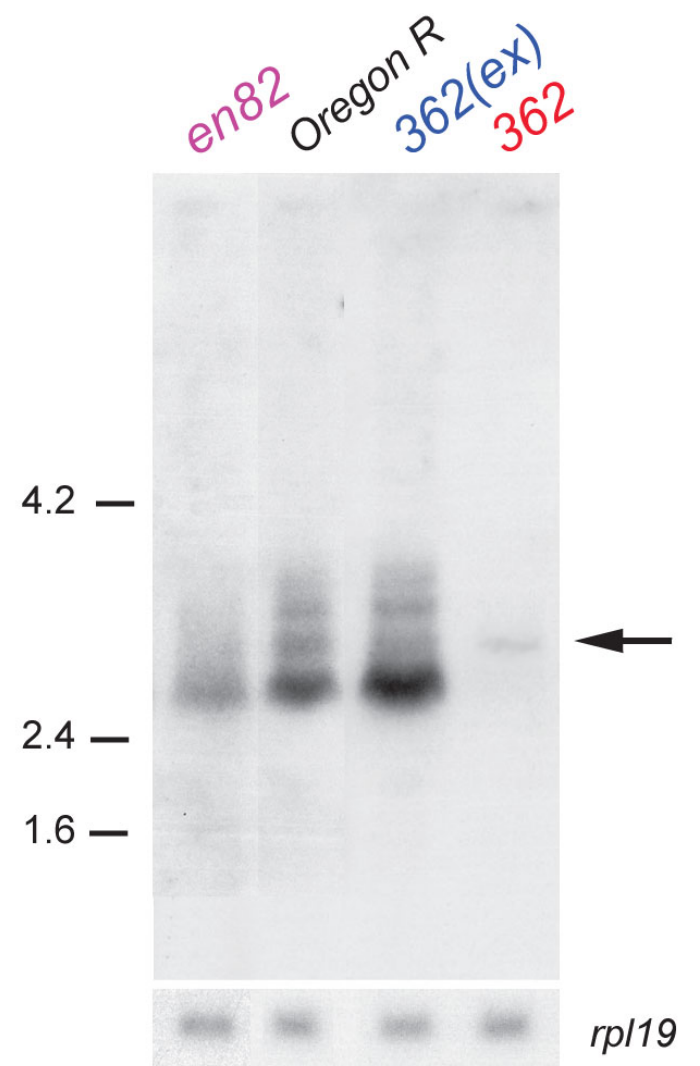
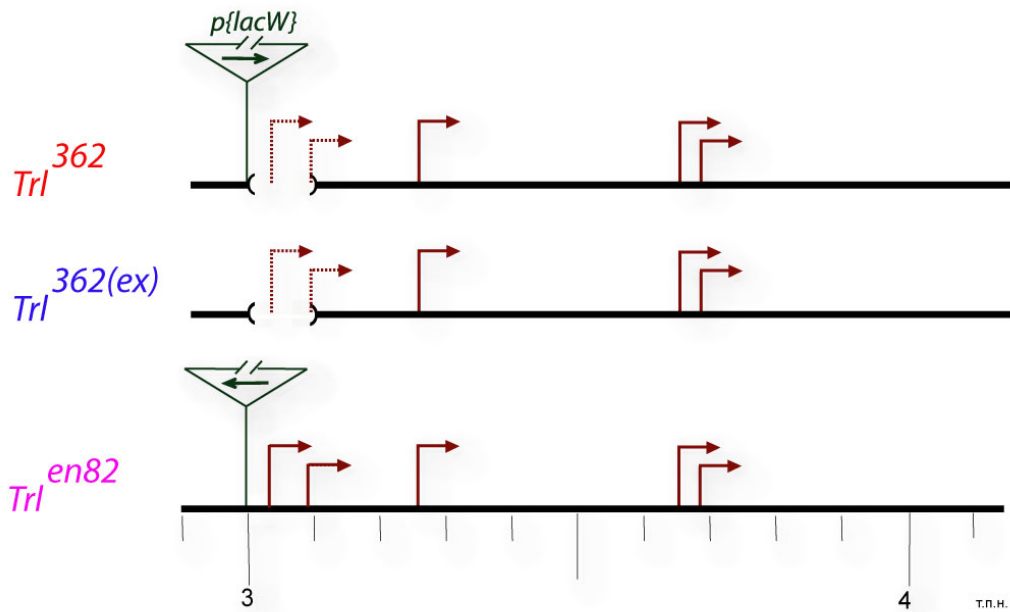


Область минимального промотора указана зеленым пунктиром.  
Треугольниками показана локализация Р-элементов, в новых аллелях гена *Trl*.

# Анализ экспрессии гена *Trl* у новых гипоморфных мутаций

В яичниках самок *Trl<sup>362</sup>* выявляется только один транскрипт размером 3 т.н., и суммарное количество мРНК гена *Trl* снижено как минимум в 10 раз, по сравнению с диким типом. В яичниках гомозиготных *Trl<sup>en82</sup>* мутантных самок транскрипция снижена приблизительно на треть по сравнению с нормой. В яичниках *Trl<sup>362(ex)</sup>* экспрессия гена практически не отличается от нормы. *Oregon R* – дикий тип, *Trl<sup>R85</sup>* – ноль-аллель гена *Trl*.





# Анализ влияния новых мутаций гена *Trl* на фертильность взрослых мух

Генотип	Самки (♀)	Самцы (♂)
<i>Trl</i> <sup>362(ex)</sup> / <i>Trl</i> <sup>362(ex)</sup>	стерильны	фертильны
<i>Trl</i> <sup>362(ex)</sup> / <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	стерильны	фертильны
<i>Trl</i> <sup>en82</sup> / <i>Trl</i> <sup>en82</sup>	полустерильны	фертильны
<i>Trl</i> <sup>en82</sup> / <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	стерильны	фертильны
<i>Trl</i> <sup>362</sup> / <i>Trl</i> <sup>362</sup>	стерильны	фертильны
<i>Trl</i> <sup>362</sup> / <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	стерильны	фертильны

*Trl*<sup>R85</sup> – нуль-аллель гена *Trl*

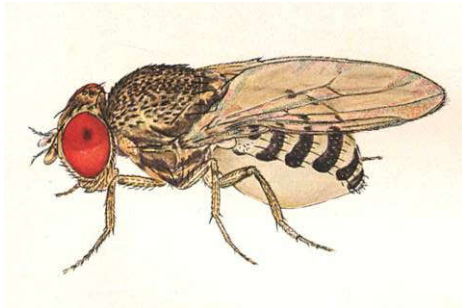


## Количество яиц, откладываемое мутантными самками

Генотип	Среднее кол-во откладываемых одной самкой яиц, шт./сут.
<i>Oregon R/Oregon R</i>	50,20
<i>Trl<sup>362(ex)</sup>/Trl<sup>362(ex)</sup></i>	7,96
<i>Trl<sup>362(ex)</sup>/Trl<sup>R85</sup></i>	7,94
<i>Trl<sup>en82</sup>/Trl<sup>en82</sup></i>	2,7
<i>Trl<sup>en82</sup>/Trl<sup>R85</sup></i>	2,4
<i>Trl<sup>362</sup>/Trl<sup>362</sup></i>	1,5
<i>Trl<sup>362</sup>/Trl<sup>R85</sup></i>	1,4

## Стадии гибели эмбрионов

*Trl<sup>362</sup>/Trl<sup>362</sup>*



*Стадии гибели эмбрионов:*

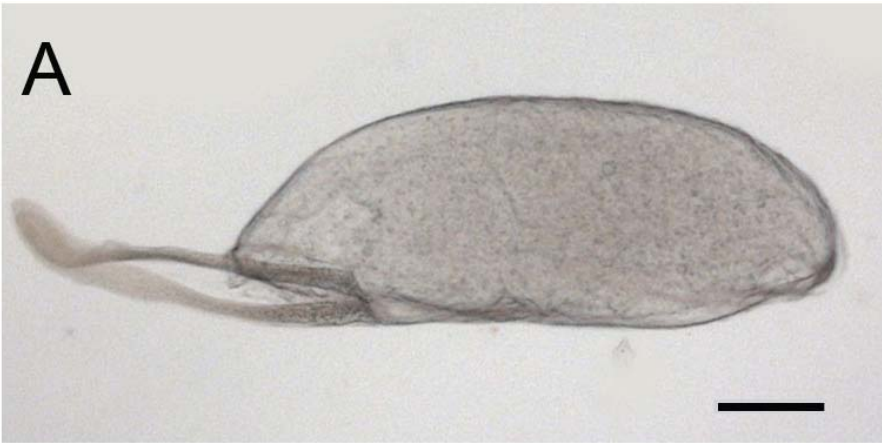
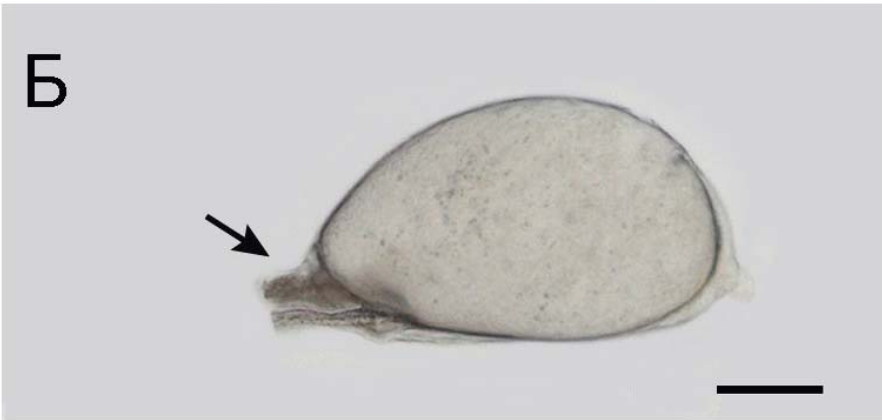
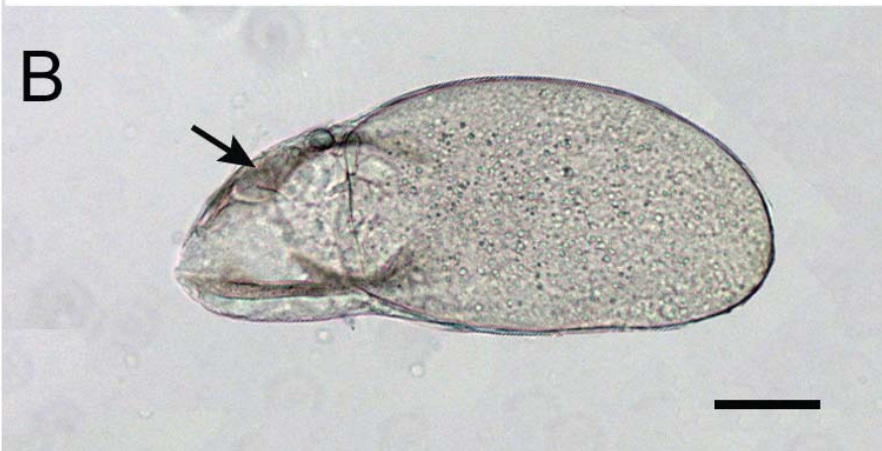
*60% на стадии синцитиальной  
бластодермы*

*18% в течение 8-12 стадии*

*6-8% на последних стадиях  
эмбриогенеза*

*14-16% стадия гибели определена  
не точно*

*Поскольку 60% эмбрионов гибнут до стадии целлюляризации,  
т. е. до начала зиготической транскрипции, есть основание предполагать,  
что гибель эмбрионов связана с нарушениями в оогенезе.*

**A****Б****В**

## Морфология яиц мух дикого типа и мутантов *Trl*

- А – дикий тип (размер яиц более 500 мкм)
  - Б – мутант *Trl<sup>en82</sup>/Trl<sup>R85</sup>* (размер яиц 320-400 мкм)
  - В – мутант *Trl<sup>362(ex)</sup>/Trl<sup>R85</sup>* (размер яиц 350-420 мкм )
- У всех мутантов значительно укорочены дорзальные выросты хориона (стрелка).

Масштаб 100 мкм.

# Изучение жизнеспособности мутантов

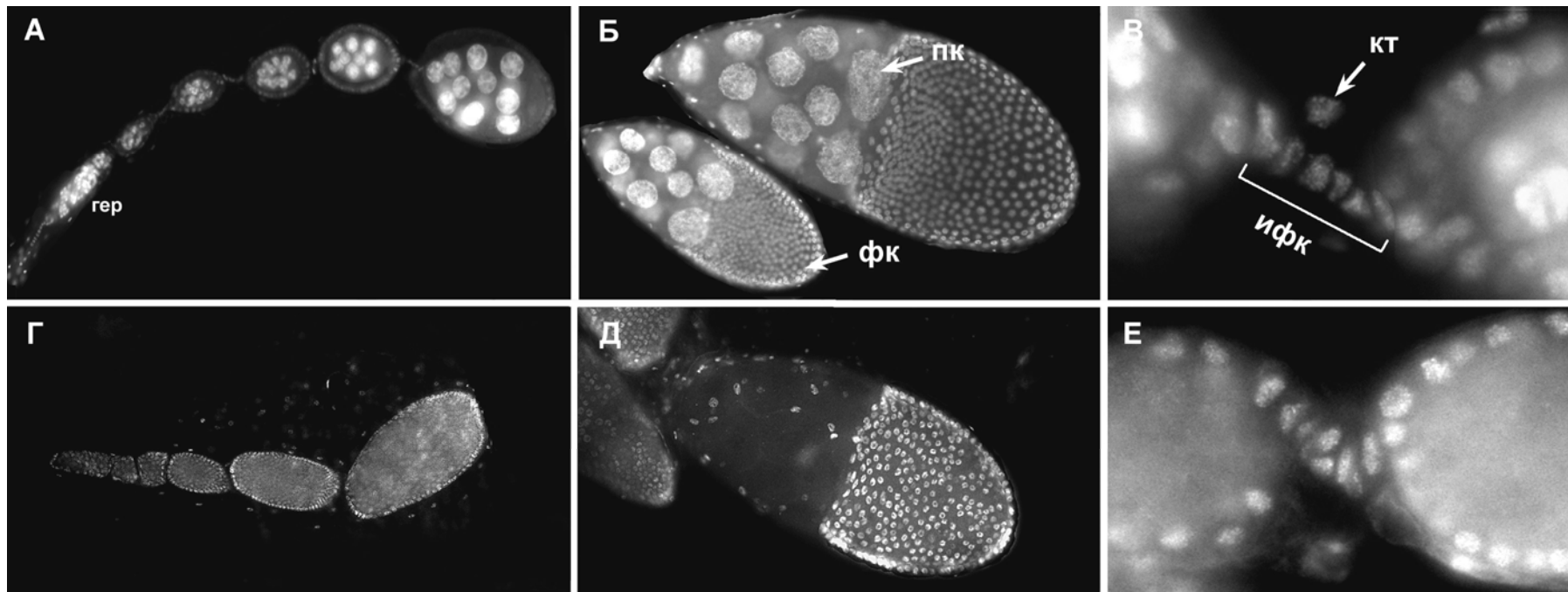
Относительная жизнеспособность особей генотипа  $M/TrI^{R85}$  при температуре 25 и 29°C, выраженная в процентах (%) от теоретически ожидаемого значения.

		$M/TrI^{R85}$
25°C	Oregon R	84,98±1,12
	$TrI^{362(ex)}$	70,76±1,37
	$TrI^{en82}$	71,32±3,72
	$TrI^{362}$	67±2,7
29 °C	Oregon R	62,98±1,45
	$TrI^{362(ex)}$	41,81±1,37
	$TrI^{en82}$	41,34±7,6
	$TrI^{362}$	20±1,6

# Локализация белка GAGA в яичниках взрослых мух дикого типа и мутантов

*Trl<sup>362</sup>*

Увеличение X20, X100

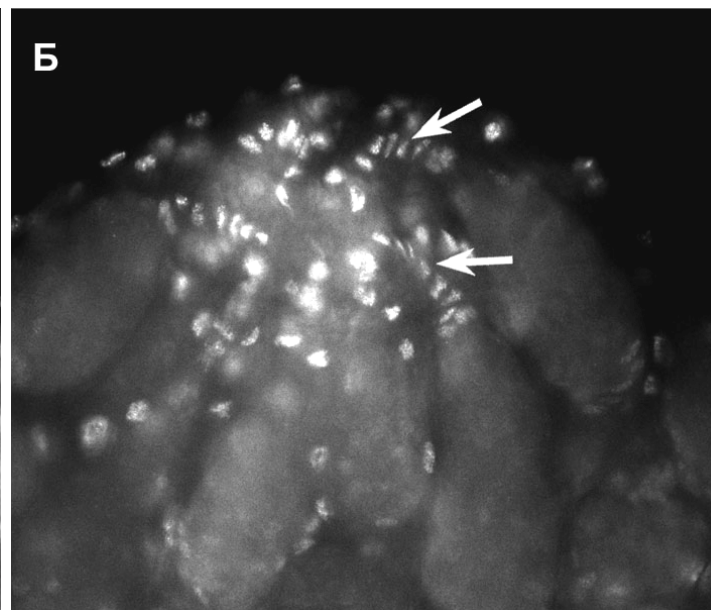
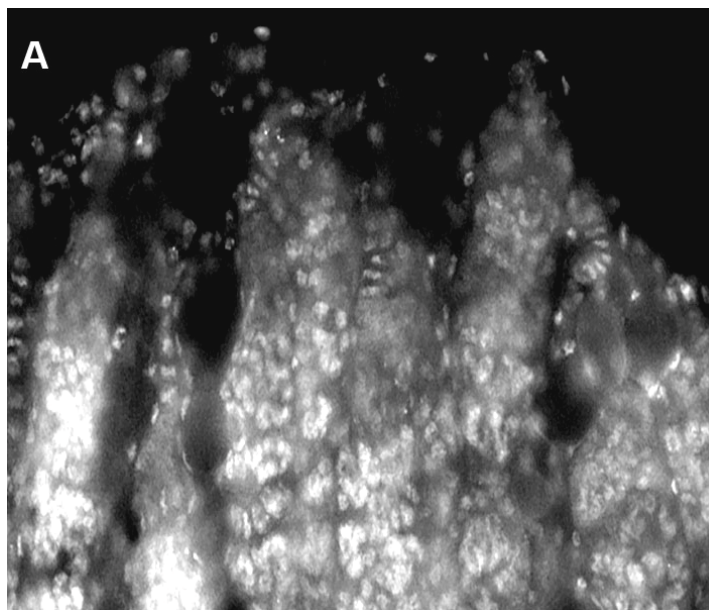


Значительно снижена экспрессия белка GAGA в ядрах питающих клеток. GAGA белок обнаруживается только в фолликулярных клетках.

фк - фолликулярные клетки, пак – питающие клетки, гер – гермарий, ифк – интерфолликулярные клетки, кт – клетки тунки.

Поликлональные антитела против белка GAGA были любезно предоставлены профессором В. Пирротта (V. Pirrotta) (Женевский Университет, Швейцария) (Poux et al., 2001).

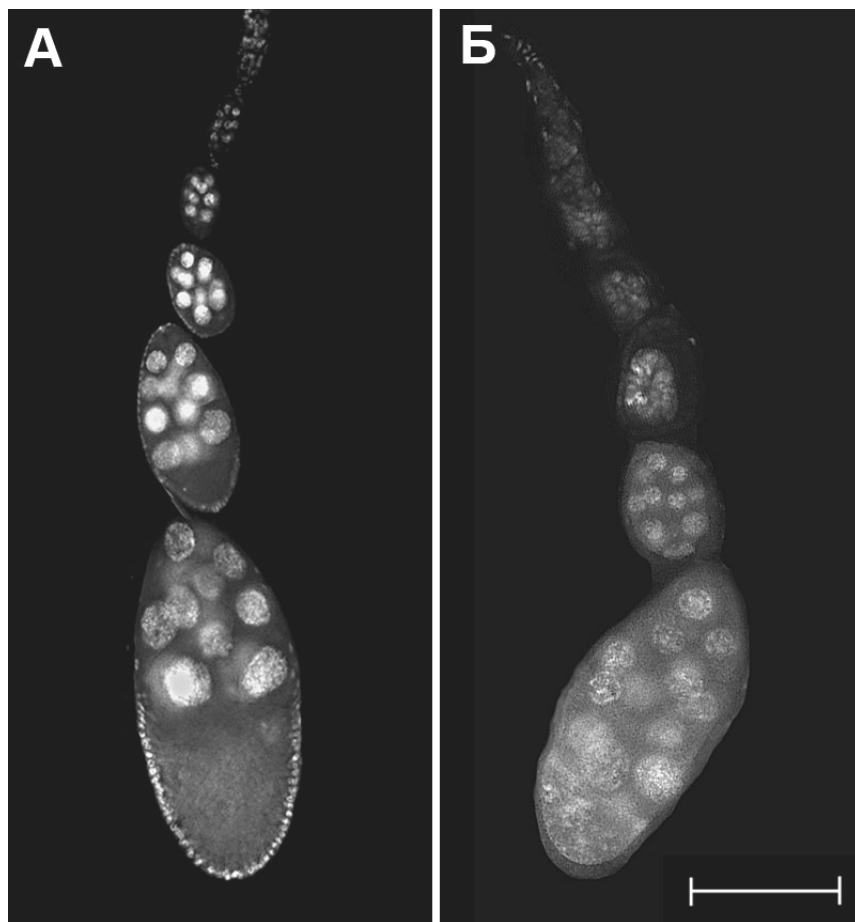
# Локализация белка GAGA в яичниках куколок мутантов *Trl<sup>362</sup>*



(А) Локализация белка GAGA в гонадах куколок дикого типа, белок выявляется как в половых, так и в соматических клетках.

(Б) Гонады куколок мутанта *Trl<sup>362</sup>*. Белок GAGA обнаруживается в терминальных филаментах (стрелки).

# Локализация белка GAGA в яичниках взрослых мух слабых гипоморфных мутантов



(А) *Trl<sup>362(ex)</sup>* количество белка не отличается от нормы.

(Б) *Trl<sup>en82</sup>* количество белка несколько снижено.



## ***Нарушение морфологии яичников Trl мутантов***

*Полученные мутации гена Trl влияют:*

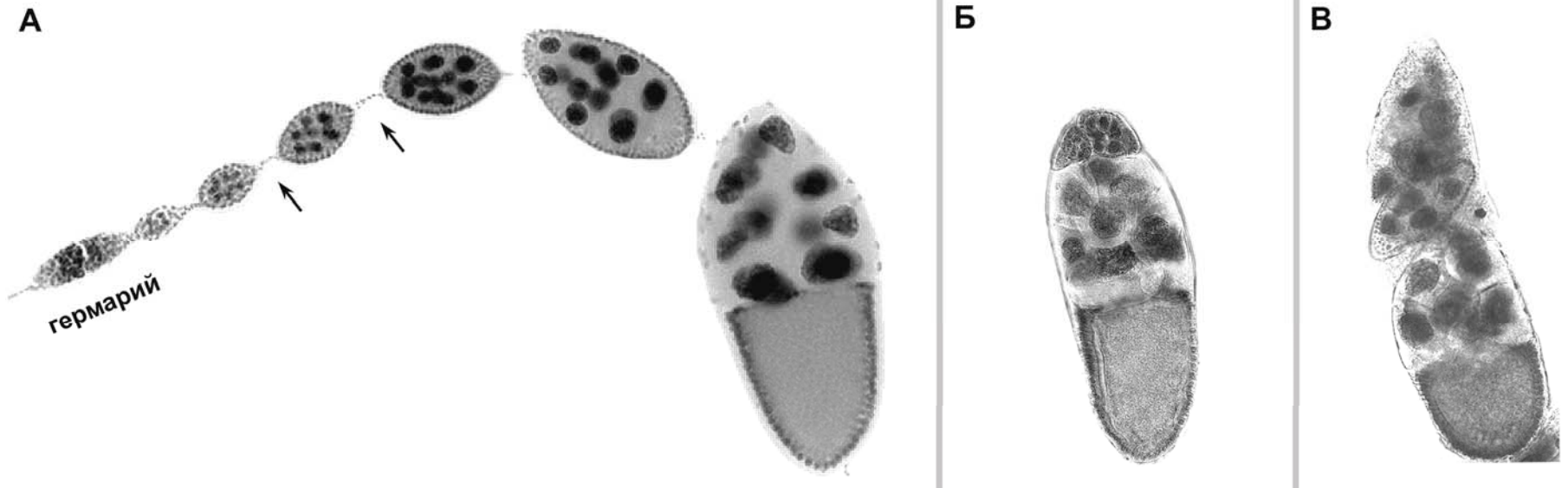
- 1. на структуру овариол*
- 2. на число и структуру половых клеток яичников;*
- 3. на формирование стадиеспецифических актиновых  
филаментов в половых клетках яичников;*
- 4. на функционирование соматических клеток.*



# Нарушение морфологии яичников *Trl*

● ● ● мутантов

(нарушение структуры овариол)



(A) – овариола яичников мухи дикого типа.

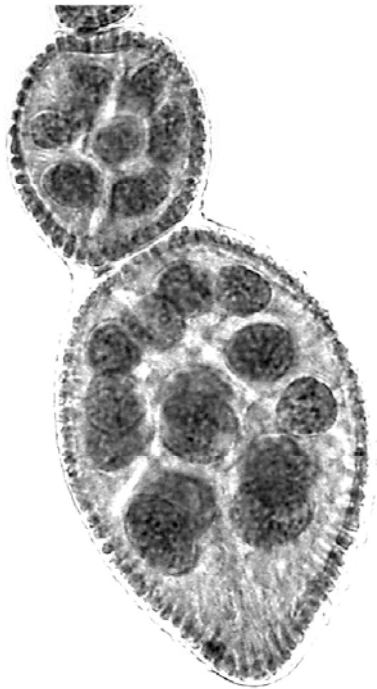
(Б, В) - морфология овариол *Trl<sup>362</sup>* мутантов.

Увеличение x40 для (A) и x20 для (Б, В).

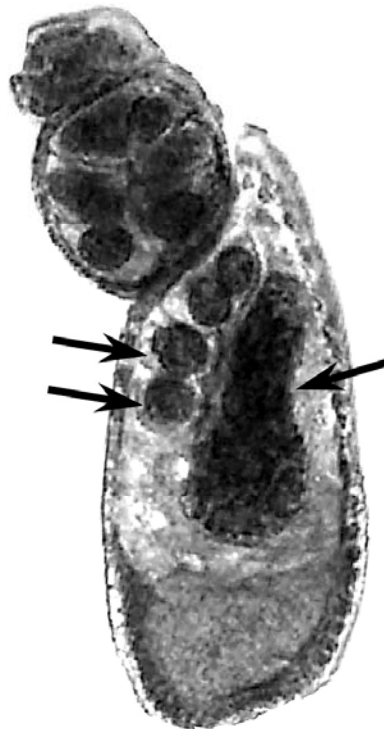
# Нарушение морфологии яичников *Trl*

● ● ● мутантов (нарушение числа половых клеток)

А



Б



В



(А) – яйцевые камеры яичников мухи дикого типа.

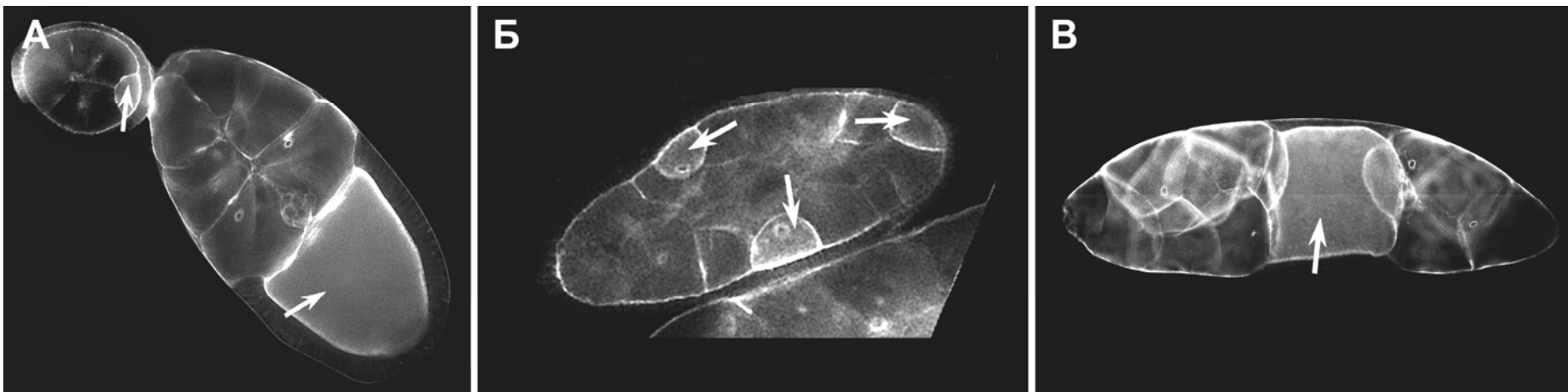
(Б, В) – яйцевые камеры *Trl<sup>362</sup>* мутантов.

## Нарушение числа питающих клеток в яйцевых камерах мутантов

Генотип	Число просчитанных камер, шт	Число камер с нарушениями, шт	% камер с нарушениями
Oregon R/ <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	415	13	3,13
<i>Trl</i> <sup>362(ex)</sup> / <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	361	70	19,39
<i>Trl</i> <sup>en82</sup> / <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	302	67	22,18
<i>Trl</i> <sup>362</sup> / <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	364	134	36,81

Самое большое число нарушений числа питающих клеток встречается у самого сильного гипоморфного мутанта *Trl*<sup>362</sup>

● ● ●  
**Нарушение морфологии яичников *Trl* мутантов (нарушение числа половых клеток)**



(А) – яйцевая камера яичников мухи дикого типа (виден один ооцит, стрелка)

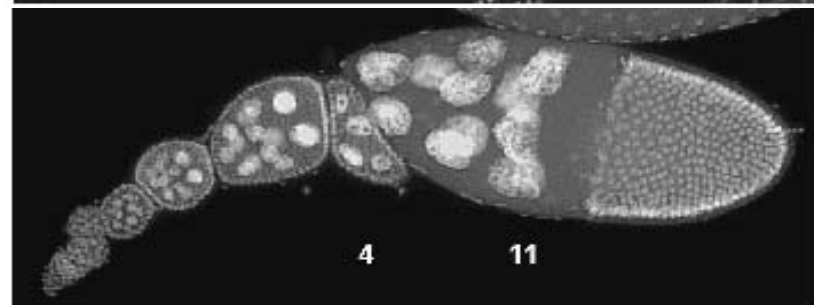
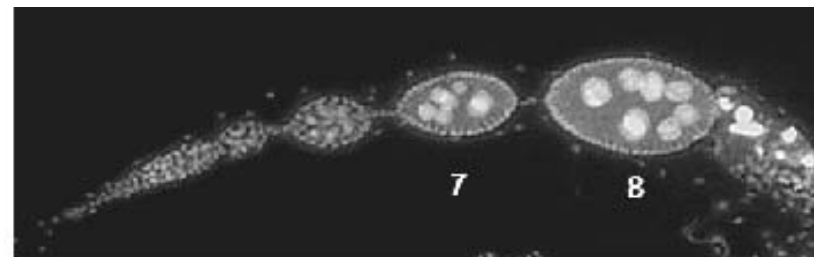
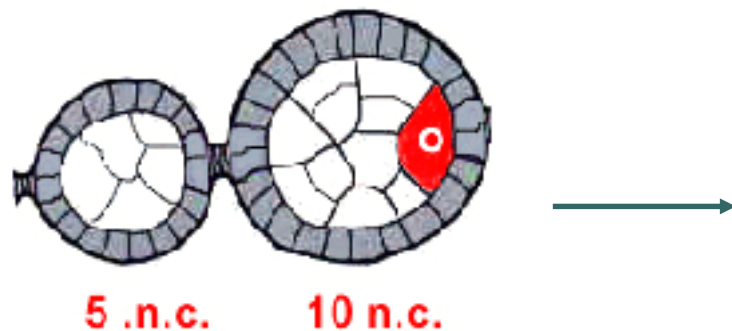
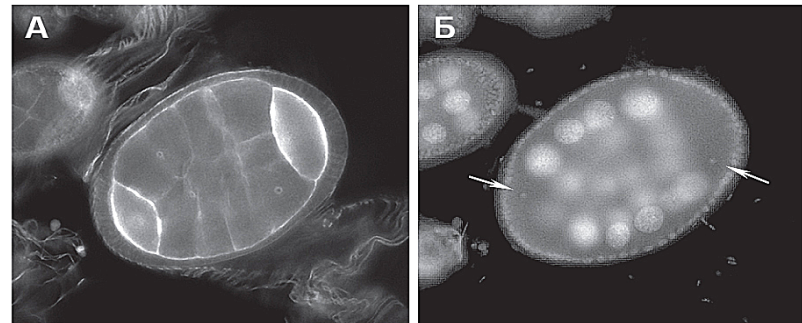
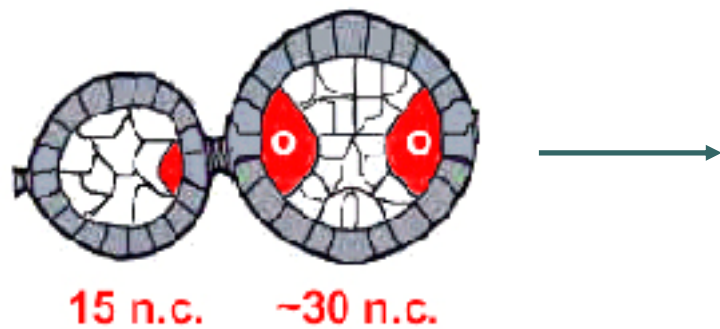
(Б, В) – яйцевые камеры *Trl*<sup>362</sup> мутантов.

Увеличение  $\times 40$  для (А) и  $\times 20$  для (Б, В).

● ● ● **Нарушение числа половых клеток в яйцевой камере может быть обусловлено:**

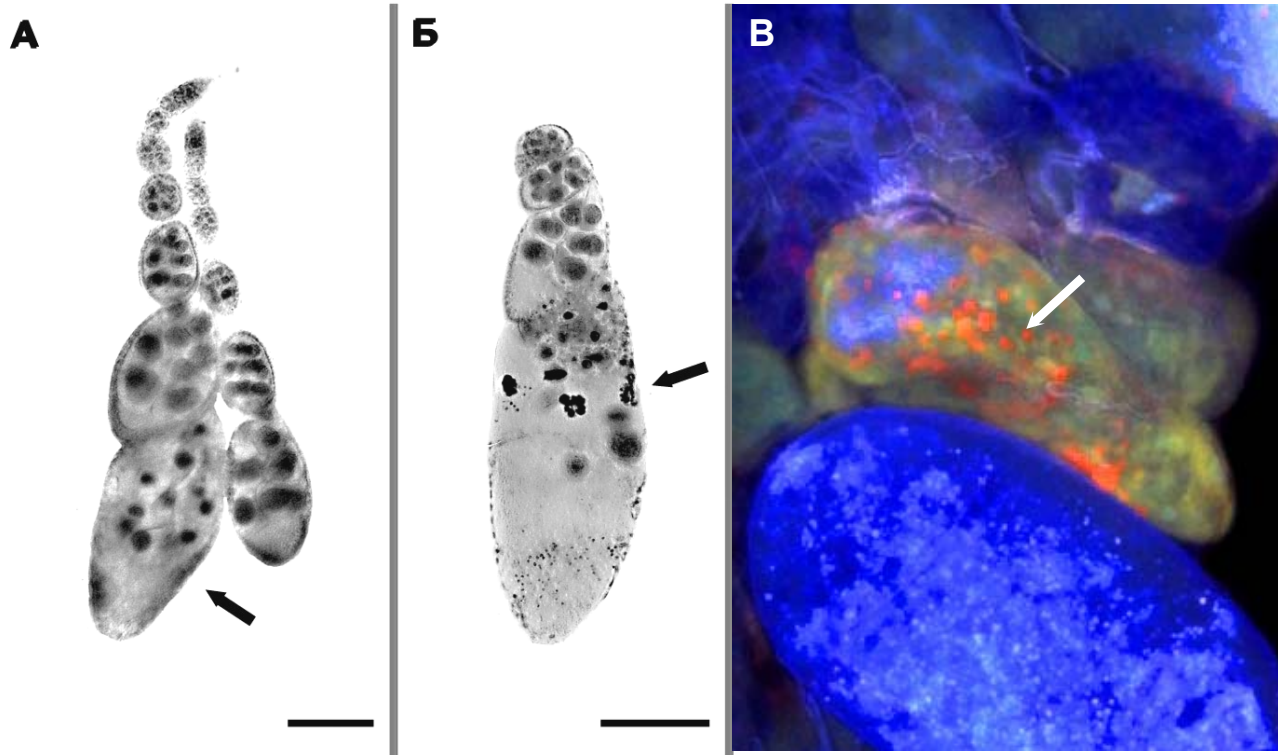
1. *Нарушением числа делений цистобласта в гермарию. При этом увеличивается процент камер с числом питающих клеток  $2^n - 1$ , где  $n$  - число раундов деления цистобласта  $n \neq 4$  (1, 3, 7, 31);*
2. *Нарушением обволакивания сформированной цисты фолликулярными клетками в гермарию. При этом сумма питающих клеток в соседних камерах кратна 15.*

# Нарушения в функционировании фолликулярных клеток у *Trl* мутантов

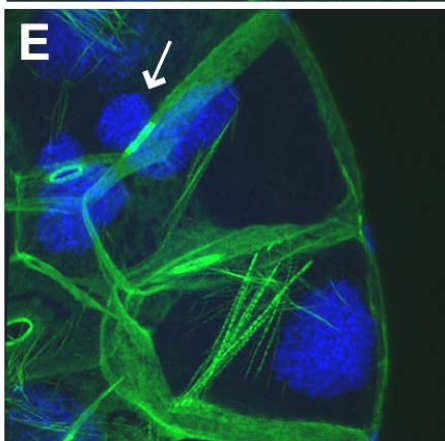
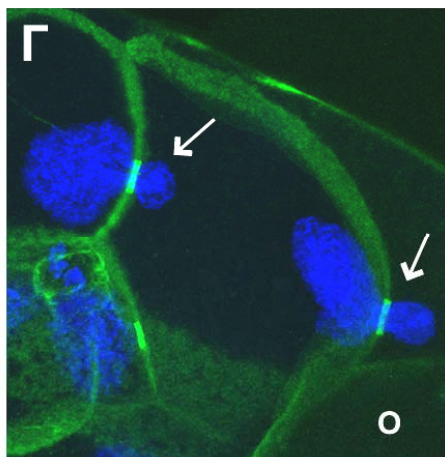
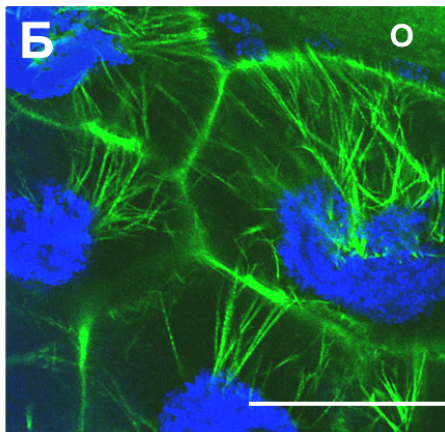
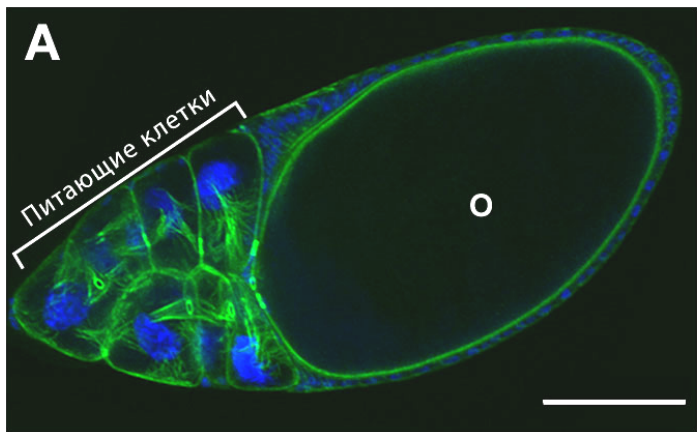


■ Фолликулярные клетки  
■ ооцит

# Аномальная конденсация хроматина у *Trl* мутантов.



(А) Овариола яичников дикого типа, аномальная конденсация (указана стрелкой) наблюдается в камере на стадии 8. (Б) Овариола *Trl* мутанта, аномальная конденсация (указана стрелкой) наблюдается на стадии 10. (В) Аномальная конденсация хроматина выявленная с помощью акридин оранжевого.



(А, Б) Яйцевая камера самок дикого типа.

(В, Г) Яйцевая камера самок *Trl*<sup>362</sup> мутанта

(Д, Е) Яйцевая камера самок *Trl*<sup>13C/Trl</sup><sup>EP(3)3609</sup>

О – ооцит.

Актиновые филаменты окрашены с помощью FITC-phalloidin, ядра - DAPI.

Стрелками указаны ядра питающих клеток, проползающие в кольцевые каналы.

А, И, Г масштаб - 100 мкм; Б, Г, Е масштаб - 50 мкм.



● ● ●

## Анализ числа камер с отсутствием цитоплазматических актиновых филаментов у *Trl* мутантов.

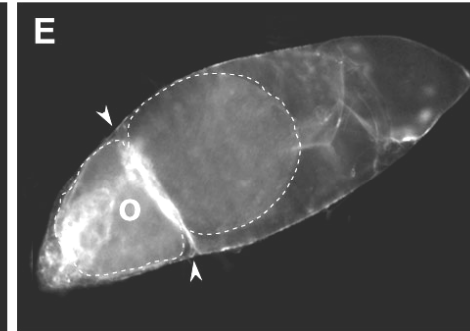
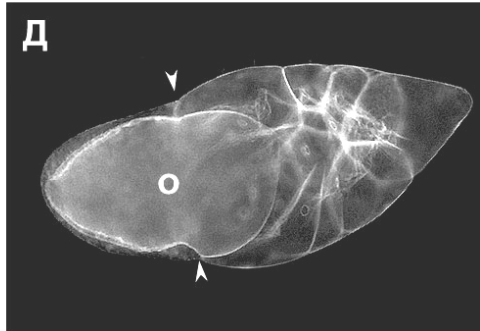
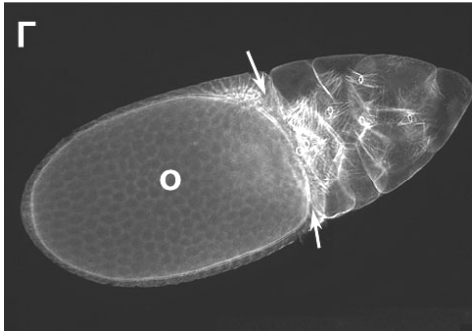
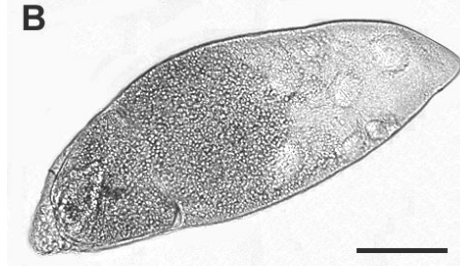
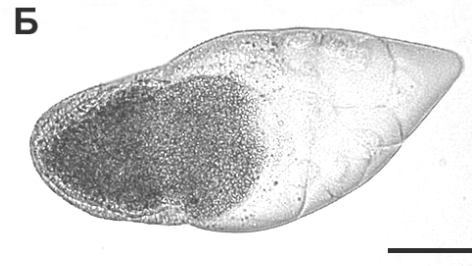
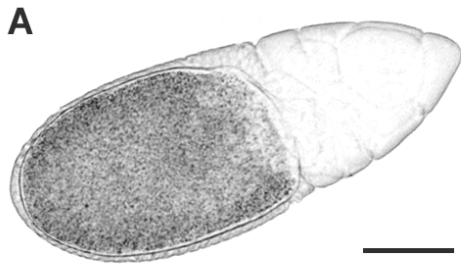
Генотип	Общее число просчитанных камер	Доля камер с нарушениями от общего числа просчитанных камер, %
<i>Trl</i> <sup>362(ex)</sup> / <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	667	5,24
<i>Trl</i> <sup>en82</sup> / <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	1281	9,35
<i>Trl</i> <sup>13C</sup> / <i>Trl</i> <sup>3609</sup>	1205	51,45
<i>Trl</i> <sup>362</sup> / <i>Trl</i> <sup>R85</sup>	1450	90,65

# Нарушение миграции фолликулярных клеток у *Trl* мутантов на поздних стадиях развития яйцевой камеры.

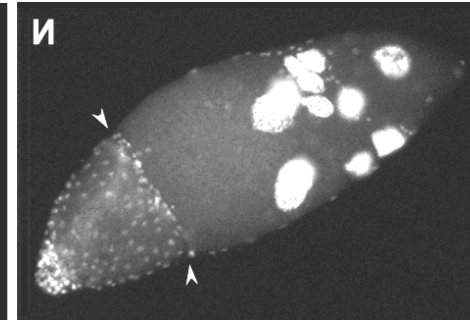
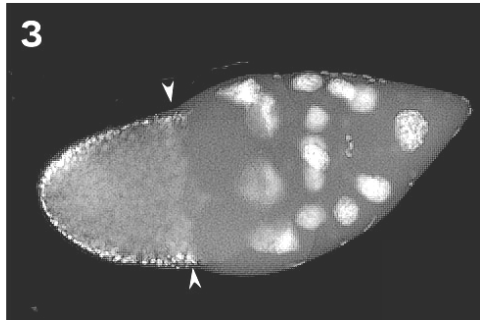
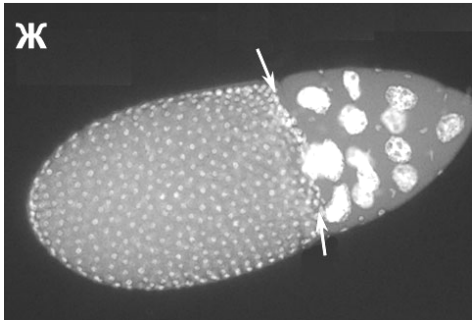
Дикий тип

*Trl<sup>en82</sup>*

*Trl<sup>362(ex)</sup>*



фаллоидин



DAPI

# Спасение фенотипа *Trl* мутантов трансгенными конструкциями, содержащими кДНК гена *Trl*

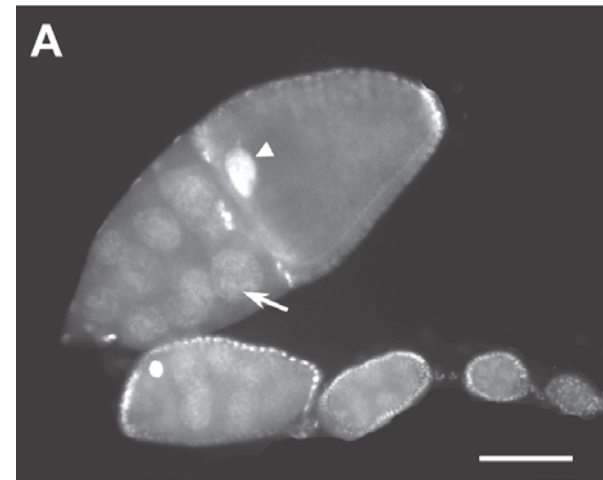
*Trl* мутанты



+ кДНК гена *Trl*



кДНК (*Trl*)/+; *Trl* мутанты



Яйцевые камеры ***Trl*<sup>362</sup>**  
гомозиготных самок  
после введения *hsp83*:  
*GAGA-519* трансгена

Линии, несущие *hsp83*:*GAGA-519* и *hsp83*:*GAGA-581* транспозоны, экспрессирующие кДНК гена *Trl*, любезно предоставлены Шедлом П. (Принстонский Университет, США) (Greenberg and Schedl, 2001).


# Спасение фенотипа *Trl* мутантов трансгенными конструкциями, содержащими кДНК гена *Trl*



Трансгены Генотип	1x <i>hsp83</i> : <i>GAGA-519</i>	2x <i>hsp83</i> : <i>GAGA-519</i>	1x <i>hsp83</i> : <i>GAGA-581</i>	2x <i>hsp83</i> : <i>GAGA-581</i>
<i>Trl</i> <sup>362(ex)</sup> / <i>Trl</i> <sup>362(ex)</sup>	фертильны		фертильны	
<i>Trl</i> <sup>en82</sup> / <i>Trl</i> <sup>en82</sup>	фертильны		фертильны	
<i>Trl</i> <sup>362</sup> / <i>Trl</i> <sup>362</sup>	фертильны (выживают единичные потомки)	фертильны	стерильны	стерильны

## Выводы:

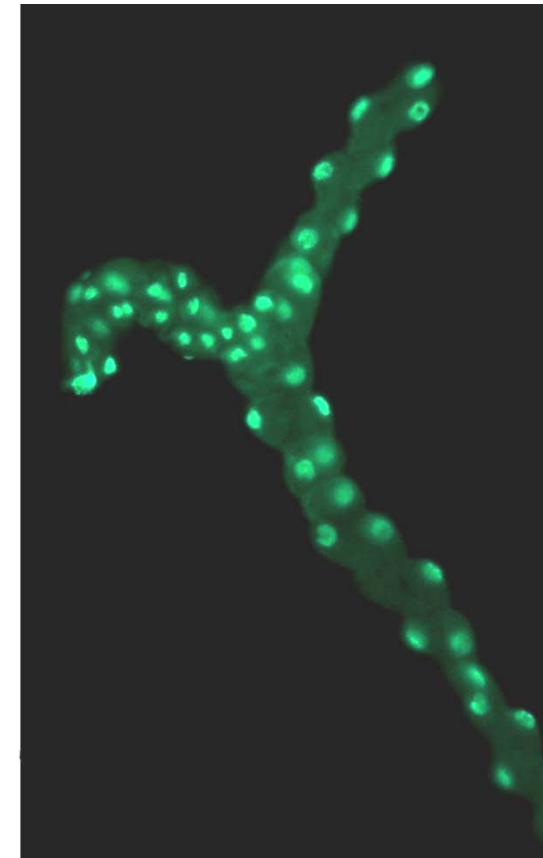
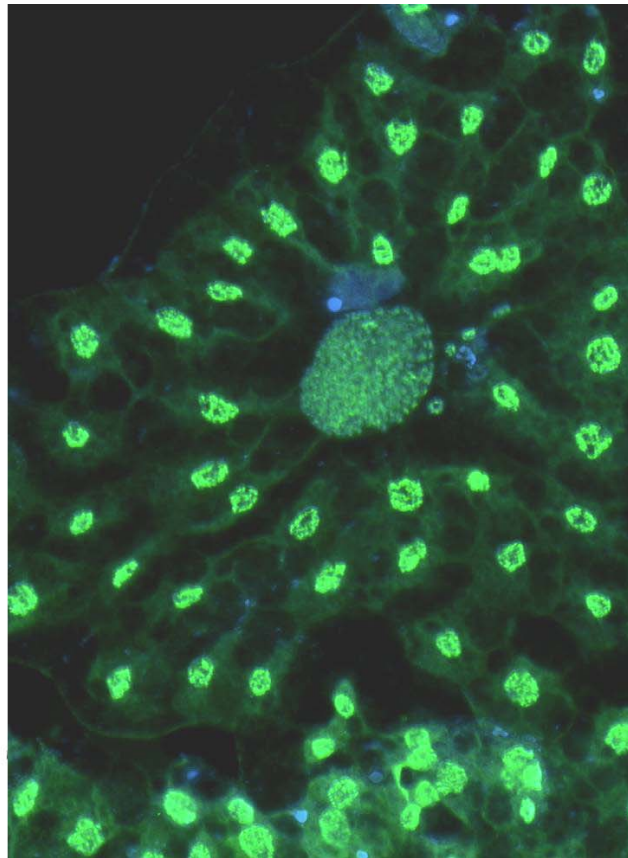
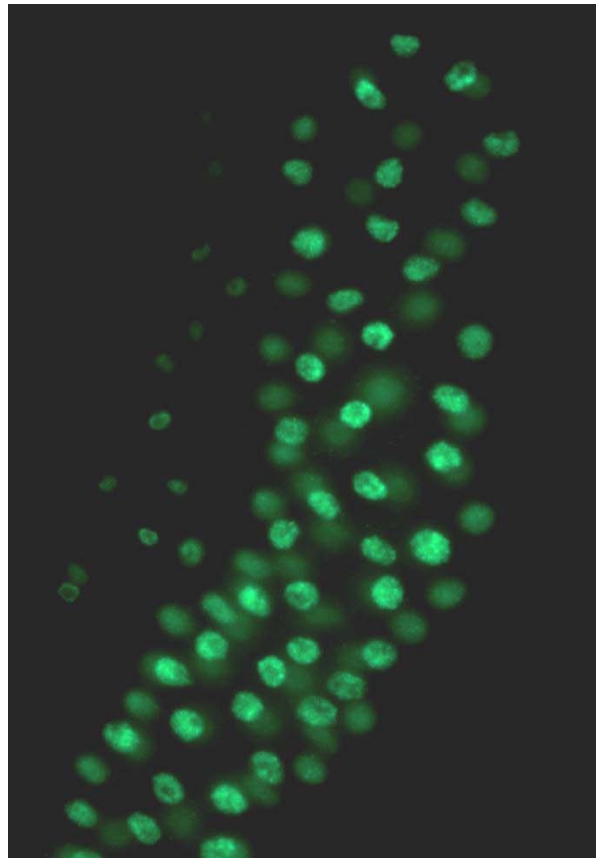
- 1) Получены и прокартированы новые гипоморфные мутации, затрагивающие 5'-область гена *Trl*. Мутация ***Trl*<sup>362</sup>** содержит Р-элемент в 5'-некодирующей области гена (в позиции 2979) и прилегающую к нему делецию размером 97 пар нуклеотидов (2979-3076). Делеция удаляет два первых сайта инициации транскрипции, используемых в яичниках. Мутация ***Trl*<sup>362(ex)</sup>** содержит такую же делецию в 5'-некодирующей области гена, как и мутация *Trl*<sup>362</sup>, но не содержит Р-элемент.
- 2) Проведено картирование мутации ***Trl*<sup>en82</sup>**, которая обусловлена инсерцией Р-элемента размером 1,4 т.п.н. в 5'-некодирующую область гена *Trl*, в позицию 2997.
- 3) Показано, что вышеперечисленные мутации приводят к стерильности самок, как в гомозиготном состоянии, так и в сочетании с нуль-аллелем, в то время как самцы таких генотипов фертильны.

- 
- 4) Проведен анализ экспрессии гена *Trl* в яичниках мутантов. В яичниках самок *Trl<sup>362</sup>* экспрессия гена *Trl* снижена как минимум в 10 раз. Транскрипция гена *Trl* в яичниках гомозиготных *Trl<sup>en82</sup>* мутантных самок снижена приблизительно на треть, тогда как в яичниках *Trl<sup>362(ex)</sup>* мутантов экспрессия гена практически не отличается от нормы.
- 5) Показано, что у всех *Trl* мутантов в той или иной степени нарушена морфология овариол и яйцевых камер. Яйцевые камеры мутантов характеризуются отличным от нормы числом половых клеток, в питающих клетках зафиксированы нарушения в формировании цитоплазматических актиновых филаментов. На поздних стадиях развития яйцевой камеры у мутантов выявлены нарушения в функционировании соматических клеток.
- 6) Введение конструкций, экспрессирующих кДНК гена *Trl*, в геном мутантов приводит к восстановлению фертильности самок, что свидетельствует о том, что именно изменение в экспрессии гена *Trl* является причиной выявленных нарушений в оогенезе.



*Спасибо за внимание!*


# Локализация белка GAGA в органах и тканях соматического происхождения



Слюнная железа, жировое тело и Мальпигиевый сосуд личинок 3-го возраста. Экспрессия не отличается от Oregon R. Наблюдается ядерная локализация GAGA белка.

Увеличение X20, X40





## **Нарушение цитоплазматических актиновых филаментов в питающих клетках мутантов**

*При анализе на конфокальном микроскопе было показано, что GAGA сам по себе не является структурным компонентом актиновых филаментов*

*Гены-мишени для GAGA белка:*

*Act5C* - кодирует цитоплазматическую изоформу  
актина

*chicadee*  
*caping protein beta*  
*bifocal* } - кодируют актин связывающиеся белки

