

**УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ  
НАУК ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН**

**Федорова Е.В.**

**Получение и анализ мутаций, затрагивающих  
второй интрон гена *Trithorax-like Drosophila melanogaster***

Генетика – 03.00.15

представление диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

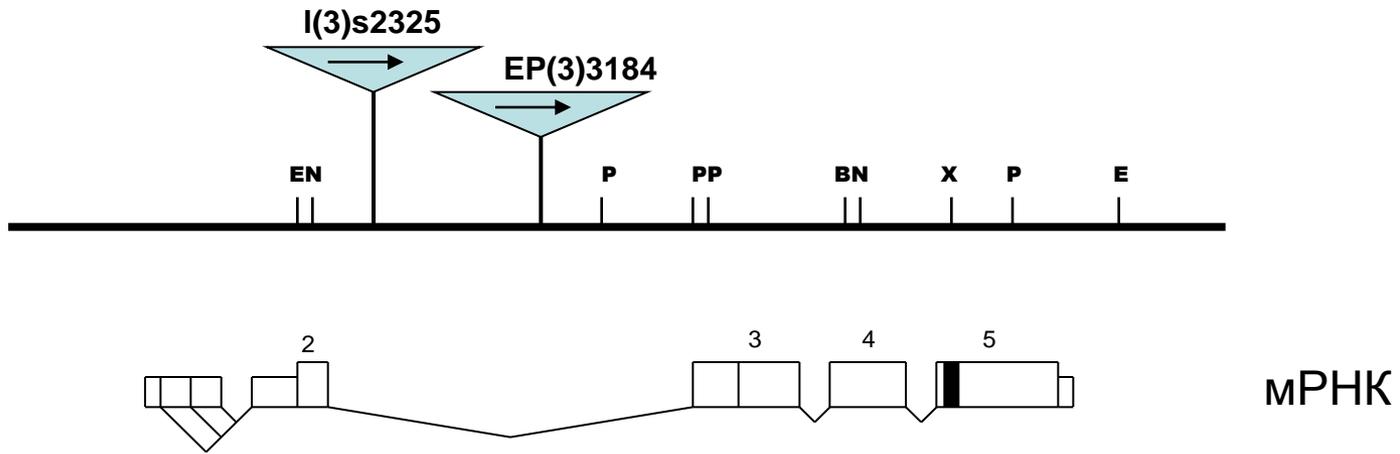
**Научный руководитель:  
к.б.н. Баричева Э.М**

2009

**Цель:** выявление и анализ функционально-значимых районов второго интрона гена *Trithorax-like D.melanogaster*.

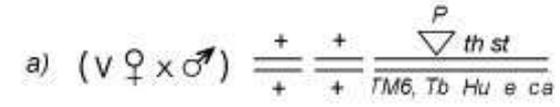
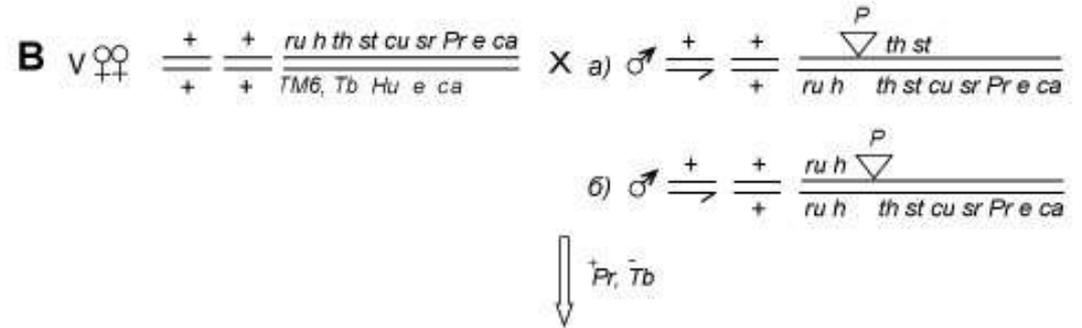
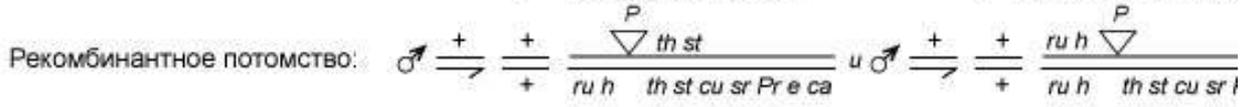
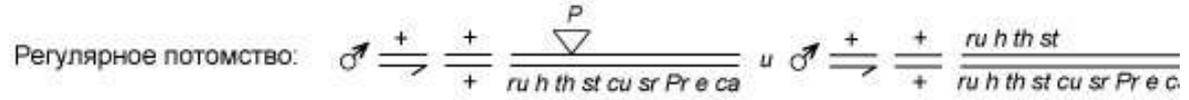
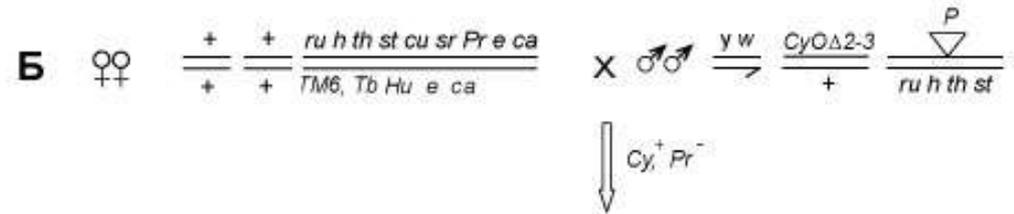
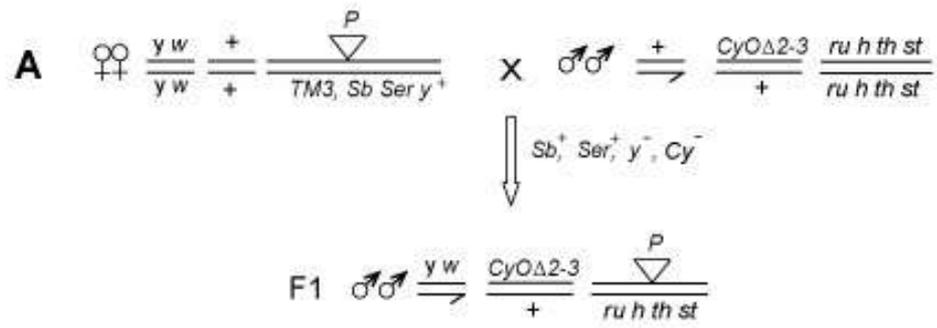
**Задачи :**

1. Получение и картирование мутаций, затрагивающих второй интрон гена *Trl D.melanogaster*.
2. Молекулярно-генетический анализ полученных мутантов :
  - а) исследование влияния этих мутаций на выживаемость дрозофил при различных температурах содержания мух;
  - б) изучение уровня экспрессии гена *Trl* у мутантов.
3. Идентификация и анализ функционально-значимых участков второго интрона гена *Trl* :
  - а) выявление эволюционно-консервативных последовательностей во втором интроне гена *Trl*;
  - б) выявление сайтов связывания белка GAGA во втором интроне и изучение связывания рекомбинантного белка GAGA и белков эмбриональных ядерных экстрактов с выявленными сайтами.

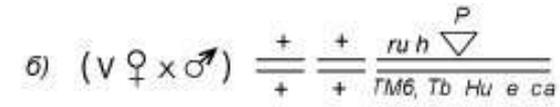


Треугольниками обозначено место встройки *P*-элемента, стрелка внутри треугольника указывает ориентацию транспозона.

Схема получения перестроек по гену *Trl* с помощью *P*-элемент индуцированной рекомбинации у самцов



Вывод в линию



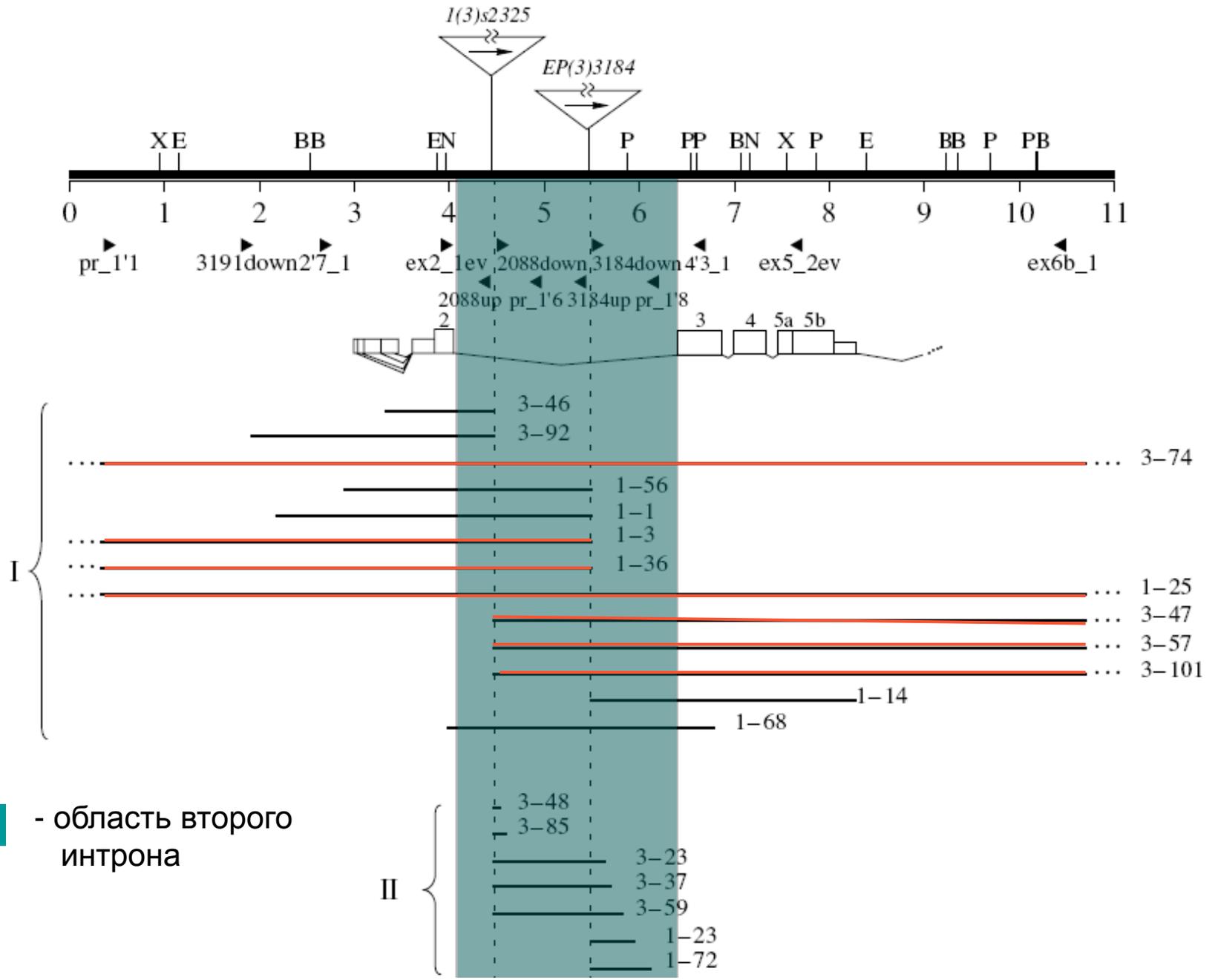
Просмотрено 32 013 потомков скрещивания Б (в двух экспериментах)

# Результаты экспериментов по получению мутаций гена *Trl* с помощью *P*-элемент-индуцированной рекомбинации у самцов



Всего получено 158 линий → 23 мутации по гену *Trl*:

- 13 делеций затрагивают и кодирующую область гена;
- 7 делеций затрагивают только второй интрон гена;
- 3 дупликации



фрагмент карты Бриджеса

Oregon R

# Цитологическое картирование делеций, затрагивающих ген *Trl*

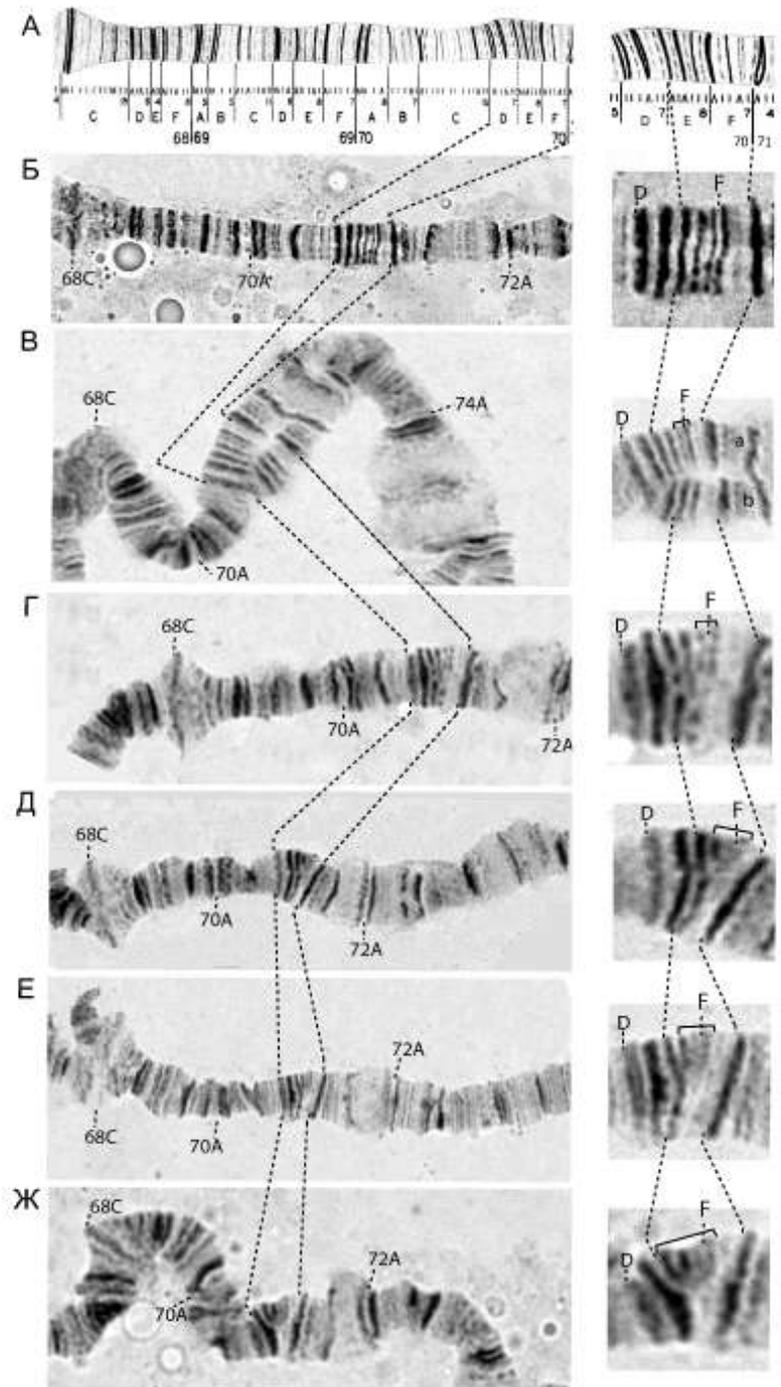
*Trl*<sup>3-74</sup>

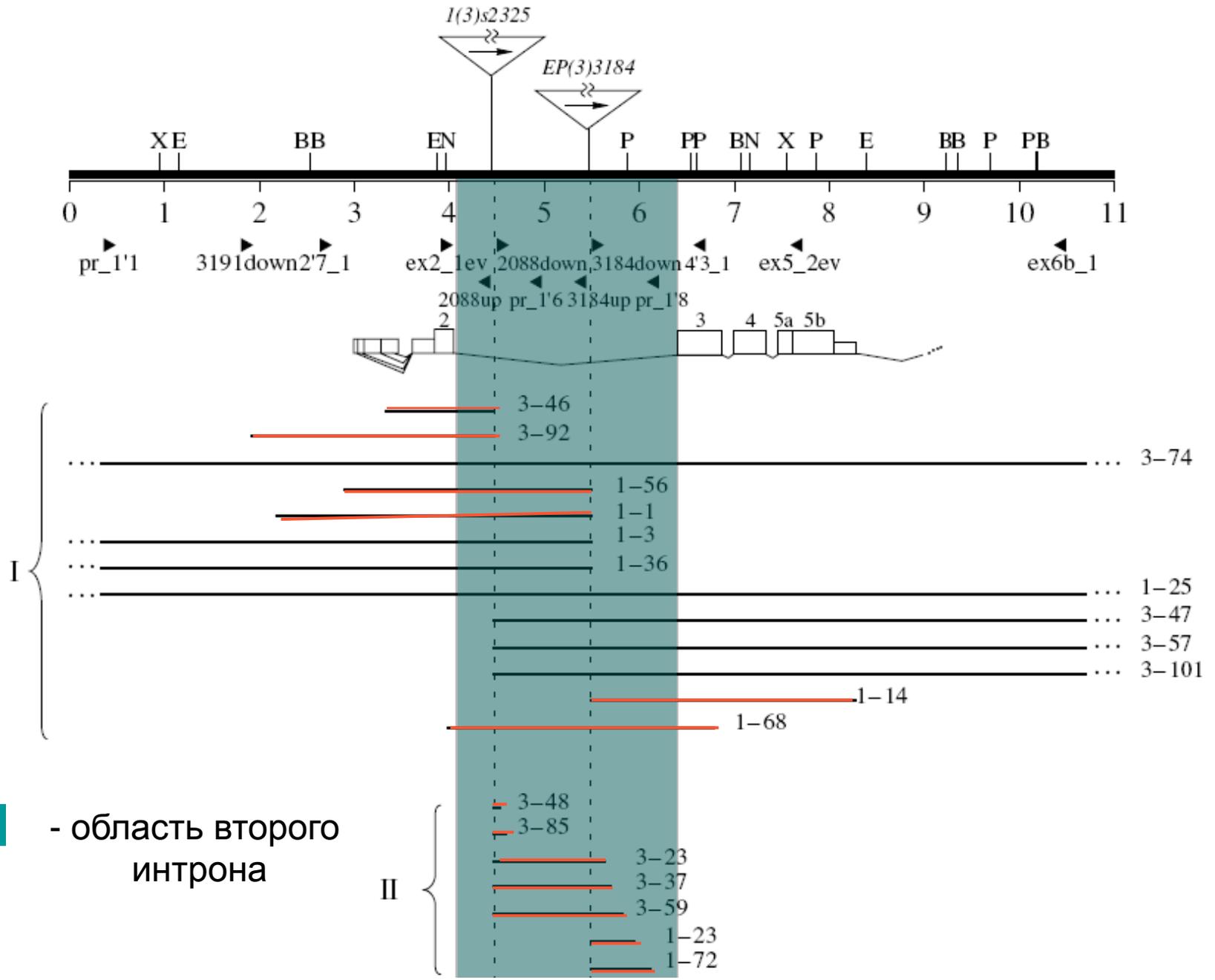
*Trl*<sup>3-47</sup>

*Trl*<sup>1-25</sup>

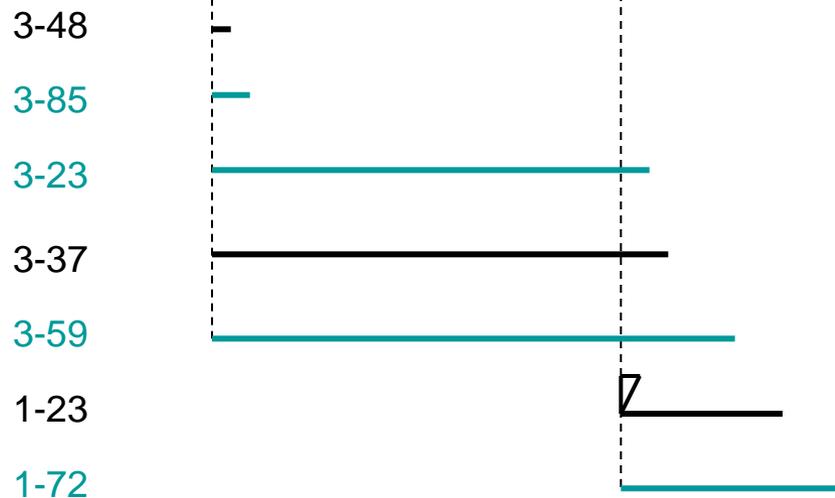
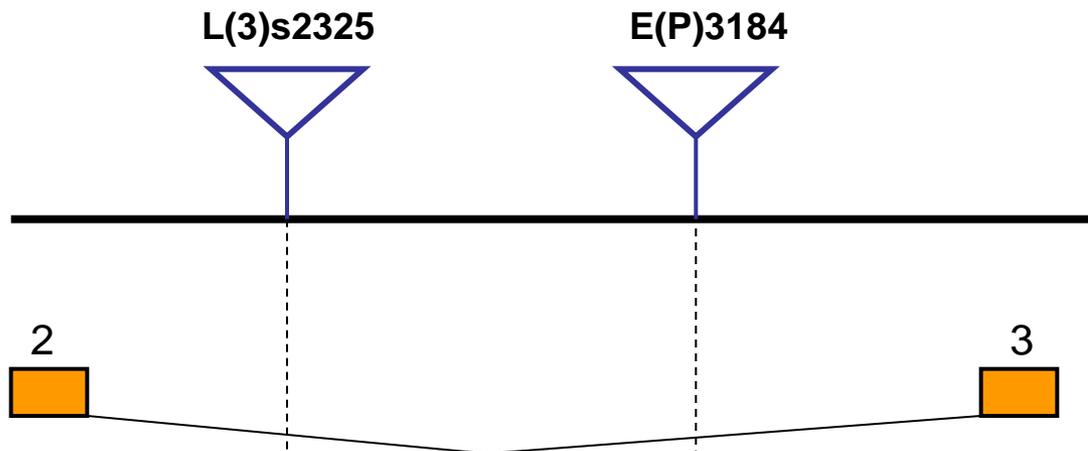
*Trl*<sup>3-57</sup>

*Trl*<sup>3-101</sup>





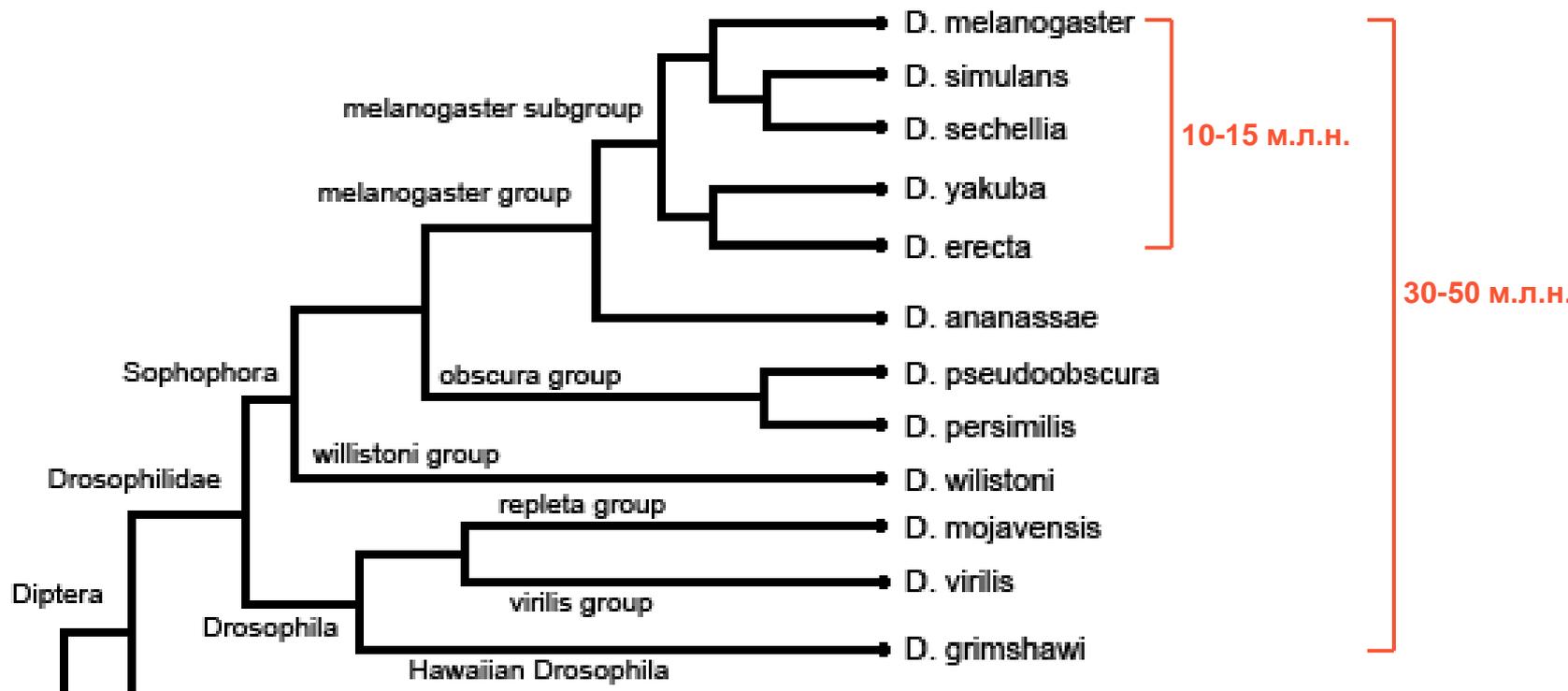
# Делеции, удаляющие различные фрагменты второго интрона гена *Trl*



Выживаемость мутантов при различной температуре развития (в % от теоретически ожидаемого значения)

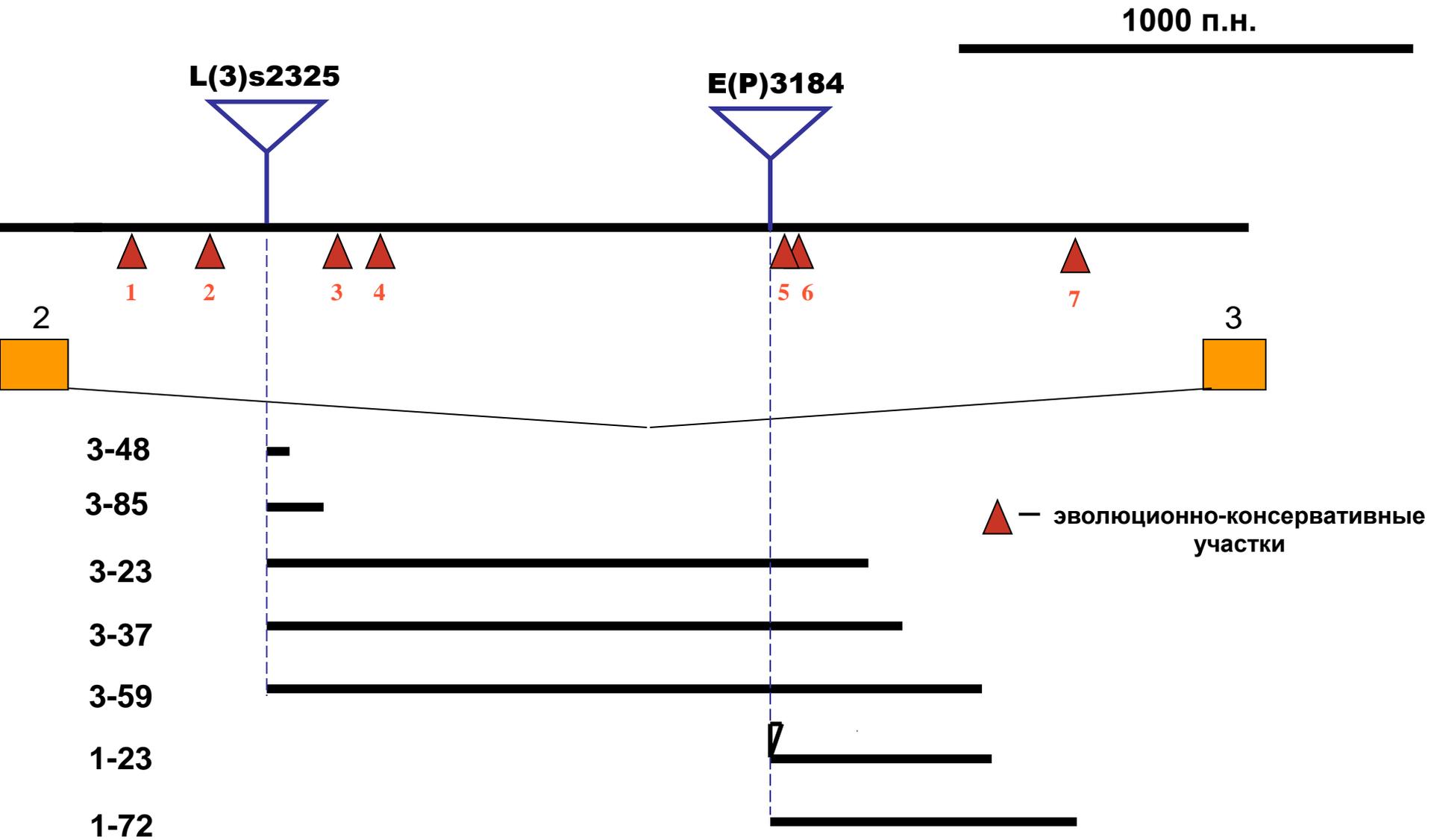
Линия	25°C	29°C
3-85	63 1,7***	51 3,4 ндр
3-23	57 1,5***	40 1,2***
3-59	53 1,3***	35 1,4***
1-72	76 1,5***	12 0,9***
Oregon R	85 1,1	56 1,5

\*\*\* – Отличие от контроля (*Trl*<sup>R85</sup>/Oregon R) при P<0,001;  
ндр – нет достоверного различия



**Виды дрозофил, геномные последовательности которых были использованы для поиска эволюционно-консервативных районов второго интрона гена *Trl***

# Делеции, удаляющие различные фрагменты второго интрона гена *Trl*



№ 1, длиной 23 п.н.

```

d_melanogaster GCGATTGGATTTCCTCTGTTTACAAACTGTACCGA
d_simulans GCGATTGGATTTCCTCTGTTTACAAACTGTACCGA
d_sechellia GCGATTGGATTTCCTCTGTTTACAAACTGTACCGC
d_yakuba GCGATTGGATTTCCTCTGTTTACAAACTGTACCGC
d_erecta GCGATTGGATTTCCTCTGTTTACAAACTGTACCGC
d_ananassae GCGATTGGATTTCCTCTGTTTACAAACTGTACCGC
d_pseudoobscura GCGA-TGGGTTTCTCTGTTTACAAACTGTACCGC
d_persimilis GCGA-TGGGTTTCTCTGTTTACAAACTGTACCGC
d_willistoni - - - - - TTTCTCTGTTTACAAACTGTACCGC
d_virilis ACGACTTGATTTCCTCTGTTTACAAACTGTACCGC
d_mojavensis ACGATTGATTTCCTCTGTTTACAAACTGTACCGC
    
```

№ 2

```

d_melanogaster GGGCGGAGCCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_simulans GGGCGGATCCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_sechellia GGGCGGATCCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_yakuba GGGCGGAGCCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_erecta GGGCGGAGCCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_ananassae GGGCAGCGCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_pseudoobscura GAGATGGCGCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_persimilis GAGATGGCGCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_willistoni GCGCTGGCCCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_virilis GCGCTGGCGCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_mojavensis GAGCTGGCGCACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
d_grimshawi GGGCTGTGCACACTCATTCAACTCAATTGACAGTGG
    
```

№ 3, длиной 20 п.н.

```

d_melanogaster TTTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_simulans TTTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_sechellia TTTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_yakuba TTTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_erecta TTTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_ananassae ATTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGG
d_pseudoobscura TTTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_persimilis TTTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_willistoni CTTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_virilis GCTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_mojavensis ATTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
d_grimshawi GCTTGGCGCTCTCGTTTGGCGCTCGCTCTAACACATGCGA
    
```

№ 4, длиной 19 п.н.

```

d_melanogaster TGTGAGAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_simulans TGTGAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_sechellia TGTGAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_yakuba TGTGAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_erecta TGTGAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_ananassae AGCAAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_pseudoobscura AGCAAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_persimilis AGTGAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_willistoni CACAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_virilis CACAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
d_mojavensis CACAAAAAAGAGGTCGGCGCTCGTGTGCACCCA
    
```

№ 5, длиной 17 п.н.

```

d_melanogaster CTTTTCGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_simulans CATTTTCGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_sechellia CATTTTCGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_yakuba CATTTTGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_erecta CATTTTCGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_ananassae CATTTTGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_pseudoobscura TATTTTGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_persimilis TATTTTGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_willistoni TBTTTTGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_virilis - - - - - GCTTTCGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_mojavensis GGBCCAGCGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
d_grimshawi TGCCCTGGACTCTTGCAGAGTTCAACAGCCGCATTGGTCCCGT
    
```

№ 6, длиной 18 п.н.

```

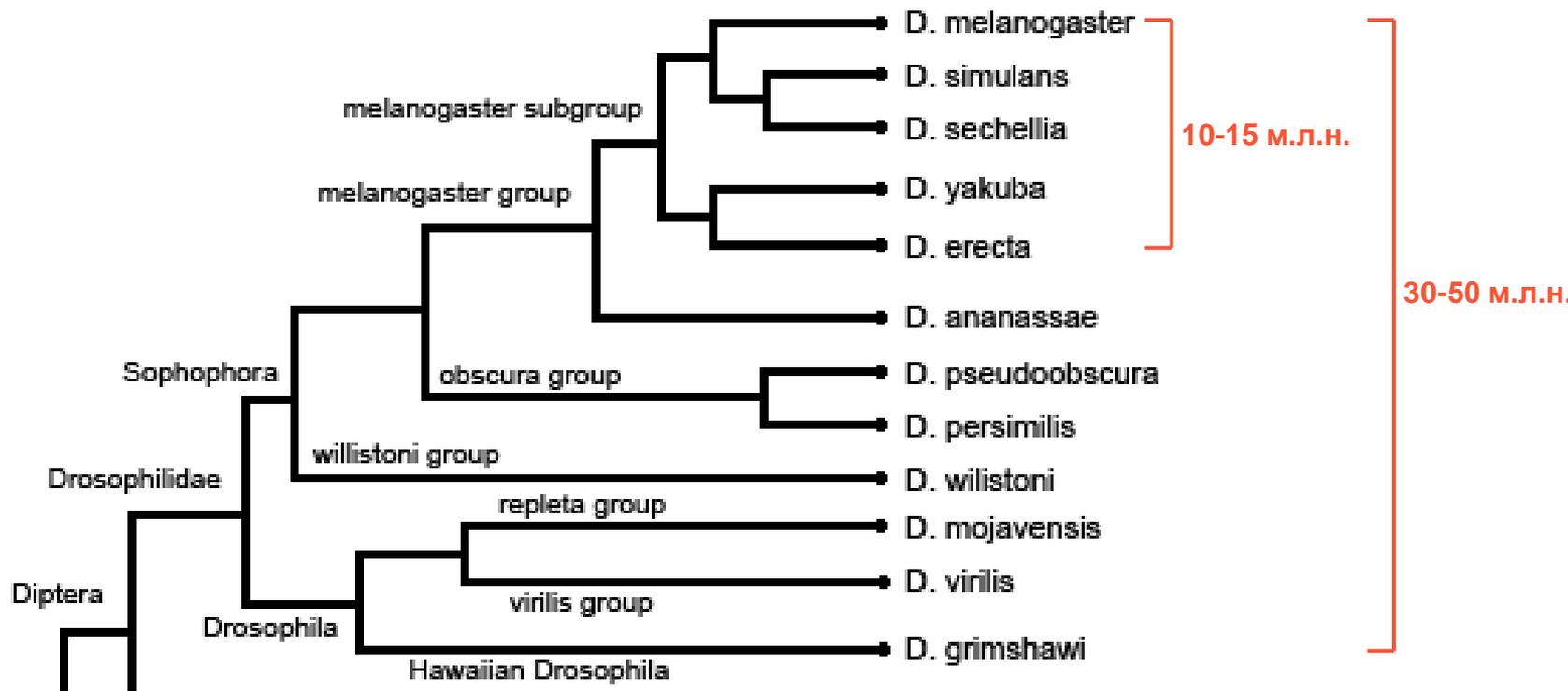
d_melanogaster GCGTGCCTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACAT
d_simulans GCGTGCCTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACAT
d_sechellia TCCTGCCTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACAT
d_yakuba GCGTGCCTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACAT
d_erecta GCGTGCCTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACAT
d_ananassae GCGTGCCTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACAT
d_pseudoobscura GC-CGCGTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACCG
d_persimilis GC-CGCGTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACCG
d_willistoni CCTATGTTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACAG
d_virilis GCGTGTGTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACAT
d_mojavensis GCGTGTGTGTGTGAGTGTACAGAGATCAGTACAT
    
```

№ 7

```

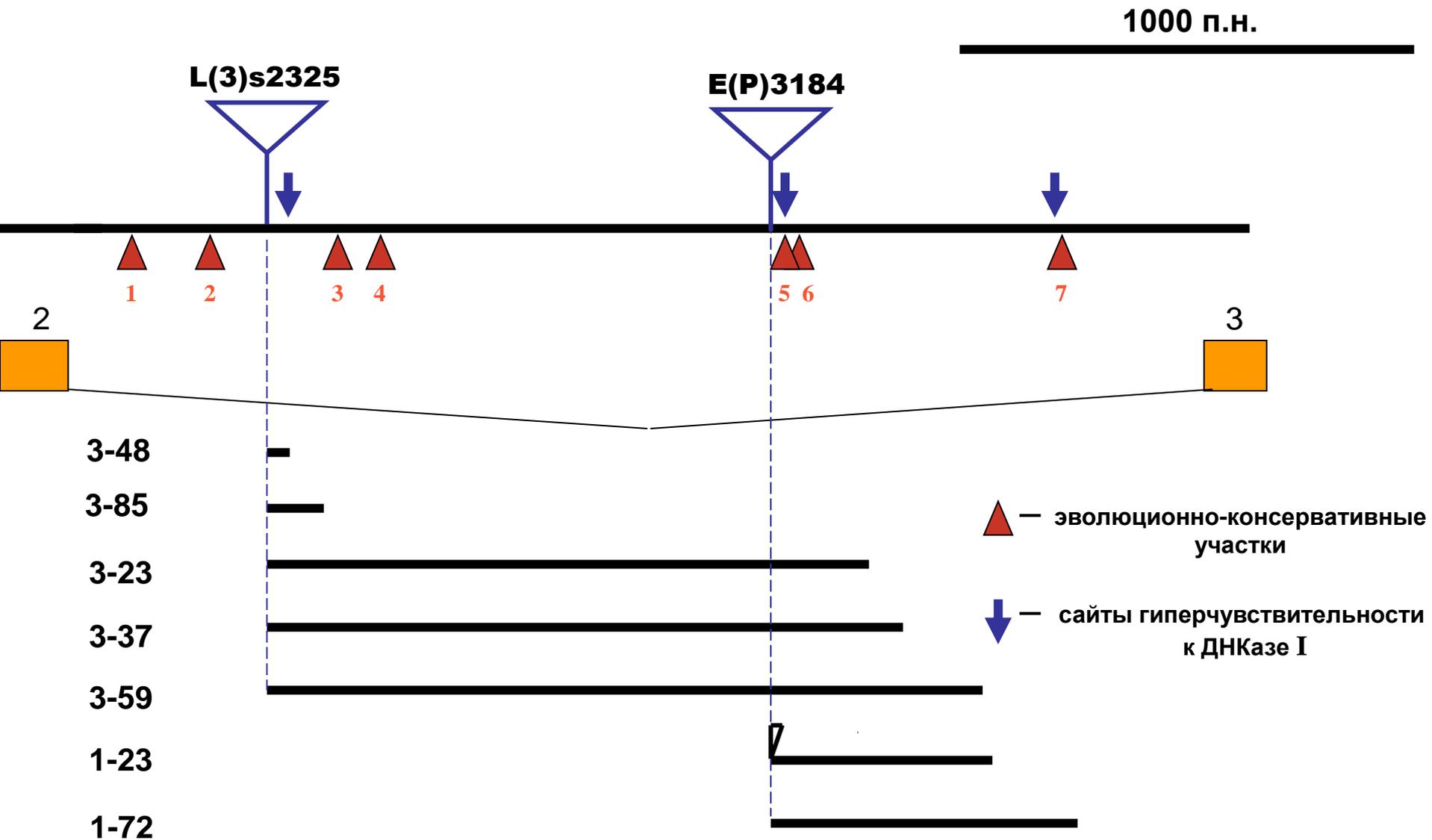
d_melanogaster AAGACAAACCGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_simulans AAGACAAACCGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_sechellia AAGACAAACCGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_yakuba AAGACAAACCGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_erecta AAGACAAACCGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_ananassae - - - - - AACCAGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_pseudoobscura ATGCCAAACCGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_persimilis ATGCCAAACCGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_willistoni - - - - - AACCAGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_virilis acaAACCAGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_mojavensis AAGTAAACCAGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
d_grimshawi acaAACCAGGCTTTTACTTTTGGCGCTCTGCACA
    
```

(<http://www.genome.ucsc.edu> -  
**UCSC Genome Bioinformatics Site**)



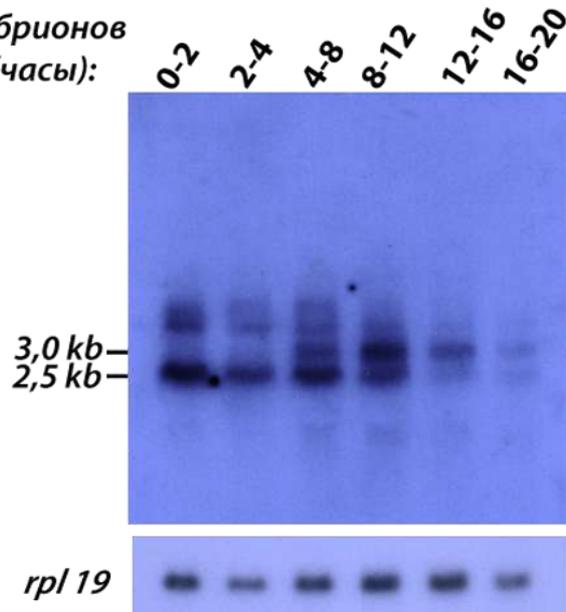
**Виды дрозофил, геномные последовательности которых были использованы для поиска эволюционно-консервативных районов второго интрона гена *Trl***

# Делеции, удаляющие различные фрагменты второго интрона гена *Trl*

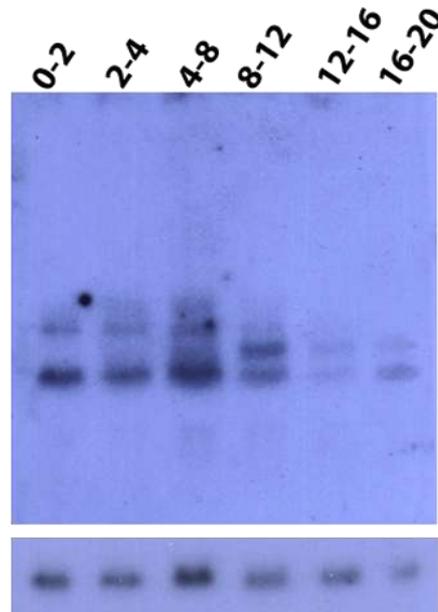


# Nothern-блот анализ экспрессии гена *Trl* при 29°C

стадия  
развития  
эмбрионов  
(часы):



*OregonR*

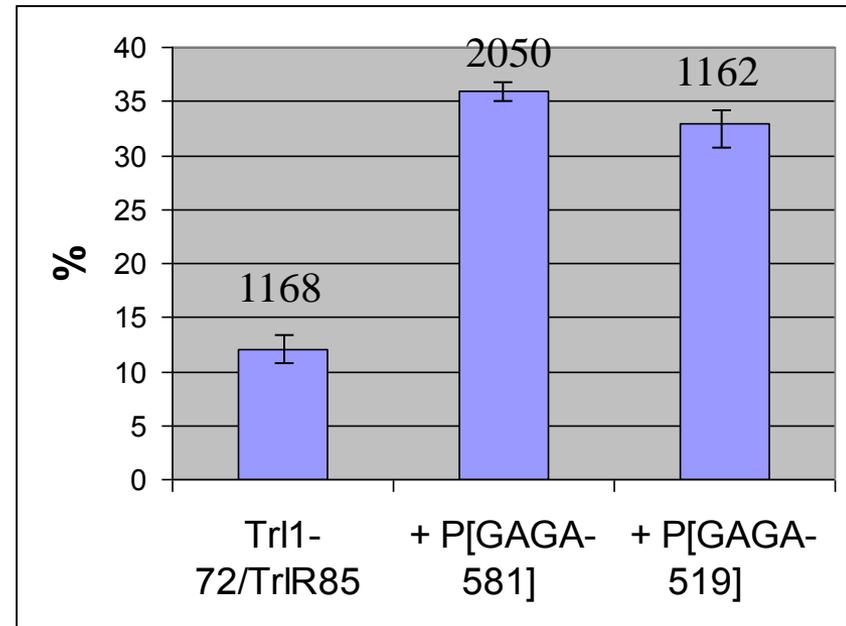
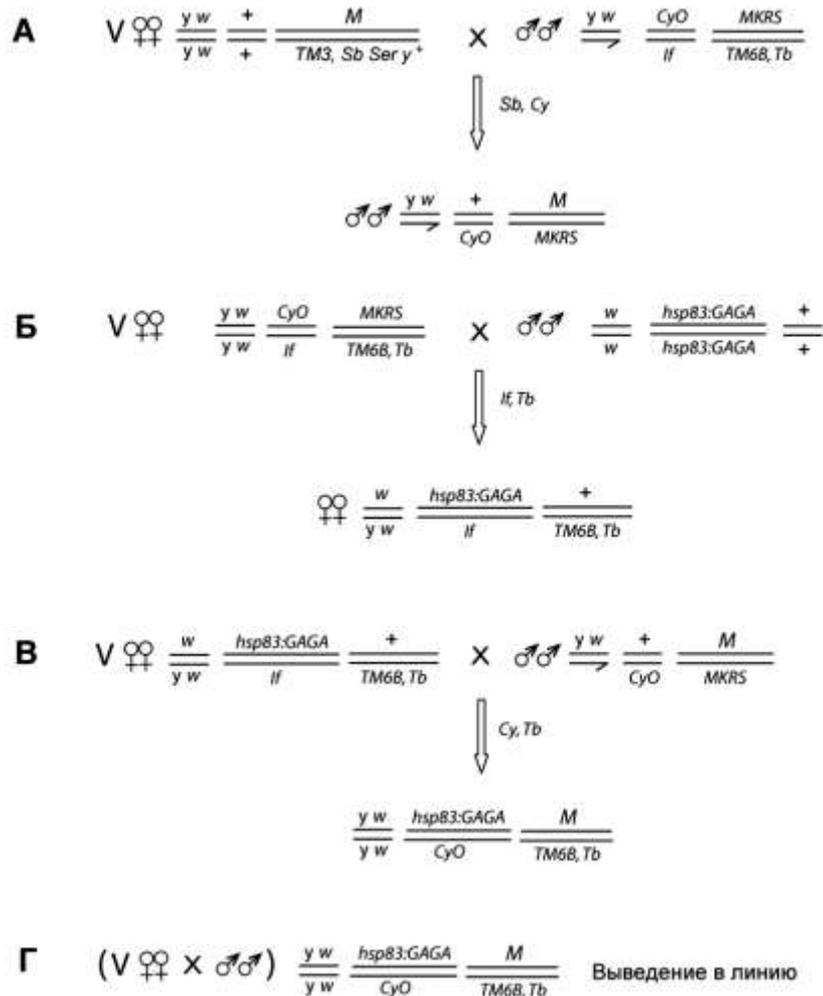


*Trl*<sup>72</sup>

Гибридизация с зондом, содержащим константную область кДНК гена *Trl* (экзоны 2, 3 и 4)

Контроль нанесения РНК – гибридикация с зондом к гену *rpl19*

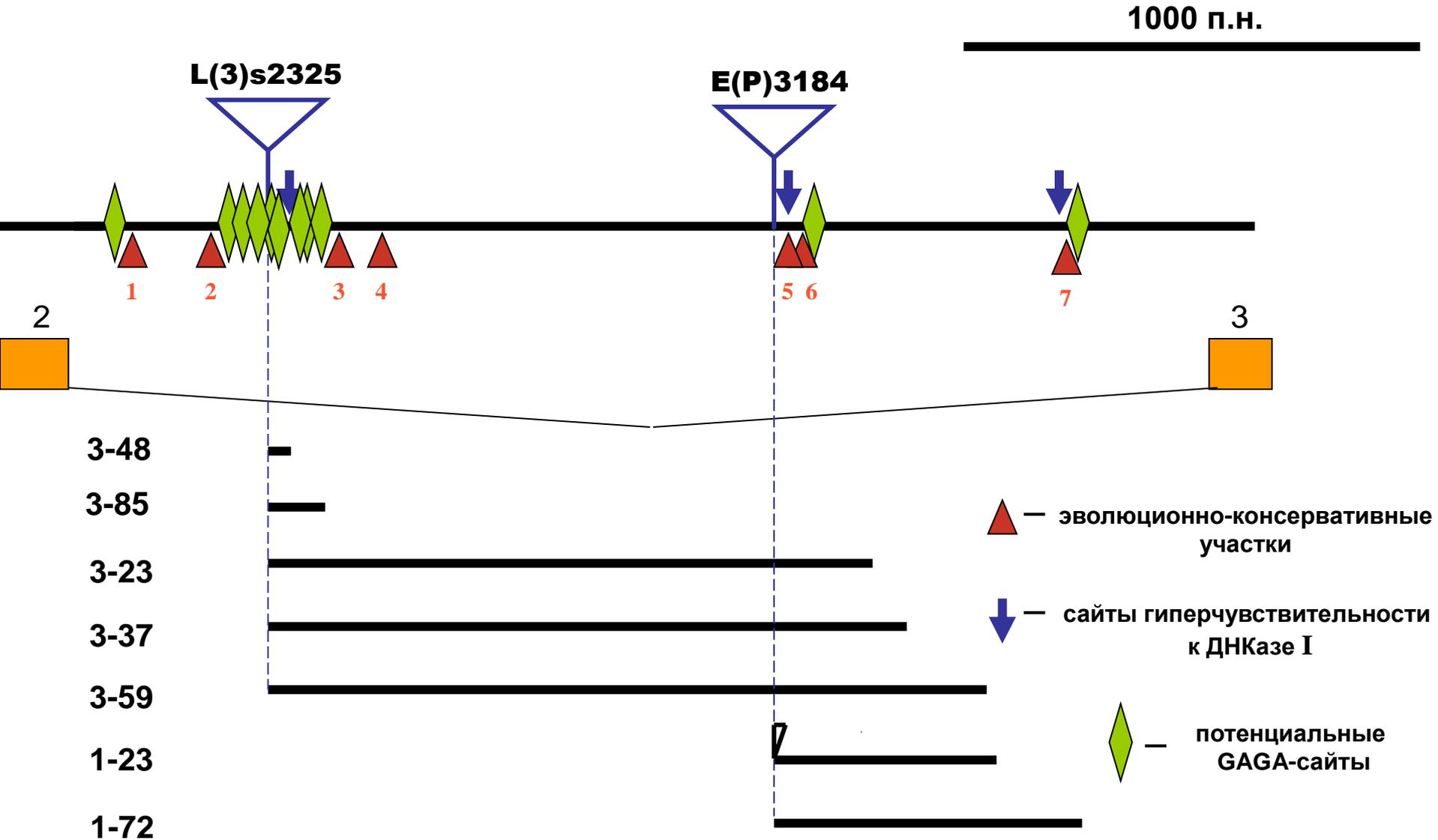
# Схема введения транспозонов, экспрессирующих кДНК гена *Trl*, кодирующие различные изоформы белка GAGA



GAGA-трансгены увеличивают выживаемость мутантов *Trl*<sup>1-72</sup> при 29°C (по признаку достижения взрослой стадии)

Оценка достоверности различий – по критерию Фишера (P>0,999)

# Делеции, удаляющие различные фрагменты второго интрона гена *Trl*



Связывание рекомбинантного белка GAGA, экспрессированного в клетках *E.coli*, с олигонуклеотидами:



1 - экспериментально подтвержденный GAGA-сайт района bxd PRE гена *Ultrabithorax*: 5'-

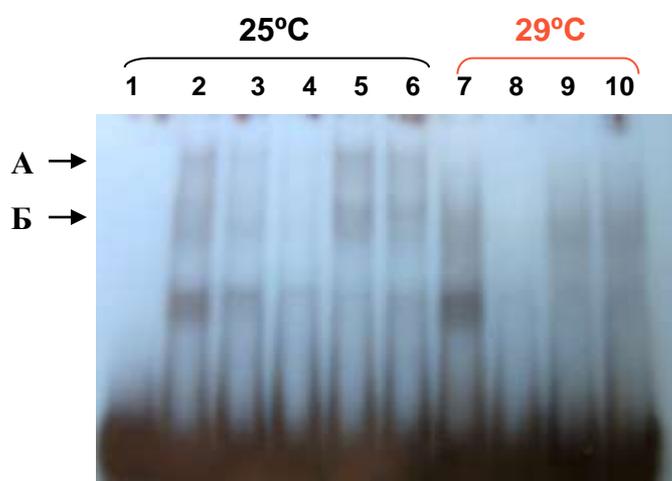
**ccgtatctctccctctctccgcagt**-3' – положительный контроль;

2 - сайт связывания белков семейства FOXA – **(tttg)<sub>6</sub>** отрицательный контроль;

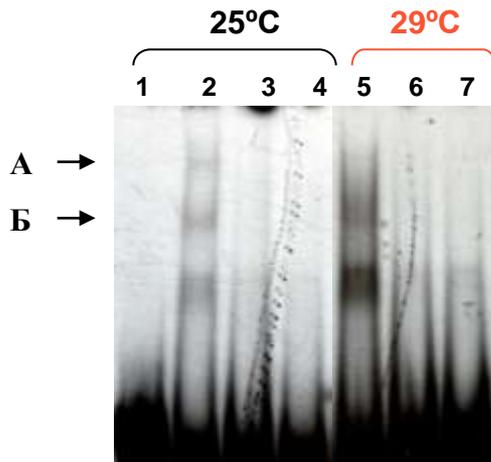
3 - GA1: 5'-**agaacgagagagtgagacgtagagacagagc**-3';

4 - GA2: 5'-**gsagacagagagggagagagcgsagagaa**-3';

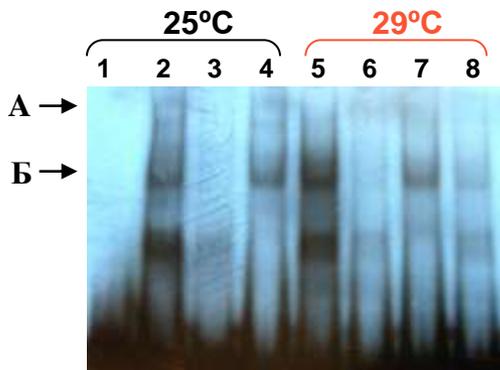
5 - GA3: 5'-**ggagagtgtagagcgacgctcgaccggagt** -3'.



**Связывание белков экстракта ядер эмбрионов дрозофилы с олигонуклеотидом GA2 (5' – *gsagacagagaggggagagagcagagaa* – 3'):**  
 1 – свободный зонд; 2, 7 – связывание зонда с белками эмбрионального экстракта;  
 3 – связывание в присутствии 10x избытка GA2;  
 4, 8 – связывание в присутствии 50x избытка GA2;  
 5, 9 – связывание в присутствии 100x избытка C/EBP;  
 6, 10 – связывание в присутствии 100x избытка CDC73.



**Связывание белков экстракта ядер эмбрионов дрозофилы с олигонуклеотидом GA1 (5' – *agaacgagagagtgagacgtagagacagagc* – 3'):**  
 1 – свободный зонд;  
 2, 5 – связывание зонда с белками экстракта ядер;  
 3, 6 – связывание в присутствии 20x избытка немеченого олигонуклеотида GA1;  
 4, 7 – связывание в присутствии 50x избытка GA1.



**Связывание белков экстракта ядер эмбрионов с олигонуклеотидом GA3 (5' – *ggagagtgtgagcgcgctcgaccggagt* – 3'):**  
 1 – свободный зонд;  
 2, 5 – связывание зонда с белками эмбрионального экстракта;  
 3, 6 – связывание в присутствии 50X избытка GA3;  
 4, 7 – связывание в присутствии 100X избытка CDC73;  
 8 – связывание в присутствии 100X избытка C/EBP.

## Выводы:

1. Получено 23 новых аллеля гена *Trl* и проведено их картирование с помощью молекулярных и цитогенетических методов. 10 мутаций (7 делеций и 3 дупликации) затрагивают только район второго интрона гена *Trl*.
2. Показано, что удаление фрагмента в центральной части второго интрона гена *Trl* (делеции *Trl<sup>3-85</sup>*, *Trl<sup>3-23</sup>* и *Trl<sup>3-59</sup>*) приводит к снижению выживаемости трансгетерозигот делеция/нуль-аллель при 25°C относительно нормы на 22, 28 и 32% соответственно. Делеции, удаляющие район в 3'-конце интрона (*Trl<sup>1-23</sup>* и *Trl<sup>1-72</sup>*), снижают выживаемость при 29°C относительно нормы на 49 и 44% соответственно.
3. С помощью Нозерн-блот гибридизации показано, что при 29°C картина транскрипции гена *Trl* у мутантов *Trl<sup>1-72</sup>* отличается от нормы соотношением представленности транскриптов на поздних стадиях эмбриогенеза.
4. Филогенетический анализ последовательностей второго интрона гена *Trl* двенадцати разных видов дрозофил выявил семь эволюционно-консервативных участков, размеры которых варьируют от 17 до 23 п.н. (из них пять – со 100% гомологией).
5. С помощью метода задержки ДНК-зонда в геле для трех потенциальных сайтов связывания GAGA, предсказанных методом SITECOM во втором интроне гена *Trl*, показано связывание с ними:
  - а) рекомбинантного белка GAGA, экспрессированного в клетках *E.coli* ;
  - б) ядерных белков клеток эмбрионов дрозофил.
6. Картина связывания трех GAGA-сайтов с белками экстракта ядер клеток эмбрионов меняется в зависимости от температуры, при которой развивались эмбрионы.

# Публикации

1. А.В.Катохин, А.В.Пиндюрин, **Е.В.Федорова**, Э.М.Баричева. Молекулярно-генетический анализ гена *Trithorax-like*, кодирующего транскрипционный фактор GAGA *Drosophila melanogaster*. Генетика. 2001, Т.37, № 4, С.467-474.
2. **Е.В.Федорова**, А.А.Огиенко., Д.А.Карагодин, К.Г.Айманова, Э.М.Баричева. Получение и анализ новых мутаций по гену *Trithorax-like Drosophila melanogaster*. Генетика. 2006, Т.42, № 2, С. 149-158.
3. А.А.Огиенко, Д.А.Карагодин, С.А.Федорова, **Е.В.Федорова**, В.В.Лашина, Э.М.Баричева. Анализ новой гипомофной мутации гена *Trithorax-like*, влияющей на оогенез *Drosophila melanogaster*. Онтогенез. 2006, Т. 37, № 3, С. 157–166.
4. **Е.В.Федорова**, А.В.Пиндюрин, Э.И.Баричева. Поддержание паттернов экспрессии гомеозисных генов в развитии *Drosophila melanogaster* белками групп Polycomb, trithorax и ETP. Генетика. 2009, т.45, №10, С.1301-1318.