

На правах рукописи

БАРИЧЕВА ЭЛИНА МИХАЙЛОВНА

**ГЕН *TRITHORAX-LIKE DROSOPHILA MELANOGASTER*,
ЕГО ЭКСПРЕССИЯ И РОЛЬ В ОНТОГЕНЕЗЕ**

03.02.07 — генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск — 2017

Работа выполнена в лаборатории механизмов клеточной дифференцировки Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Меркулова Татьяна Ивановна

Официальные
оппоненты:

Демаков Сергей Анатольевич
доктор биологических наук, зав. лабораторией хромосомной инженерии, ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», г. Новосибирск

Бугров Александр Геннадьевич
доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории филогении и фауногенеза, ФГБУН «Институт систематики и экологии животных СО РАН», г. Новосибирск

Гринкевич Лариса Николаевна
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции функций нейронов мозга ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук», г. Санкт-Петербург

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук», г. Москва

Защита диссертации состоится 21 июня 2017 года на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в конференц-зале Института по адресу: 630090 г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 10, тел. (383) 363-49-06, факс: (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.bionet.nsc.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т. М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Ген *Trithorax-like (Trl)* *D. melanogaster* кодирует белок GAGA, который участвует в разных процессах в ходе онтогенеза дрозофилы. Известно, что этот белок разными способами может быть вовлечен в регуляцию экспрессии многих генов дрозофилы (Granok *et al.*, 1995). Так, связываясь с GA-богатыми последовательностями в регуляторных районах генов, он участвует в формировании и/или поддержании открытой структуры хроматина в них, что облегчает доступ к этим районам РНК полимеразы II и других специфических факторов (Wilkins & Lis, 1998). Благодаря своей способности к олигомеризации, GAGA может обеспечивать связь удаленных регуляторных элементов (Mahmoudi *et al.*, 2002). Таким образом, транскрипционный фактор (ТФ) GAGA участвует в функционировании энхансеров, сайленсеров, граничных элементов и инсуляторов (Ohtsuki & Levin, 1998; Strutt *et al.*, 1997; O'Donnell & Wensink, 1994; Mishra *et al.*, 2001; Busturia *et al.*, 2001; Kvon *et al.*, 2012; Wolle *et al.*, 2015). Белок GAGA связывается с GA-богатыми последовательностями, расположенными не только в эухроматине, но и в гетерохроматине. Это объясняет его значение в обеспечении процесса деления клеток, а также тот факт, что мутации гена *Trl* являются доминантными энхансерами эффекта положения мозаичного типа (Farkas *et al.*, 1994).

Несмотря на обилие данных о роли GAGA в регуляции экспрессии генов, экспрессия самого гена *Trl* исследована недостаточно. Было установлено, что он экспрессируется практически на всех стадиях онтогенеза (Перелыгина *и др.*, 1993; Soeller *et al.*, 1993; Bhat *et al.*, 1996), однако до сих пор плохо была изучена специфичность экспрессии гена в разных тканях и органах дрозофилы. Кроме того, практически отсутствовали данные о регуляции экспрессии гена *Trl*. К настоящему времени на культуре клеток S2 был исследован регуляторный потенциал только некоторых фрагментов его 5'-области (Kosoy *et al.*, 2002), что не позволяет сделать вывод о значении разных фрагментов этой области для обеспечения ткане- и стадиоспецифической экспрессии гена *Trl*. Кроме того, в последнее время становится все более очевидным, что существенный вклад в регуляцию экспрессии генов вносят интроны. Однако данные о регуляторном потенциале интронов гена *Trl* до начала наших исследований полностью отсутствовали.

Уже в первых работах, посвященных гену *Trl*, было показано, что особи, несущие нуль-аллели данного гена гибнут на стадиях эмбриона или личинки, и только в отдельных случаях мутанты доживают до стадии куколки (Farkas *et al.*, 1994; Катохин *и др.*, 2001). Влияние белка GAGA на процессы, происходящие на более поздних стадиях онтогенеза дрозофилы, было изучено слабо. Существовали данные о том, что недостаток этого белка приводит к проблемам в оогенезе дрозофилы, однако причины этого явления не были исследованы. Поскольку развитие половой системы самок и самцов

имеют общие черты, нельзя исключить, что GAGA может влиять и на развитие половой системы самцов, несмотря на то, что в литературе отсутствовали какие-либо данные по этому вопросу. Уже в самых первых работах, посвященных исследованию гена *Trl*, было показано также, что у мутантов по данному гену нарушена поверхность глаз (Farkas *et al.*, 1994). Позднее было установлено, что у мутантов нарушена не только поверхность глаза, но и его внутренняя структура (Dos-Santos *et al.*, 2008). Поскольку GAGA является ТФ, можно предположить, что у *Trl*-мутантов нарушена экспрессия генов-мишеней этого белка, которые контролируют формирование глаза дрозофилы, однако такие гены не были выявлены.

Следует отметить, что формирование глаза дрозофилы, также как и развитие половой системы у самок и самцов, являются процессами эволюционно-консервативными и контролируются у многих организмов сходными по составу ансамблями эволюционно-консервативных генов. Исследования, позволяющие выявить такие ансамбли, имеют общебиологическое значение и могут быть использованы при исследовании развития органов и тканей и у других видов, для которых применение генетических и цитогенетических подходов в условиях *in vivo* имеет значительные технические и морально-этические ограничения. Всестороннее исследование влияния ТФ GAGA на органогенез дрозофилы представляется чрезвычайно актуальным, поскольку позволит выявить целую сеть взаимосвязанных генов, участвующих в обеспечении генетического контроля этих важнейших процессов. Актуальность исследования влияния белка GAGA на онтогенез дрозофилы обусловлена также тем, что этот белок сам является эволюционно-консервативным. В настоящее время гомологи белка GAGA найдены не только у беспозвоночных, но и у позвоночных организмов. Известно, что у разных видов они связываются со схожими GA-богатыми последовательностями в регуляторных областях одних и тех же генов. Однако данные о функционировании белков, гомологичных белку GAGA дрозофилы, у других видов еще более ограничены. Поэтому расширение представлений о функционировании белка GAGA в онтогенезе дрозофилы представляется чрезвычайно важным, поскольку может быть использовано при исследовании развития и других организмов.

Цель и задачи исследования

Цель исследования заключалась в выявлении особенностей тканеспецифической экспрессии гена *Trl*, идентификации и исследовании регуляторных элементов гена, ответственных за специфичность экспрессии, а также в определении роли и механизмов действия ТФ GAGA в процессах формирования разных органов *D. melanogaster* на разных этапах ее онтогенеза.

В связи с этим были поставлены следующие конкретные задачи:

- 1) Провести всестороннее исследование экспрессии гена *Trl* в разных органах *D. melanogaster* на протяжении всего периода ее онтогенеза.
- 2) Получить серию новых гипоморфных аллелей гена *Trl*. Провести картирование и молекулярно-генетический анализ вновь полученных мутаций и отобрать мутации, позволяющие достигнуть поставленную выше цель.
- 3) Исследовать в системе *in vivo* регуляторный потенциал последовательностей гена *Trl*, расположенных в его 5'-области и во втором интроне гена. Определить значимость разных последовательностей в обеспечении правильной картины экспрессии в разных органах и тканях *D. melanogaster* на разных этапах ее онтогенеза.
- 4) Определить значение белка GAGA на разных этапах оогенеза *D. melanogaster*. Исследовать морфологию и функционирование ооцита, питающих клеток, а также установить значение данного белка для обеспечения правильного функционирования разных типов соматических клеток в яйцевой камере дрозофилы.
- 5) Установить причины возникновения морфологических дефектов, выявленных в ходе оогенеза *Trl*-мутантов на фоне уменьшения количества белка GAGA. Выявить гены-мишени этого ТФ, ответственные за наблюдаемые дефекты оогенеза у мутантов.
- 6) Определить роль белка GAGA на разных этапах развития половой системы самцов *D. melanogaster*. Оценить значение уменьшения количества белка GAGA на развитие половой системы самцов *Trl*-мутантов и выяснить причины снижения их фертильности.
- 7) Изучить значение белка GAGA для развития разных типов клеток глаза *D. melanogaster*. Выявить морфологические нарушения в разных типах клеток глаза дрозофилы на фоне уменьшения количества белка GAGA.
- 8) Установить причины возникновения морфологических дефектов в глазах у *Trl*-мутантов. Выявить гены-мишени ТФ GAGA, ответственные за наблюдаемые дефекты в ходе формирования глаза мутантов.

Научная новизна работы

В данной работе получен набор новых гипоморфных мутаций по гену *Trl*, затрагивающих разные области гена и снижающих в разной степени экспрессию гена. Полученные мутации прокартированы и охарактеризованы. Использование полученных мутаций позволило нам впервые в контексте целого организма провести анализ регуляторного потенциала разных областей 5'-области гена *Trl*, а также установить наличие регуляторных элементов во втором интроне. Впервые было продемонстрировано, что недостаток белка GAGA приводит к нарушению функционирования всех типов клеток

яйцевой камеры, был определен круг генов, которые ответственны за разные дефекты в оогенезе мутантов. Нами впервые продемонстрировано, что уменьшение количества белка GAGA приводит не только к стерильности самок, но и к стерильности самцов дрозофилы, был выявлен спектр нарушений в ходе формирования половой системы *Trl*-мутантов. Был проведен всесторонний анализ изменения структуры глаза дрозофилы на фоне уменьшения количества белка GAGA и было показано, что гены *lozenge* и *Bar*, которые являются важнейшими регуляторами формирования глаза, меняют свою экспрессию у *Trl*-мутантов.

Практическая ценность

Хорошо известно, что процессы оогенеза, сперматогенеза, а также формирование глаза являются эволюционно-консервативными процессами. У разных видов наборы генов, контролирующих каждый из этих процессов, во многом пересекаются. Поэтому данные, полученные для одного вида, могут быть полезны при исследовании аналогичных процессов и у других видов, у которых подобные исследования затруднены по ряду биологических или морально-этических проблем. Кроме того, поскольку большинство генов и их продуктов, контролирующих вышеперечисленные процессы, являются эволюционно-консервативными, данные об их функционировании в ходе того или иного процесса, полученные на одном из видов, могут быть применены и к другим видам. Так, в частности, белки гомологичные белку GAGA найдены у ряда беспозвоночных и позвоночных организмов, где их функции слабо изучены. Полученные в данной работе результаты помогут облегчить процесс понимания этих функций. И, наконец, данные, полученные по выявлению новых генов, вызывающих стерильность самок и самцов дрозофилы, могут быть использованы для обеспечения контроля численности насекомых, вредных для здоровья человека или жизнедеятельности полезных для него растений.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Онтогенетическая и тканеспецифическая картины экспрессии гена *Trl* обеспечивается за счет регуляции транскрипции с помощью регуляторных последовательностей, расположенных в промоторном районе и во втором интроне гена, а также с использованием альтернативного сплайсинга.
- 2) Транскрипционный фактор GAGA влияет на структуру глаза дрозофилы, контролируя экспрессию генов *lozenge* и *Bar*.
- 3) Транскрипционный фактор GAGA влияет на развитие половой системы самок и самцов дрозофилы посредством регуляции экспрессии его генов-мишеней.

Вклад автора

В получении всех представленных в работе данных автор принимал личное участие. Опубликованные по теме диссертации научные работы подготовлены в соавторстве

с коллективом сотрудников ИЦиГ СО РАН. Анализ экспрессии генов в норме и у мутантов выполнен при участии Д. А. Карагодина. Приготовление полутонких срезов глаза дрозофилы проводился совместно с С. И. Байбородиним. Анализ структуры глаза мутантов проводился совместно с Н. В. Баттулиной. Анализ жизнеспособности и фертильности мутантов проводился совместно с Е. В. Федоровой. Анализ оогенеза у мутантов проводился совместно с А. А. Огиенко, а изучение формирования дорзальных выростов хориона совместно с Е. С. Омелиной. Анализ нарушений формирования половой системы самцов у *Trl*-мутантов проводился совместно с Н. В. Дороговой, а электронно-микроскопические фотографии сделаны с Е. У. Болоболовой. В большинстве научных работ фамилия автора диссертации стоит на первом или последнем месте, что отражает его роль в разработке и проведении экспериментов, включенных в диссертацию.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, объединенных в одну главу, а также выводов и списка цитируемой литературы, в который входит 330 ссылок. Работа изложена на 218 страницах машинописного текста и содержит 15 таблиц и 72 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались мутации, полученные из международных центров линий, а также полученные в нашей лаборатории новые мутации гена *Trl*. К ним относятся: *Trl*³⁶², *Trl*^{362(ex)}, *Trl*^{ex(15)}, *Trl*^{l-72} и др. В качестве контроля использовалась линия *Oregon R*.

Для получения новых аллелей гена *Trl* был использован метод неточных эксцизий, а также метод *P*-элемент индуцированной самцовой рекомбинации (Preston *et al.*, 1996).

Выделение РНК из целых особей или из органов дрозофилы проводили с использованием реагента TRIzol («Invitrogen», Швейцария), согласно рекомендациям изготовителя.

Нозерн-блот-гибридизацию проводили по методике, предложенной Бурнетом (Burnett, 1997) с модификациями (Karagodin *et al.*, 2013). В экспериментах использовалась суммарная РНК. В качестве зонда для гибридизации, если не оговорено иное, использовали ³²P-меченный фрагмент кДНК гена *Trl* (2, 3, 4 экзоны), общий для всех транскриптов. Интенсивности полученных сигналов измеряли с использованием прибора Pharos FX Plus Molecular Imager (Bio-Rad Laboratories, USA), полученные данные анализировали с помощью программного пакета Quantity One v.4.6.5 (Bio-Rad Laboratories, USA).

Приготовление срезов и *in situ* гибридизация проводилась по методу Зарайского и соавторов (Зарайский *и др.*, 1989).

Иммунохимическое окрашивание проводили по методу, описанному ранее (Bonaccorsi *et al.*, 2000). Окрашивание яичников дрозофилы с помощью фаллоидина проводили по ранее предложенной методике (Guild *et al.*, 1997). Анализ препаратов

проводили на микроскопе Axioscope 2 plus («Zeiss», Германия) или на конфокальных микроскопах LSM 510 Meta и LSM 780 («Zeiss», Германия) в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Приготовление препаратов для электронной микроскопии проводилось по методике, описанной ранее (Pertceva *et al.*, 2010). Подробное описание методики смотри в Dorogova *et al.*, 2014.

Анализ поверхности глаз проводили на сканирующем электронном микроскопе TM-1000 Tabletop (Hitachi) в центре коллективного пользования ЦСБС СО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение экспрессии гена *Trithorax-like* в различных органах и тканях в ходе развития *Drosophila melanogaster*

Нами впервые проведен детальный анализ экспрессии гена *Trl* в отдельных органах и тканях дрозофилы. С помощью гибридизации *in situ* на гистологических срезах было установлено, что во второй половине эмбриогенеза данный ген активно экспрессируется в формирующийся нервной трубке (рис. 1 ; Перельгина *и др.*, 1993). У личинок разных возрастов высокий уровень экспрессии наблюдается в комплексе мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему имагинальных дисках. И наконец, сильная экспрессия была выявлена в мозгу взрослых мух (рис. 1).

Еще в наших первых работах было показано, что на всем протяжении развития дрозофилы для гена *Trl* (Nc70F) характерно несколько форм мРНК, в том числе транскрипты длиной 2,5 и 3 т.н. (Перельгина *и др.*, 1992). В дальнейшем этот факт был подтвержден другими исследователями (Soeller *et al.*, 1993; Bhat *et al.*, 1997). Мы установили, что соотношение количества этих транскриптов является строго специфичным для каждого типа органов и тканей. Так, в яичниках взрослых самок основными являются транскрипты длиной 2,5 т.н. (рис. 2 а; Огиенко *и др.*, 2006), тогда как в РНК, выделенной из комплекса мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему имагинальных дисков личинок, количественно доминируют транскрипты длиной 3 т.н. (рис. 2 б; Павлова *и др.*, 2010). В семенниках мух дикого типа транскрипты длиной 2.5 и 3 т.н. представлены в приблизительно равных количествах (рис. 2 в).

Следующим этапом нашего исследования было изучение регуляторных районов гена *Trl*. Обычно такие последовательности локализуются в 5'-областях генов и в их больших интронах, поэтому мы сосредоточились на исследовании именно этих областей.

2. Анализ регуляторного потенциала 5'-некодирующей области гена *Trl*

До наших исследований было установлено значение лишь отдельных участков 5'-области гена *Trl* для обеспечения нормального уровня экспрессии репортерного гена

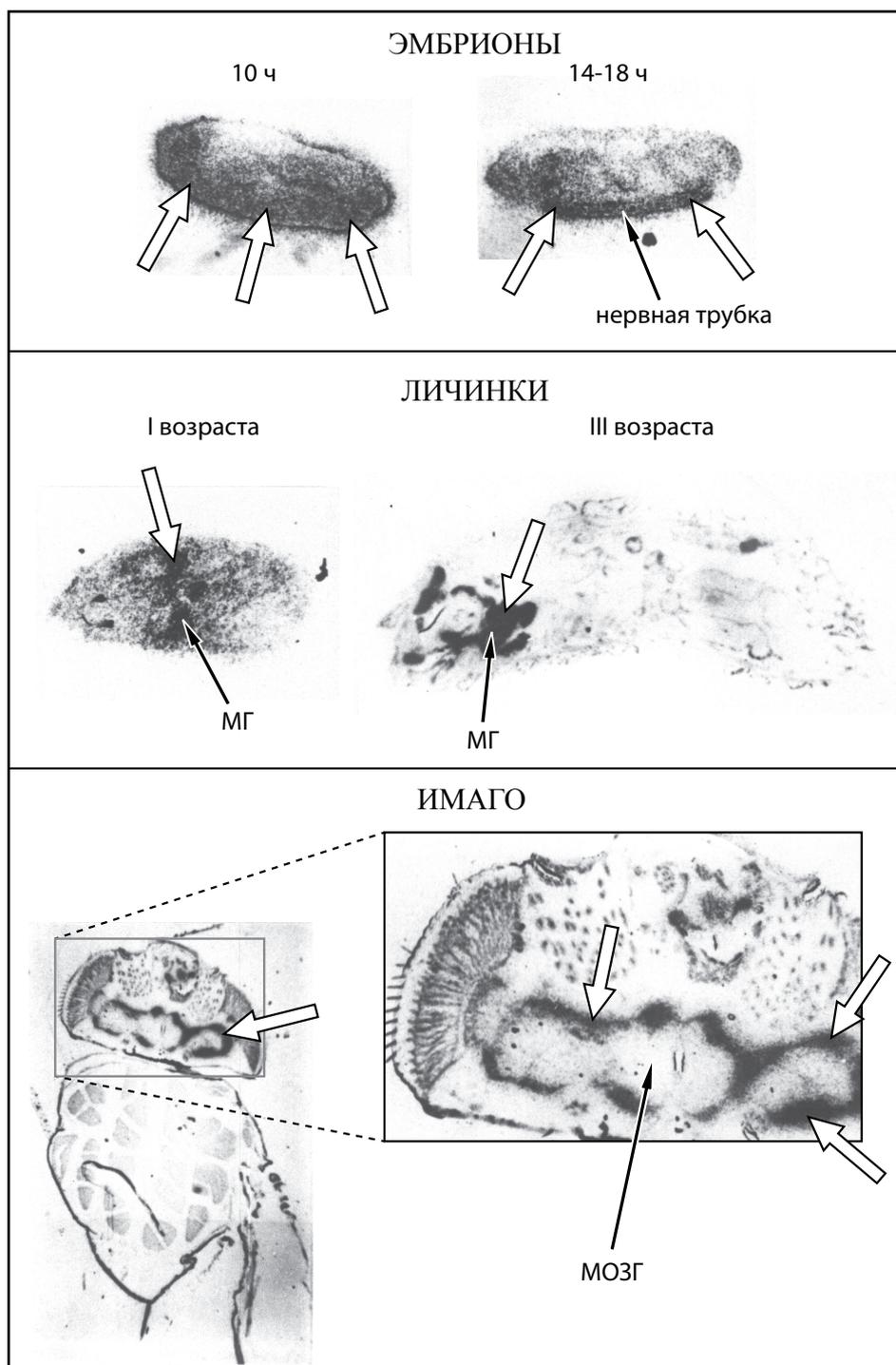


Рис. 1. Гибридизация *in situ* ^{33}P -меченного фрагмента кДНК гена *Trl* (2, 3, 4 экзоны) с гистологическими срезами эмбрионов, личинок 1-го и 3-го возрастов и голов имаго дрозофилы (Перельгина и др., 1993). Белыми стрелками указаны области наибольшей интенсивности мечения. Черными стрелками указаны органы, в которых зарегистрирована наиболее сильная экспрессия гена. МГ — мозг, вентральный ганглий и прилегающие к ним имагинальные диски.

в культуре клеток S2 дрозофилы (Kosoy *et al.*, 2002). Однако особый интерес в изучении регуляторного потенциала тех или иных последовательностей представляет анализ их действия в контексте целого организма, поскольку экспрессия анализируемого гена в культуре клеток может значительно отличаться от таковой в реальных условиях. Поэтому

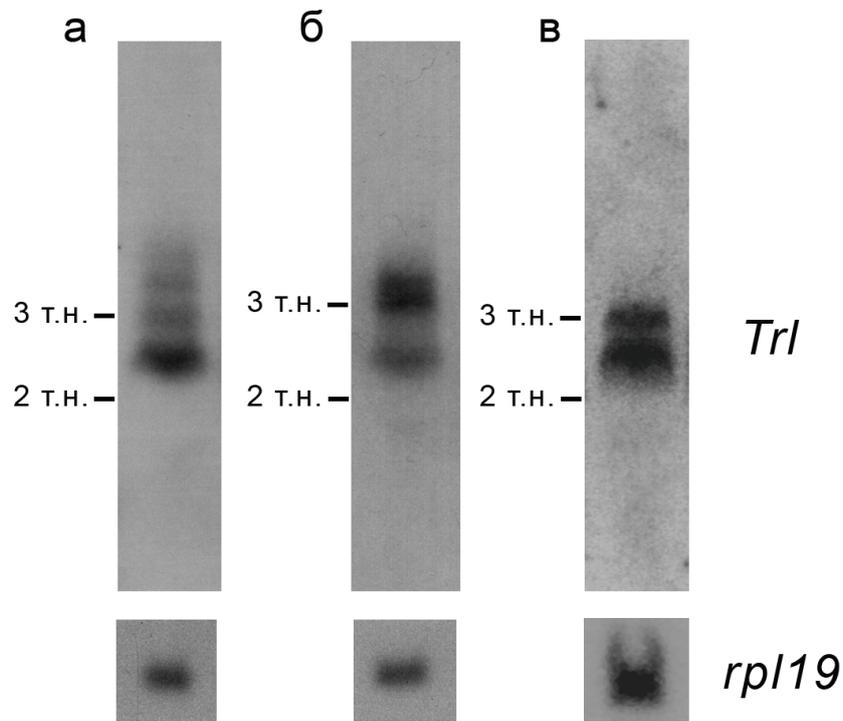


Рис. 2. Транскрипция гена *Trl* в разных органах дрозофилы. Нозерн-блот содержит суммарную РНК, выделенную из яичников (а), комплекса мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему имагинальных дисков личинок (б) и семенников (в) мух дикого типа (*Oregon R*). В качестве зонда для гибридизации использовали ³²P-меченный фрагмент кДНК гена *Trl* (2, 3, 4 экзоны). Внизу гибридизация того же блота с зондом *rpl19* в качестве контроля нанесения.

использование мутаций, затрагивающих анализируемый район, для анализа его регуляторного потенциала, несмотря на очевидную трудоемкость подхода, дает наиболее достоверные результаты. Для изучения регуляторного потенциала 5'-области гена *Trl* в контексте целого организма мы использовали мутации *Trl*³⁶² и *Trl*³⁶⁰⁹, а также делеции, полученные нами с помощью неточных эксцизий транспозонов на основе этих мутаций (рис. 3). Все используемые мутации не затрагивают кодирующую область гена, однако нарушают структуру 5'-некодирующей области гена *Trl*, где в экспериментах, проведенных на культуре клеток, было найдено 5 стартов транскрипции (рис. 3; Kosoy *et al.*, 2002). Гипоморфная мутация *Trl*³⁶² обусловлена инсерцией транспозона *p{lacW}* и прилегающей к нему делецией размером 97 п. н. (Огиенко *и др.*, 2006), а мутация *Trl*³⁶⁰⁹ обусловлена встройкой транспозона *p{EP}* после третьего старта транскрипции (рис. 3). Делеция *Trl*^{362(ex)} получена в результате удаления *P*-элемента из аллеля *Trl*³⁶². В результате аллель *Trl*^{362(ex)} содержит точно такую же делецию, как и аллель *Trl*³⁶² (97 п. н.), но у него отсутствует *P*-элемент, прилегающий к делеции в аллеле *Trl*³⁶². Мутация *Trl*^{ex(15)} представляет собой делецию величиной более 1500 п. н., в результате которой удалены не только два первых старта транскрипции, но и большой фрагмент, лежащий выше них (Dorogova *et al.*, 2014). Мутация *Trl*⁴⁻⁸³ является делецией величиной около 1 т. п. н.,

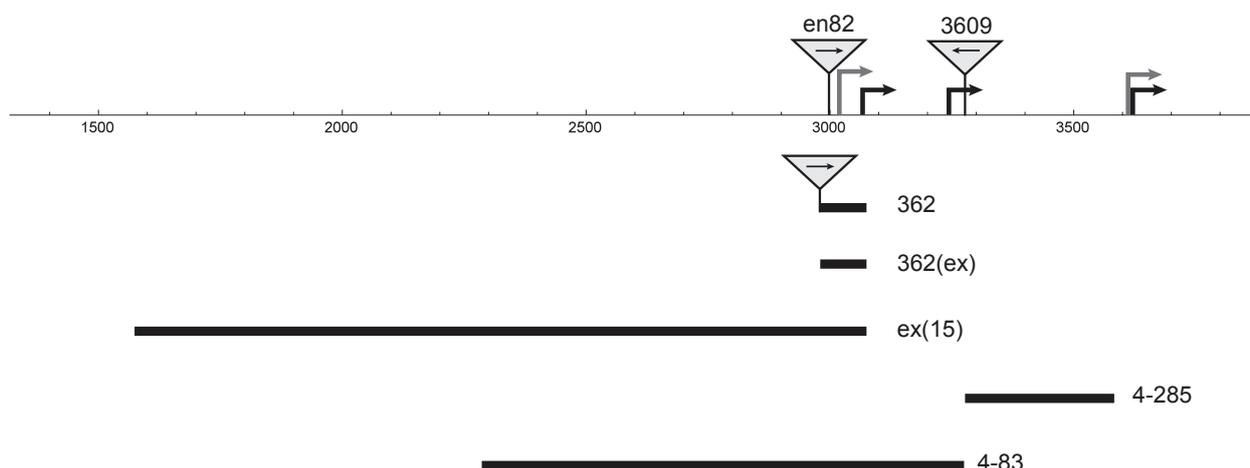


Рис. 3. Схема мутаций, затрагивающих 5'-регуляторную область гена *Trl*. Изогнутыми стрелками указаны сайты инициации транскрипции, картированные в культуре клеток S2 (Kosoy *et al.*, 2002). Сверху указаны координаты в соответствии с последовательностью GenBank #AJ225042. Делеции представлены в виде горизонтальных линий, треугольниками обозначены места встройки *P*-элементов. Справа указаны названия аллелей.

частично перекрывающейся с делецией $Trl^{ex(15)}$. Она удаляет три первых сайта инициации транскрипции и фрагмент, расположенный выше них. Делеция Trl^{4-285} удаляет фрагмент, расположенный между третьим и четвертым стартами транскрипции. Также в работе использовалась гипоморфная мутация Trl^{en82} , обусловленная встройкой *P*-элемента длиной 1,4 т. п. н. в 5'-область гена *Trl*, приблизительно на 20 нуклеотидов ниже, чем у аллеля Trl^{362} (Огиенко *и др.*, 2008а).

Был осуществлен анализ жизнеспособности (табл. 1) и фертильности всех представленных на рис. 3 мутантов, а также анализ экспрессии у них гена *Trl*. В результате было установлено, что удаление района, в котором расположены два первые старта транскрипции гена *Trl* (мутации Trl^{362} и $Trl^{362(ex)}$), не приводит к значительному снижению жизнеспособности, тогда как все другие мутации существенно снижают

Табл. 1. Относительная жизнеспособность анализируемых мутантов (генотипа M/Trl^{R85}) при температуре 25 и 29 °С, выраженная в процентах от теоретически ожидаемого значения.

<i>M</i>	Жизнеспособность особей M/Trl^{R85} при 25 °С	Жизнеспособность особей M/Trl^{R85} при 29 °С
<i>Oregon R</i>	84,98±1,12	62,98±1,45
Trl^{4-285}	51,20 ±1,45	22,86±1,42
$Trl^{362(ex)}$	70,76±1,37	41,81±1,37
$Trl^{ex(15)}$	13,77±1,09	8,26±0,86
Trl^{362}	67 ±2,7	20 ±1,6

M — мутация гена *Trl*, а Trl^{R85} — нуль-аллель гена. Ошибка выборочного среднего считалась по формуле $Sp=(pq/n)^{1/2}$, где *n* — численность выборочной совокупности, а *p* и *q* — выборочные статистические параметры.

жизнеспособность мутантов. Так оказалось, что мутанты Trl^{4-83} и Trl^{3609} не доживают до стадии имаго. Удаление фрагмента, расположенного между третьим и четвертым сайтами инициации транскрипции, снижает жизнеспособность мутантов Trl^{4-285} на 40 % при обычных условиях выращивания мух, а удаление района, содержащего не только два первых старта транскрипции, но и участок, расположенный выше стартов (мутация $Trl^{ex(15)}$), приводит к снижению жизнеспособности примерно в шесть раз по сравнению с нормой. Жизнеспособность мутантов, выращенных в условиях слабого теплового шока (29 °C) снижена по сравнению с нормой ещё значительней.

Самки всех доживающих до стадии имаго мутантов с нарушенной 5'-областью гена Trl стерильны за исключением самок Trl^{4-285} . Все самки откладывают мало яиц, что предполагает наличие у них проблем с оогенезом. Кроме того, некоторые мутации гена Trl приводят к стерильности самцов: самцы Trl^{362}/Trl^{R85} -мутантов полустерильны, а самцы $Trl^{ex(15)}/Trl^{R85}$ полностью стерильны (Dorogova *et al.*, 2014).

3. Анализ экспрессии гена Trl у анализируемых мутантов

Нозерн-блот-анализ мутантов с нарушенной структурой 5'-области гена Trl выявил у них серьезные нарушения экспрессии гена на разных стадиях онтогенеза. Так, экспрессия у мутантов Trl^{3609} , $Trl^{ex(15)}$, Trl^{4-83} снижена более чем в 10 раз (рис. 4). У мутантов Trl^{4-285} и $Trl^{362(ex)}$ экспрессия гена Trl в куколках мало отличается от нормы.

В яичниках мутантов Trl^{362} и $Trl^{ex(15)}$ экспрессия гена Trl снижена более чем в 10 раз, в яичниках самок Trl^{en82} на 30 %, а в яичниках стерильных самок $Trl^{362(ex)}$ она не отличается от нормы (рис. 5). В комплексе мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему имгинальных дисках также было отмечено сильное снижение экспрессии гена на фоне изменения 5'-области гена Trl (рис. 6). Следует отметить, что уровень экспрессии гена может снижаться в разной степени в разных органах одних и тех же Trl -мутантов. Так, у мутантов Trl^{362}/Trl^{R85} экспрессия гена в комплексе мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему дисках снижена по сравнению с нормой в 2,5–3 раза, в то время как экспрессия в яичниках у этих же мутантов снижена более чем в 10 раз (рис. 5, рис. 6).

Суммируя описанные выше результаты, можно сделать следующие обобщения:

- 1) Удаление района, содержащего два первых старта транскрипции, не приводит к значительному изменению транскрипции гена Trl . Однако поскольку самки $Trl^{362(ex)}$ стерильны, можно предположить, что этот район важен для обеспечения транскрипции гена в соматических клетках яйцевой камеры, которые не вносят существенного вклада в общий пул транскриптов яйцевой камеры.
- 2) Особенно важную роль в обеспечении экспрессии гена в целом организме, также как и в культуре клеток, играет район, расположенный выше стартов транскрипции. Его удаление приводит к снижению экспрессии гена на разных стадиях онтогенеза и в разных тканях дрозофилы (мутации $Trl^{ex(15)}$, Trl^{4-83}). Даже

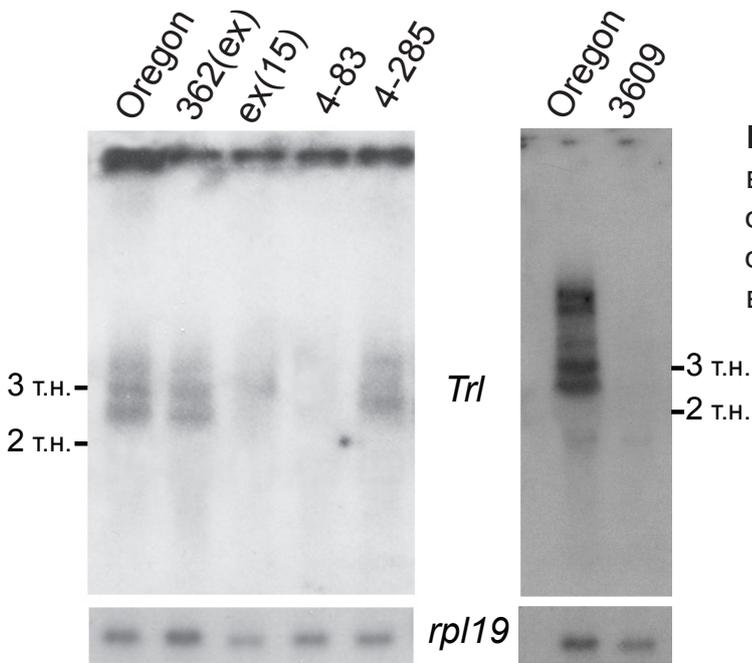


Рис. 4. Анализ экспрессии гена *Trl* в куколках. Анализируемые линии обозначены сверху блота. В качестве контроля нанесения использован ген *rpl19*.

Рис. 5. Анализ экспрессии в яичниках мутантов *Trl^{ex(15)}* (А) и *Trl^{362(ex)}*, *Trl³⁶²*, *Trl^{en82}* (Б). Анализируемые линии обозначены сверху блота. В качестве контроля нанесения использован ген *rpl19*.

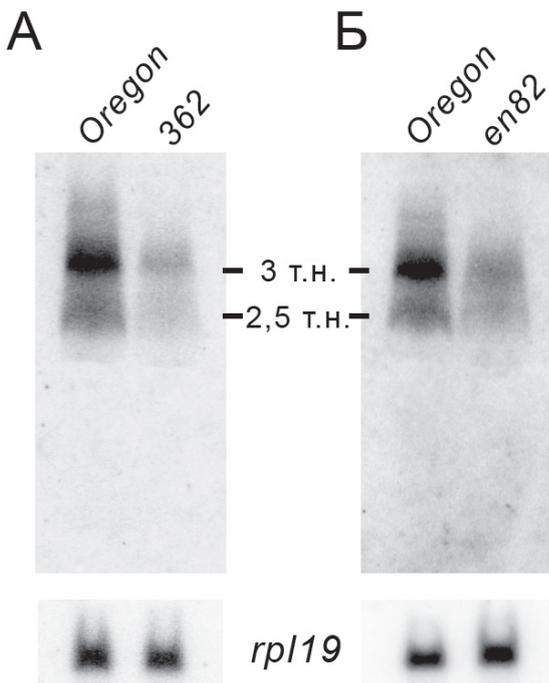
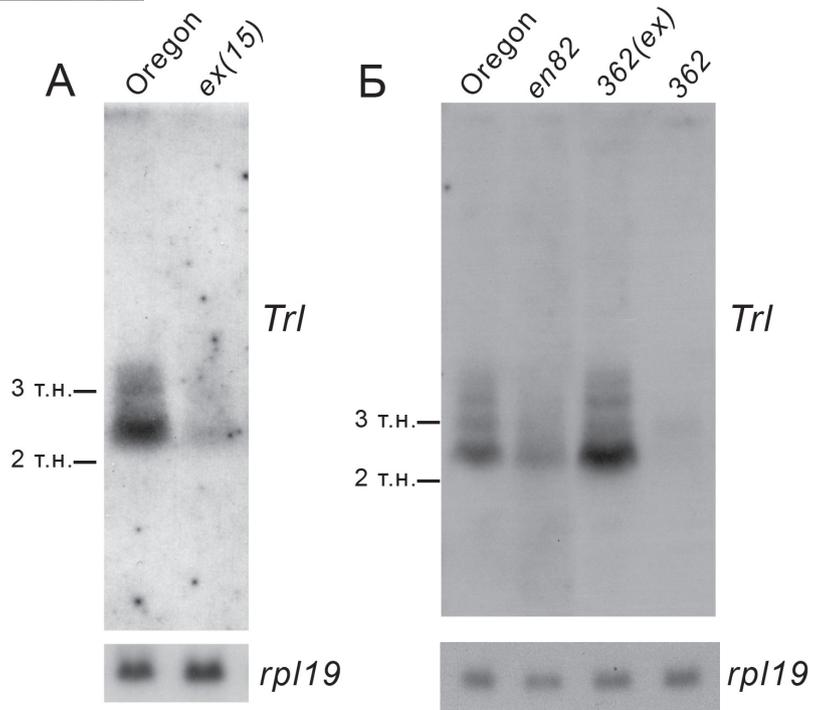


Рис. 6. Анализ экспрессии гена *Trl* в комплексе мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему имагинальных дисках мутантов *Trl³⁶²* (А) и *Trl^{en82}* (Б). Анализируемые линии обозначены сверху блота. Ген *rpl19* использован в качестве контроля нанесения.

разобшение этого района с районом промотора приводит к снижению экспрессии гена (мутации Trl^{362} , Trl^{en82}).

- 3) Сравнение экспрессии гена у мутантов $Trl^{ex(15)}$ и Trl^{4-83} показали, что эти, большей частью перекрывающиеся делеции, снижают уровень экспрессии примерно одинаково у куколок. Однако мутация Trl^{4-83} приводит к летальности в гомозиготе или в сочетании с нуль-аллелем, тогда как у $Trl^{ex(15)}$ мутантов до стадии имаго доживает около 14 % особей. Поскольку делеция Trl^{4-83} удаляет не только первые два старта транскрипции и район расположенный выше них как и делеция $Trl^{ex(15)}$, но и район в котором расположен третий сайт инициации транскрипции, то можно полагать, что в системе *in vivo* третий старт транскрипции имеет определенное значение для обеспечения экспрессии гена.
- 4) Район между третьим и четвертым стартами транскрипции, удаляемый делецией Trl^{4-285} (~300 п. н.), оказывает незначительное влияние на транскрипцию гена Trl , например на стадии куколки, однако нами показано, что эта мутация приводит к снижению жизнеспособности на 40 %. Вероятно, он играет важнейшую роль в обеспечении транскрипции гена на более ранних стадиях развития дрозофилы.
- 5) Согласно нашим данным, полученным с использованием мутаций, исключаяющих транскрипцию с трех первых стартов (Trl^{3609} и др.), установлено, что два последних старта транскрипции, не вносят существенный вклад в производство транскриптов гена Trl в целом организме, тогда как в культуры клеток они обеспечивают наработку половины транскриптов (Kosoy *et al.*, 2002).

4. Анализ регуляторного потенциала второго интрона гена Trl

D. melanogaster

В настоящее время показано, что необходимые для обеспечения правильной экспрессии генов регуляторные элементы, часто располагаются в больших интронах генов (Fedorova & Fedorov, 2003; Rogozin *et al.*, 2012). В гене Trl самым большим интроном является второй (2,3 т. п. н.). С помощью метода *P*-элемент индуцированной самцовой рекомбинации мы получили мутации, удаляющие разные фрагменты интрона (рис. 7), и использовали эти мутации для анализа его регуляторного потенциала. Было установлено, что удаление разных участков второго интрона гена Trl влияет на жизнеспособность мутантов (табл. 2), что свидетельствует в пользу того, что в удаленных участках располагаются функционально-значимые сайты (Федорова *и др.*, 2006). Наибольшее влияние на жизнеспособность демонстрировали мутации Trl^{1-23} и Trl^{1-72} , которые являются делециями, удаляющими фрагменты во второй части интрона. При температуре 25 °С их жизнеспособность снижена незначительно по сравнению с контролем, тогда как в условиях слабого теплового шока (29 °С) выживаемость компаундов Trl^{1-23}/Trl^{R85} и

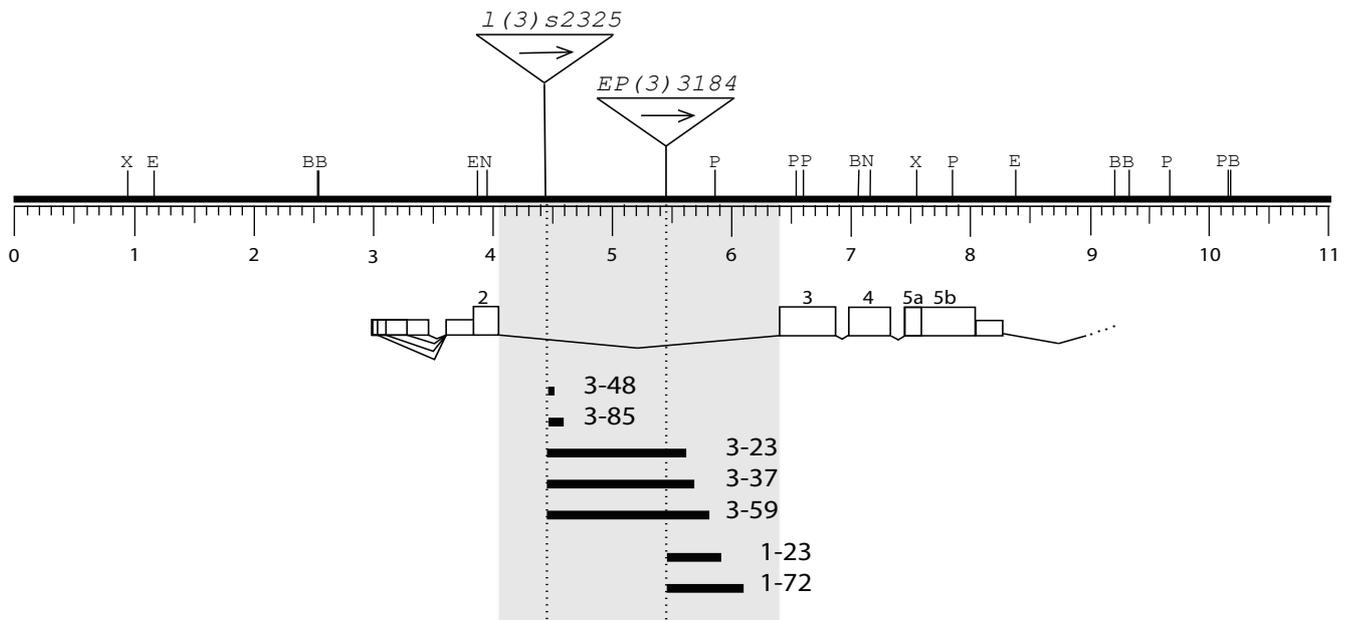


Рис. 7. Схема полученных делеций, затрагивающих второй интрон гена *Trl*. Вверху представлена геномная последовательность гена *Trl* с сайтами рестрикции BamHI (B), EcoRI (E), NcoI (N), Pst (P), XhoI (X). Треугольниками обозначены места встройки *P*-элементов у мутантов *Trl*^{s2325} и *Trl*^{EP(3)3184}, стрелки внутри треугольников указывают на ориентацию транспозонов. Ниже представлены суммарные данные о транскриптах гена *Trl*. Низкие прямоугольники соответствуют некодирующим районам экзонов, а высокие — кодирующим. Серым прямоугольником выделен второй интрон гена *Trl*. Делеции представлены в виде горизонтальных линий, справа указаны номера делеций.

Trl^{l-72}/*Trl*^{R85} снижена весьма сильно и составляет, соответственно, 7 % и 12 %, что существенно меньше, чем в контроле. Аналогичные результаты были получены и при анализе трансгетерозигот, где анализируемые мутации сочетались с другим нуль-аллелем — *Trl*^{R67}.

Табл. 2. Выживаемость *Trl*-мутантов, развивавшихся при температуре 25 °C и 29 °C.

Генотип	Количество отложенных яиц при 25 °C	Доля особей, доживших до имаго при 25 °C	Количество отложенных яиц при 29 °C	Доля особей, доживших до имаго при 29 °C
<i>Trl</i> ³⁻⁸⁵ / <i>Trl</i> ^{R85}	786	0,63±0,017***	217	0,51±0,034 ^{ндр}
<i>Trl</i> ³⁻²³ / <i>Trl</i> ^{R85}	1046	0,57±0,015***	1690	0,40±0,012***
<i>Trl</i> ^{3-59(ex)} / <i>Trl</i> ^{R85}	1569	0,53±0,013***	1120	0,35±0,014***
<i>Trl</i> ^{l-23} / <i>Trl</i> ^{R85}	310	0,84±0,021 ^{ндр}	261	0,07±0,016***
<i>Trl</i> ^{l-72} / <i>Trl</i> ^{R85}	843	0,76±0,015***	1165	0,12±0,009***
<i>Trl</i> ^{EP(3)3184} / <i>Trl</i> ^{R85}	215	0,61±0,034 ^{ндр}	877	0,51±0,017***
Oregon R/ <i>Trl</i> ^{R85}	1012	0,85±0,011	1089	0,56±0,015

*** — отличие от контроля (*Oregon R/Trl*^{R85}) при $P < 0,001$;

ндр — нет достоверного отличия от контроля

Нозерн-блот гибридизация свидетельствует, что у *Trl^{l-72}* мутантов изменен характер экспрессии гена *Trl* (рис. 8). В норме при температуре 25 °С в ходе эмбриогенеза наблюдаются два основных транскрипта длиной в 2,5 и 3 т. н. Транскрипт длиной 2,5 т. н. является основным в течение первых стадий эмбриогенеза. С 12-16 стадий его количество снижается, но начинает увеличиваться количество транскрипта длиной 3 т. н., который на последних стадиях становится доминирующим (рис. 8 А). У мутантов *Trl^{l-72}* на последних стадиях эмбриогенеза транскрипт длиной 3 т. н. не становится доминирующим (рис. 8 Б). В эмбрионах, выращенных при температуре 29 °С картина транскрипция гена *Trl* в норме и у мутантов *Trl^{l-72}* точно такая же как в эмбрионах, выращенных при нормальной температуре (данные не приводятся). В тоже время следует напомнить, что значительное уменьшение жизнеспособности этих мутантов наблюдается именно в условиях слабого теплового шока, тогда как отличное от нормы соотношение транскриптов обнаружено нами при обеих температурах. Мы установили, что транскрипт длиной 2,5 т. н. соответствует изоформе GAGA-519, а транскрипт длиной 3 т.н. — изоформе GAGA-581 (рис. 8, Karagodin *et al.*, 2013). Поэтому несоответствие в жизнеспособности

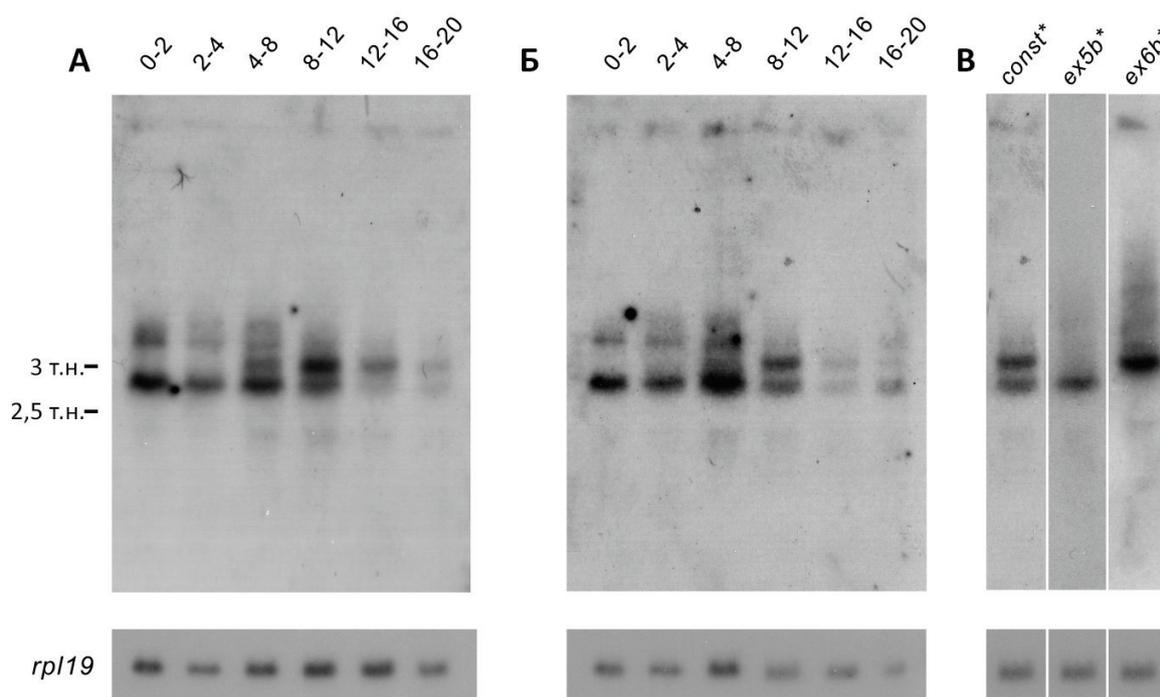


Рис. 8. Нозерн-блот-анализ РНК гена *Trl*. (А, В) Анализ РНК, выделенной из эмбрионов дикого типа (А), и гомозиготных по мутации *Trl^{l-72}* (Б). Блоты А и В гибридизованы с пробой к константной области гена *Trl* (экзоны 2, 3, 4). РНК гена, кодирующего рибосомальный белок L19 (*rpl19*), была использована в качестве контроля нанесения. Выше блотов показаны стадии развития эмбрионов в часах. (В) Нозерн-блоты, содержащие суммарную РНК из эмбрионов, гомозиготных по мутации *Trl^{l-72}*, на стадии 8-12 часов развития, гибридизованные с пробами: const* — к константной части гена, ex5b* и ex6b* специфичными к транскриптам, кодирующим изоформы GAGA-519 и GAGA-581 соответственно.

и изменении транскрипции может объясняться тем, что при повышенной температуре доминирующая у мутантов изоформа GAGA — GAGA-519, соответствующая транскрипту 2,5 т. н., меняет конформацию и не может эффективно исполнять свои функции, как она это делает при нормальной температуре.

Мы провели анализ структуры второго интрона гена *Trl* и установили, что в нем располагаются два сайта гиперчувствительности к действию ДНКазы I (Karagodin *et al.*, 2013). Во втором интроне эти сайты локализуются в районах преимущественного встраивания *P*-элементов (районы А и Б) (рис. 9). Район Б частично удаляется делецией *Trl^{I-72}*. Гиперчувствительность к действию ДНКазы I отражает открытую конформацию хроматина. О том, что районы А и Б характеризуется открытой конформацией хроматина также говорит тот факт, что именно в них наблюдается и преимущественное встраивание *P*-элементов.

В районах А и Б располагается много эволюционно-консервативных последовательностей (рис. 9). Даже у сильно удаленных видов, таких как *D. persimilis*, *D. virilis*, *D. mojavensis* и *D. grimshawi*, 15-22 % последовательностей второго интрона были полностью гомологичны последовательностям *D. melanogaster*, а 4-7 % последовательностей имелись только единичные замены. При этом наиболее часто эволюционно-консервативные последовательности наблюдаются именно в пределах районов А и Б. Считается, что *D. melanogaster* и *D. virilis* разошлись не менее 40 млн. лет (Russo *et al.*, 1995), поэтому

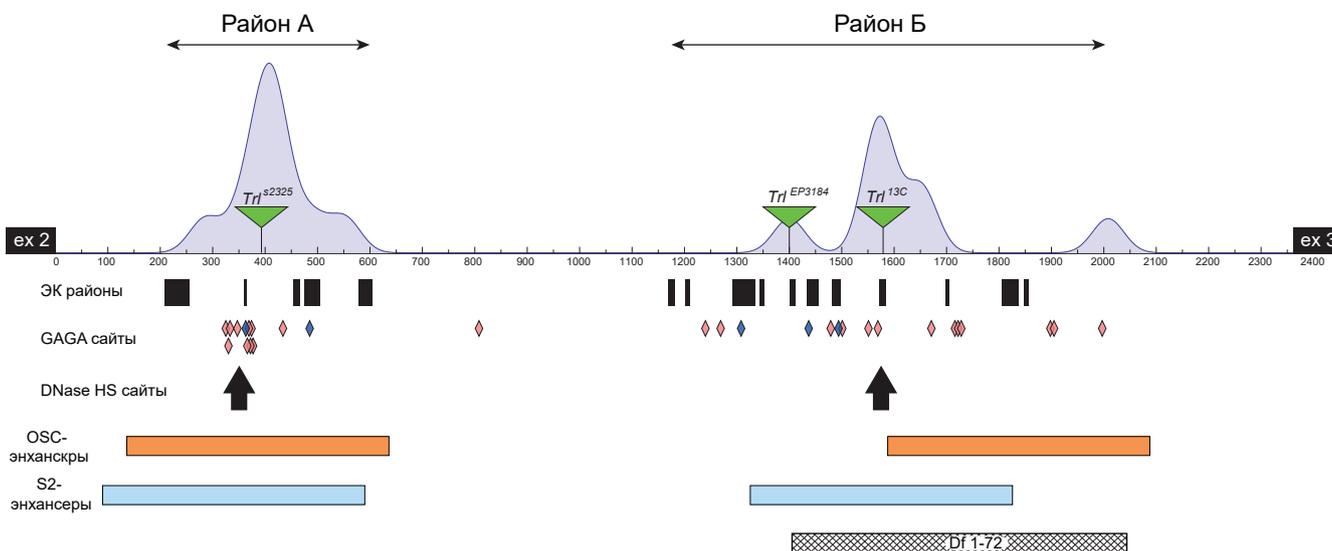


Рис. 9. Структура второго интрона гена *Trl*. Длина интрона 2,3 т. п. н. Треугольникам отмечены инсерции *P*-элементов у мутантов *Trl^{I(3)s2325}*, *Trl^{EP(3)3184}* и *Trl^{13C}*. Сверху представлена гистограмма по распределению частоты инсерций *P*-элементов в данном интроне. Под линией показаны эволюционно-консервативные районы (ЭК). Ромбами показаны GAGA сайты, стрелками — районы гиперчувствительности к ДНКазе I (DNase HS sites). Под ними закрашенными прямоугольниками показаны участки, показавшие энхансерную активность в S2 и OSC линиях клеток дрозофилы (по Arnold *et al.*, 2013). Делеция *Trl^{I-72}* изображена внизу в виде прямоугольника (Df 1-72).

наличие во втором интроне гена *Trl* консервативных последовательностей может свидетельствовать об их функциональной значимости.

В районах А и Б второго интрона гена *Trl* располагаются многочисленные сайты связывания ТФ GAGA. Используя разработанные и экспериментально верифицированные методы компьютерного поиска GAGA сайтов типов GAGnGAG и GAGnnnGAG (Omelina *et al.*, 2011), мы нашли в этом интроне 29 потенциальных GAGA сайтов (рис. 9). Таким образом, частота встречаемости сайтов GAGA во втором интроне гена в 17–18 раз выше, чем в геноме *D. melanogaster* в целом (Omelina *et al.*, 2011). Как показано на рисунке предсказанные GAGA сайты в основном локализируются в районах А и Б: 12 GAGA сайтов расположено в районе А и 17 в районе Б. В центральной части интрона был найден только один потенциальный сайт связывания белка GAGA. Следует напомнить, что с помощью гель-ретардации было показано, что белок GAGA связывается с 72 % предсказанных сайтов типа GAGnGAG и 94.5 % сайтов типа GAGnnnGAG (Omelina *et al.*, 2011). Высокая плотность сайтов связывания белка GAGA во втором интроне гена *Trl* показана также с помощью ChIP-chip и ChIP-seq методов, что отражено в базе данных modENCODE. Мы полагаем, что связывание GAGA с последовательностями второго интрона требуется для создания и поддержания открытой структуры хроматина в этом районе гена *Trl*, в которых располагаются регуляторные элементы. Не исключено, что GAGA сайты участвуют в обеспечении контактов функционально-значимых элементов, расположенных во втором интроне и в 5'-регуляторной области гена, поскольку известно, что GAGA может поддерживать связи между удаленными молекулами ДНК благодаря своей способности к олигомеризации (Mahmoudi *et al.*, 2002). Известно, что GAGA фактор, участвующий в регуляции транскрипции многих генов дрозофилы, задействован также и в регуляции собственной экспрессии, а сайты связывания белка GAGA, расположенные в его 5'-регуляторной области, имеют большое значение для обеспечения этого процесса (Kosoy *et al.*, 2002). Нами было показано, что фрагмент второго интрона (район Б), в котором расположены сайты связывания GAGA, также имеют значение для регуляции экспрессии гена *Trl*. Его удаление приводит к тому, что количество транскриптов длиной 2,5 т.н. на последних стадиях эмбриогенеза становится заметно выше, чем в норме. Можно предположить, что транскрипты длиной 3 и 2,5 т.н. образуются с разных промоторов гена *Trl*, поскольку их количество по-разному реагирует на удаление части района Б. По-видимому, регуляторные элементы, локализованные в районе Б второго интрона гена, могут оказывать влияние на один из промоторов, регулируя, таким образом, производство одного из транскриптов.

Анализ данных, представленных в базе modENCODE, показывает, что во втором интроне гена *Trl* находятся не только многочисленные GAGA сайты, но и большое число сайтов связывания других ТФ, включая кодируемые генами *Zfh-1*, *disco*, *Ubx*, *Kr*, *hkb*, *kn*,

gro, *sbb*, *D*, *jumu*, *kni*, *nej*, *eve* и другие. Следует отметить, что частота встречаемости сайтов ТФ во втором интроне гена *Trl* значительно выше, нежели в других областях гена, исключая область его промотора. Известно, что наличие многочисленных сайтов связывания является отличительной чертой районов, задействованных в регуляции экспрессии (Kvon *et al.*, 2012). Наши данные о регуляторной роли последовательностей второго интрона гена *Trl* подтверждаются результатами полногеномного картирования энхансеров, проведенном на культуре клеток S2 и соматических клетках яичников дрозофилы, которые показали, что в кластерах А и Б присутствуют энхансерные последовательности (рис. 9, Arnold *et al.*, 2013).

Полученный нами набор гипоморфных мутаций был использован не только для исследования регуляции экспрессии гена *Trl*, но и оказался очень полезным инструментом для детального исследования процессов оогенеза, сперматогенеза и формирования глаза дрозофилы.

5. Влияние белка GAGA на оогенез дрозофилы

Полученный набор мутаций гена *Trl* позволил нам впервые продемонстрировать многочисленные дефекты формирования яйцевой камеры дрозофилы, возникающие на фоне снижения количества белка GAGA. Наиболее сильные нарушения зафиксированы в структуре и количестве питающих клеток (ПК), а также в функционировании разных типов фолликулярных клеток (ФК).

Морфологические нарушения, наблюдаемые в ПК *Trl*-мутантов:

- 1) Нарушения числа ПК в яйцевых камерах *Trl*-мутантов.** В норме в яйцевой камере дрозофилы насчитывается 15 питающих клеток, однако в камерах *Trl*-мутантов наблюдается много камер с отличным от нормы числом ПК (Огиенко *и др.*, 2006; рис. 10). Мы считаем, что причиной изменения числа ПК в яйцевых камерах *Trl*-мутантов может быть неправильное обволакивание цисты фолликулярными клетками в гермарию, в результате чего в формирующуюся яйцевую камеру ПК могут попадать клетки соседней цисты или одна камера может разделиться на две части. В таких случаях две соседние цисты будут нести необычное число ПК, в сумме равное 15 или 30, что и наблюдается у *Trl*-мутантов (рис. 10).
- 2) Нарушения в формировании цитоплазматических актиновых филаментов (ЦАФ) в ПК *Trl*-мутантов.** Одним из наиболее ярких дефектов, наблюдаемых в ПК у *Trl*-мутантов на фоне снижения количества белка GAGA, является нарушение в формировании ЦАФ. Как показано на рис. 11 А и Б, в норме хорошо развитые ЦАФ протягиваются от клеточной мембраны вглубь клетки к ядрам. Эти специализированные актиновые филаменты формируются непосредственно перед стадией быстрого транспорта и служат для удержания огромных полиплоидных ядер ПК вдали от кольцевых каналов во время этого процесса. Если их структура нарушена, как мы это

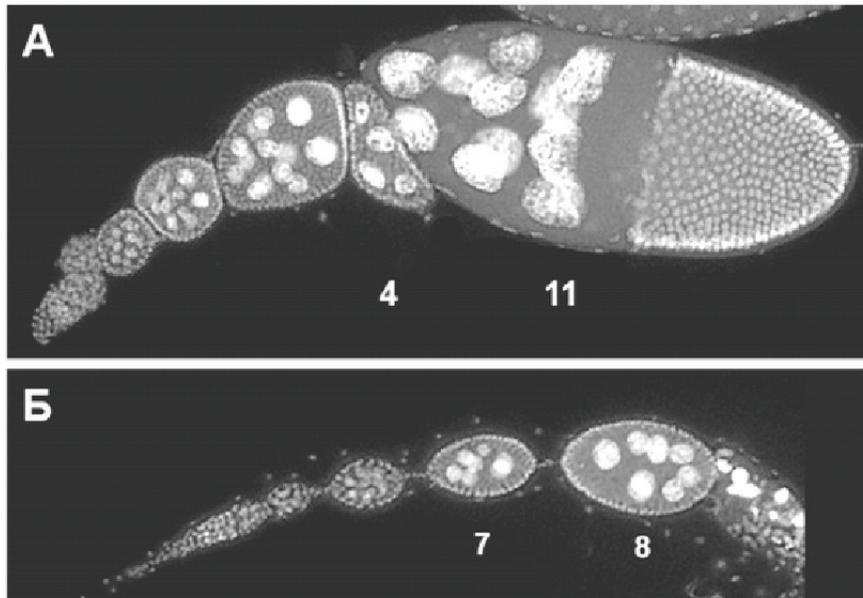


Рис. 10. Морфология яичников мутантов (А) *Trl³⁶²* и (Б) *Trl^{362(ex)}*. А — в овариоле видны две расположенные рядом камеры, в которых число питающих клеток составляет четыре и одиннадцать. Б — в овариоле присутствуют две камеры с числом питающих клеток семь и восемь. Яичники окрашены с помощью DAPI.

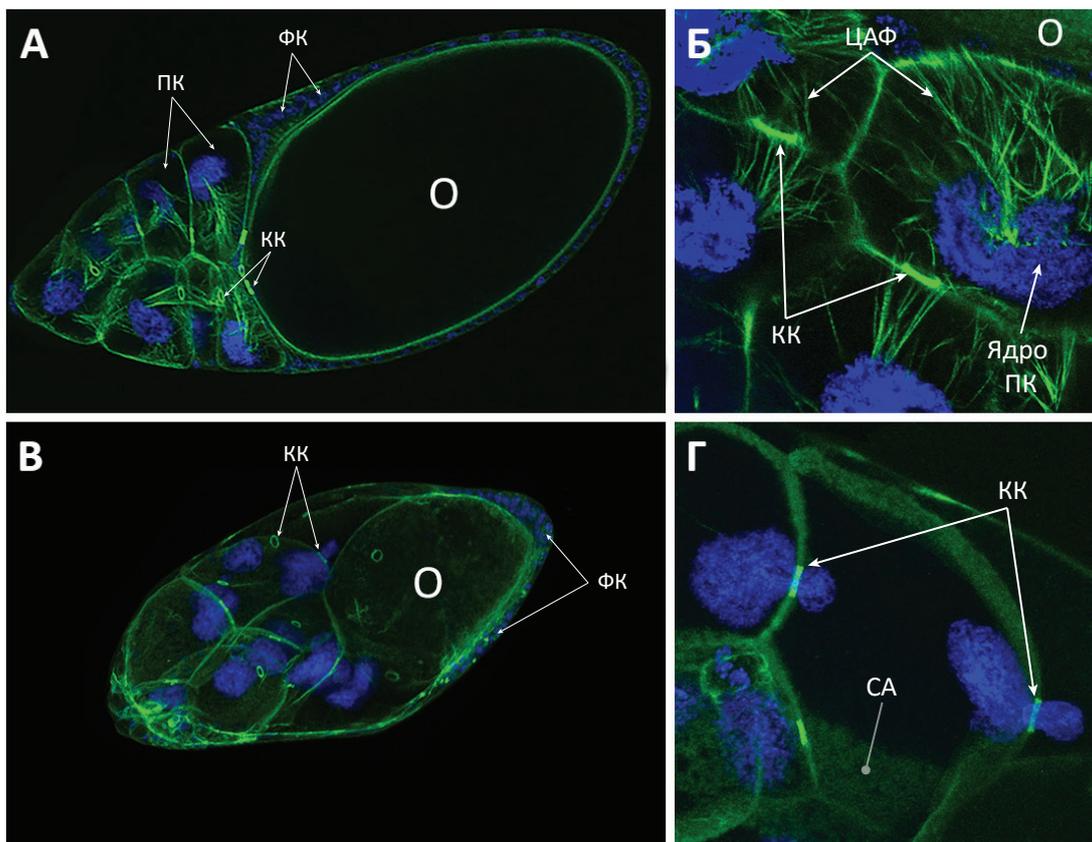


Рис. 11. Актиновые филаменты яйцевой камеры дрозофилы. (А, Б) камера дикого типа (*Oregon R*). (В, Г) камера *Trl³⁶²*-мутантов. ПК — питающие клетки, FK — фолликулярные клетки, KK — кольцевые каналы, ЦАФ — цитоплазматические актиновые филаменты, СА — субкортикальный актин. Окрашивание ДНК с помощью DAPI (синий) и филаментного актина с помощью фаллоидина (зеленый). Увеличение $\times 40$.

видим у *Trl*-мутантов (рис. 11 В, Г), то ядра ПК забивают кольцевые каналы, блокируя тем самым ток цитоплазмы. Степень нарушения структуры ЦАФ в ПК *Trl*-мутантов коррелирует с уровнем снижения транскрипции в их яйцевых камерах. Так наиболее сильные нарушения в формировании ЦАФ выявлены у мутантов *Trl³⁶²*, *Trl^{l3C}* и *Trl³⁻⁶²⁽¹⁵⁾* на фоне минимальной транскрипции гена *Trl* в их яйцевых камерах. При введении в геном *Trl*-мутантов трансгена *hsp83:GAGA-519* происходит восстановление структуры ЦАФ в ПК мутантов, поскольку благодаря введению этой конструкции у мутантов происходит увеличение количества белка GAGA-519 (Огиенко *и др.*, 2006; Огиенко *и др.*, 2008). Это свидетельствует о том, что дефекты в формировании ЦАФ у *Trl*-мутантов обусловлены нехваткой именно ТФ GAGA.

Нарушения в функционировании ФК у *Trl*-мутантов:

- 1) У *Trl*-мутантов нарушена миграция бордюрных клеток (БК). В норме на 9-й стадии развития яйцевой камеры группа специализированных ФК (8–10 штук, так называемые БК) отделяется от переднего края яйцевой камеры и мигрирует среди ПК по направлению к ооциту (рис. 12 А). К 10-й стадии БК достигают переднего края ооцита. Во многих яйцевых камерах *Trl*-мутантов этого не наблюдается (рис. 12). Так, в яйцевых камерах мутантов *Trl³⁶²* и *Trl³⁻⁶²⁽¹⁵⁾* около 20 и 25 % яйцевых камер соответственно характеризуются отставанием в миграции БК. Нарушение миграции БК приводит к стерильности самок дрозофилы, поскольку они участвуют в формировании микропиле — структуры через которую сперматозоиды проникают в яйцо.

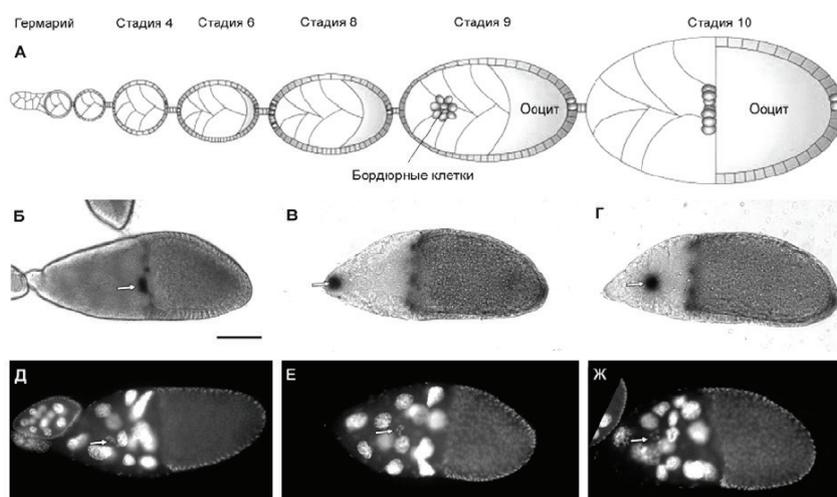


Рис. 12. Нарушение миграции БК у *Trl*-мутантов. А — схематическое изображение овариолы, показана миграция БК в норме (с модификациями из Montell, 2003). Б — яйцевая камера самок дикого типа на 10-й стадии, БК (указаны стрелкой) находятся на границе между ПК и ооцитом. В, Г — яйцевые камеры *Trl^{36(ex)}*-мутантов на 11-й стадии развития. Д, Е — яйцевая камера *Trl³⁶²*-мутантов на 10-й стадии. Ж — яйцевая камера *Trl^{en82}*-мутантов на 10-ой стадии. Б-Г — яйцевые камеры, окрашены с помощью X-Gal. Д-Ж — яйцевые камеры, окрашены с помощью DAPI. Масштаб 100 мкм.

2) У *Trl*-мутантов нарушено движение центрипетальных клеток (ЦК). В норме на 10В стадии развития яйцевой камеры ФК, расположенные на границе между ооцитом и ПК, уплощаются и начинают мигрировать внутрь яйцевой камеры, продвигаясь между ПК и ооцитом. Эти клетки получили название ЦК. Когда миграция ЦК заканчивается, они достигают БК, и передняя часть ооцита оказывается полностью покрыта ФК (рис. 13 А, Г, Ж; Horne-Badovinac & Bilder, 2005). У всех анализируемых *Trl*-мутантов было обнаружено нарушение в движении ЦК, они часто не продвигаются вглубь яйцевой камеры, а ФК даже на последних стадиях развития яйцевой камеры располагаются только на заднем конце камеры, не покрывая передней поверхности ооцита (рис. 13 Б, Д, З, В, Е, И). В результате у мутантов ооцит внедряется в область, занимаемую питающими клетками (рис. 13 Б, Д, В, Е). Следует отметить, что такие нарушения миграции ЦК могут являться причиной стерильности самок дрозофилы.

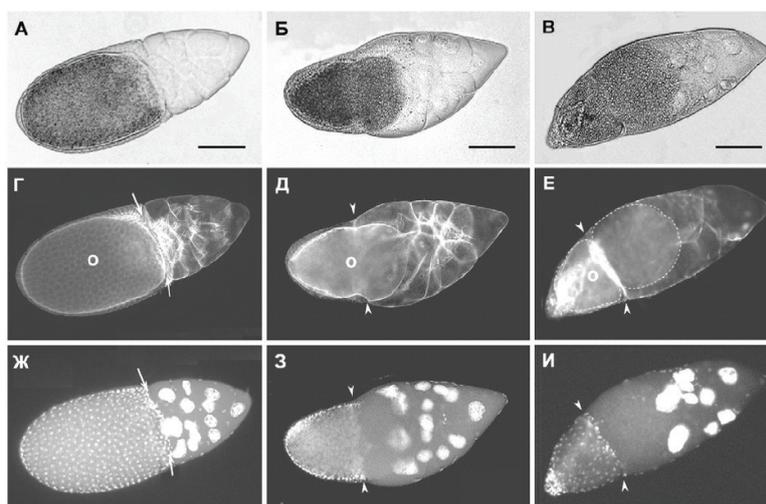


Рис. 13. Нарушение миграции ЦК у *Trl*-мутантов. А, Г, Ж — камеры дикого типа на 10-й стадии развития. В норме ЦК (указаны стрелками) проникают внутрь камеры между ооцитом и ПК. Б, Д, З — камера мутанта *Trl^{en82}/Trl^{R85}*; В, Е, И — камера мутанта *Trl^{362(ex)}/Trl^{R85}*. У мутантов центрипетальные клетки не проходят вглубь камеры. Г, Д, Е — яйцевые камеры, окрашены фаллоидином (О — ооцит). Ж, З, И — яйцевые камеры, окрашены DAPI. Треугольниками указана граница, где кончается миграция ФК. Масштаб 100 мкм.

3) У *Trl*-мутантов нарушено формирование дорзальных выростов хориона (ДВХ). ДВХ это специализированные структуры, расположенные на краю яйца и обеспечивающие дыхание развивающегося эмбриона. У *Trl*-мутантов ДВХ значительно короче, чем в норме и имеют неправильную форму (рис. 14 ; Огиенко и др., 2008б; Омелина и др., 2011). Неправильные ДВХ могут быть причиной гибели развивающихся эмбрионов.

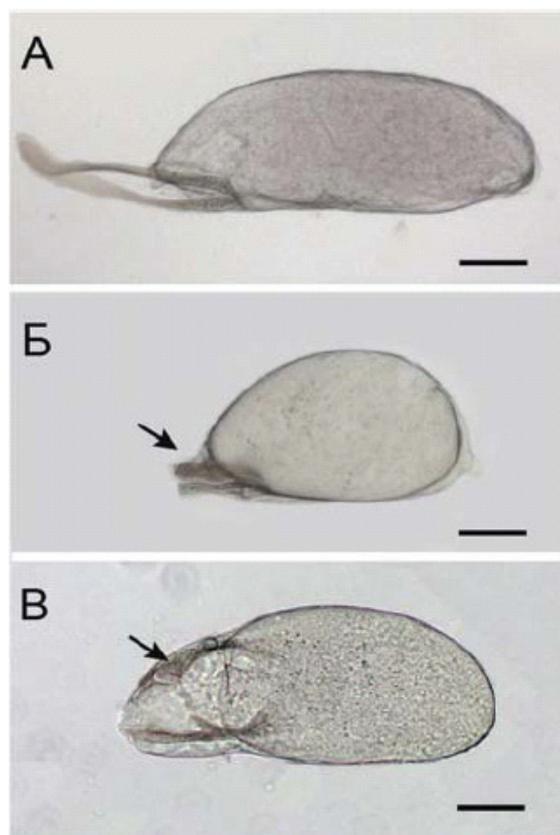


Рис. 14. Морфология яиц самок дикого типа и *Trl*-мутантов. А —яйцо самки дикого типа (*Oregon R*). Б — яйцо самки *Trl*^{en82}/*Trl*^{R85}. В — яйцо самки *Trl*^{362(ex)}/*Trl*^{R85}. Размер яиц у *Trl*-мутантов сильно уменьшен, укорочены дорзальные выросты хориона (указаны стрелкой). Масштаб 100 мкм.

6. Причины нарушения оогенеза у *Trl*-мутантов

Мы полагаем, что причиной многочисленных нарушений оогенеза у *Trl*-мутантов является нарушение экспрессии его генов-мишеней, контролирующих данный процесс. Потенциальные гены-мишени отбирались по принципу наличия сайтов связывания ТФ GAGA в их регуляторных областях. Для этого использовались данные проекта modENCODE (<http://www.modencode.org/>), и созданный нами и экспериментально верифицированный метод распознавания GAGA-сайтов (Omelina *et al.*, 2011). Для поиска GAGA-сайтов были отобраны гены, влияющие на оогенез дрозофилы сходным с геном *Trl* образом. Для отбора потенциальных генов-мишеней также был использован выполненный нами микрочиповый анализ, позволивший выявить гены, меняющие свою экспрессию на фоне уменьшения количества белка GAGA. Таким образом, для дальнейшего анализа мы отобрали гены *dome*, *sn*, *chic*, *sax*, *tkv*, *N*, *bun*, *grk*, *br*, *Act5C*, *cpb*, *dpp*, *tsr*, *Dl*, *jar*. Было исследовано генетическое взаимодействие между отобранными генами и геном *Trl*, а также была исследована экспрессия этих генов на фоне снижения количества белка GAGA.

В результате было установлено, что нарушения в формировании ЦАФ у *Trl*-мутантов связаны с неправильным функционированием гена *sax*. Известно, что нарушение в экспрессии данного гена приводит к нарушению в формировании ЦАФ

в питающих клетках яйцевой камеры дрозифилы (Twombly *et al.*, 1996). Авторы считают, что белок Sax, влияя на формирование ЦАФ, взаимодействует с белками 60A или SCREW. Уровень экспрессии гена *sax* снижается у *Trl*-мутантов более чем в два раза (Омелина и Коханенко, 2014). Этот ген демонстрирует также генетическое взаимодействие с геном *Trl* (рис. 15). Так, у самок генотипа *sax^{4/+}; Trl^{R85/+}* около 85 % камер, находящихся на 10В или более поздних стадиях развития, имеют нарушения в формировании ЦАФ (n = 55). У мутантов *sax^{5/+}; Trl^{R85/+}* число камер с нарушенной структурой ЦАФ достигает 75 % (n = 35). При этом в контрольных линиях (*sax/+*, и *Trl/+*) таких камер не более 9 %.

Мы полагаем, что отставание в миграции БК связано с нарушением экспрессии генов *jar* и *Act5C*. Мутации по этим генам усиливают мутантный фенотип мутации *Trl^{R85}* даже в одной дозе. У дигетерозигот по генам *Trl* и *jar* процент камер с отставанием БК в процессе их миграции на 9-й стадии равен 53,9 % (мутация гена *jar³²²*; n = 89) и 67,5 % (мутация гена *jar¹⁶⁴⁶*; n = 256) (рис. 16). Добавление мутации по гену *Act5C* в геном *Trl*-мутантов приводит к увеличению числа камер с отставшими БК до 52 % (мутация *Act5C^{G0177}*; n = 44). Мы показали, что гены *Act5C* и *jar* меняют свою экспрессию на фоне уменьшения количества белка GAGA.

Было установлено, что наиболее вероятной причиной нарушения формирования ДВХ у *Trl*-мутантов является нарушение экспрессии генов *dpp*, *sax* и *Dl*, играющих решающую роль в этом процессе. С помощью ОТ-ПЦР в «реальном времени» мы показали, что экспрессия генов *dpp* и *Dl* в целых яичниках *Trl³⁶²/Trl^{R85}*-мутантов уменьшается в

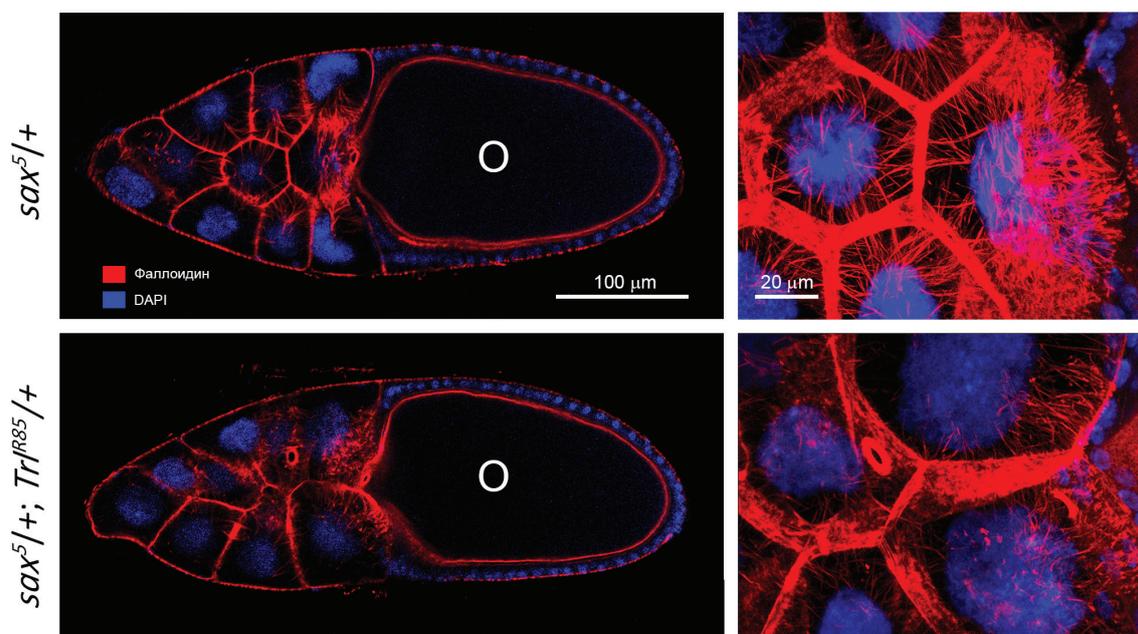


Рис. 15. Усиление дефектов в формировании ЦАФ у *sax*-мутантов на фоне мутаций гена *Trl*. В ПК компандов *sax^{5/+}; Trl^{R85/+}* количество ЦАФ сильно снижено и они значительно короче чем в норме. О — ооцит.

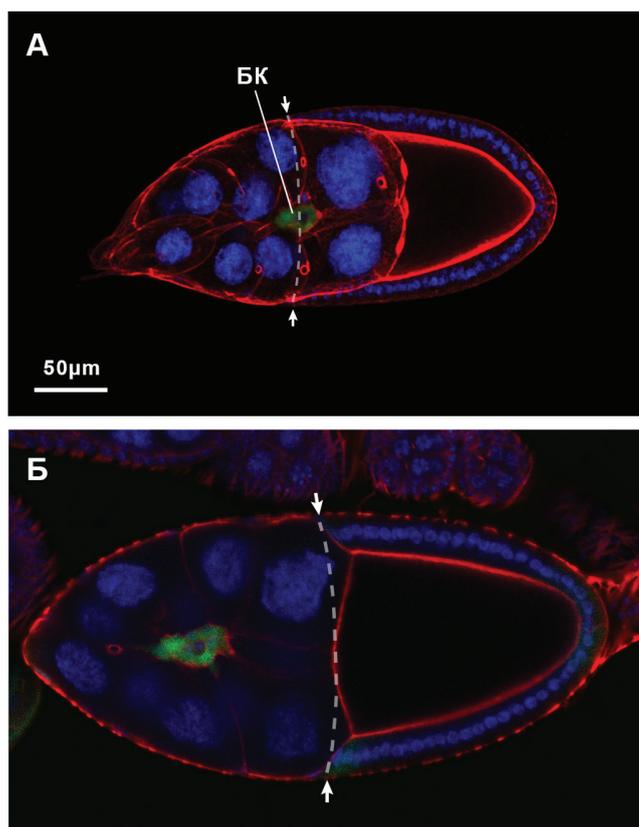


Рис. 16. Нарушение миграции БК у мутантов по гену *jar* на фоне снижения количества белка GAGA. (А) Контроль: яйцевая камера *jar*^{1646/+} на середине 9 стадии развития. Пунктиром показана граница мигрирующих ФК. Миграция БК происходит синхронно с миграцией ФК, покрывающих яйцевую камеру. (Б) Яйцевая камера *Trl*^{R85}/*jar*¹⁶⁴⁶ в конце 9 стадии развития. У трансгетерозигот наблюдается отставание БК от границы мигрирующих ФК.

два раза. Как отмечалось выше, экспрессия гена *sax* также снижается у *Trl*-мутантов. Кроме того, гены *sax* и *dpp* генетически взаимодействуют с геном *Trl* в ходе формирования ДВХ (Омелина и Коханенко, 2014).

Важными генами, влияющими на миграцию ЦК являются гены *dpp* и *EcR*, экспрессия которых нарушена у *Trl*-мутантов по данным ОТ-ПЦР в «реальном времени» и микрочипового анализа. Поэтому мы полагаем, что нарушение экспрессии этих генов является причиной аномалий в миграции ЦК у *Trl*-мутантов.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в процессе оогенеза дрозофилы ТФ GAGA регулирует работу ряда генов. Следует отметить, что нами установлено, что в разных типах клеток яйцевой камеры ТФ GAGA регулирует работу разных генов (рис. 17).

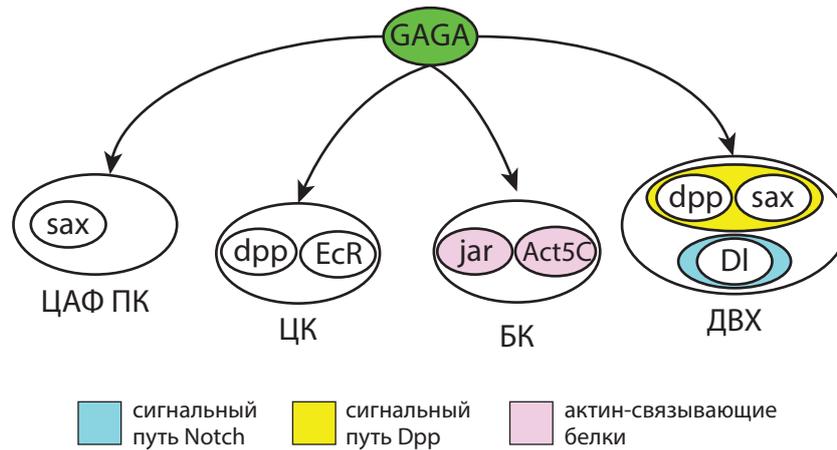


Рис. 17. Гены-мишени ТФ GAGA в разных типах клеток яйцевой камеры дрозофилы.

7. GAGA влияет на миграцию клеток зародышевой линии (КЗЛ) в ходе эмбриогенеза *Drosophila melanogaster*

Впервые было установлено, что недостаток белка GAGA приводит к нарушению миграции КЗЛ в процессе эмбриогенеза (Dorogova *et al.*, 2014). На первых этапах эмбриогенеза на заднем конце эмбриона у *Trl*-мутантов также как и в норме формируются

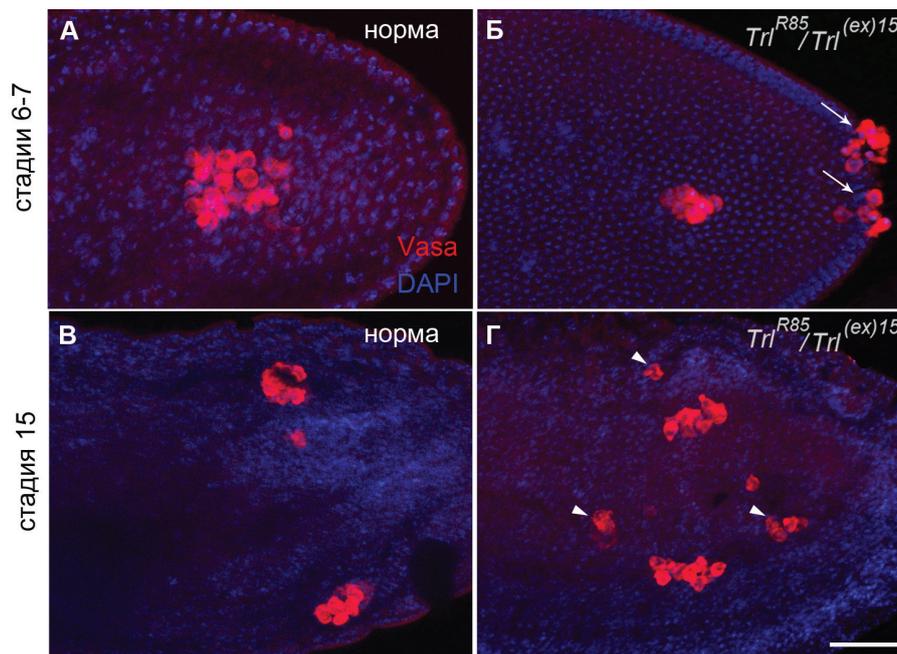


Рис. 18. Нехватка белка GAGA приводит к нарушениям в миграции КЗЛ в ходе эмбриогенеза. (А, Б) Начало миграции КЗЛ на стадии 6–7 эмбриогенеза. (А) Эмбрионы дикой линии. КЗЛ мигрируют одной группой. (Б) У *Trl*-мутантов некоторые КЗЛ теряют способность мигрировать (показаны стрелками) и остаются на заднем конце эмбрионов. (В, Г) Конец миграции КЗЛ на 14–15 стадиях. (В) В эмбрионах дикого типа отчетливо видны две группы КЗЛ. (Г) У *Trl*-мутантов КЗЛ не формируют две отчетливые группы, некоторые КЗЛ не могут выйти из мезодермы (указаны треугольниками). КЗЛ окрашены с помощью антител к маркирующему их белку Vasa (красный), ДНК окрашена DAPI (синий). Масштаб 50 μm.

два кластера КЗЛ. Отличия начинаются на 6–7 стадиях эмбриогенеза, когда эти клетки отделяются от эмбрионального синцития и переносятся в карман заднего отдела средней кишки. У мутантов эти клетки не движутся одной общей группой как в норме (рис. 18 А), а зачастую мигрируют разрозненно (рис. 18 Б). В дальнейшем (стадия 15) в норме КЗЛ формируют две зачаточные гонады (рис. 18 В), тогда как у мутантов они часто оказываются разбросанными по всему эмбриону (рис. 18 Г).

Следует отметить, что характер нарушений, которые мы наблюдали у *Trl*-мутантов, схож с нарушениями на этой стадии у мутантов по генам *stat92E*, *tre-1*, *zfh-1*, *14-3-3ε* (Li *et al.*, 2003; Broihier *et al.*, 1998; Tsigkari *et al.*, 2012; Kunwar *et al.*, 2003). Поэтому эти гены могут быть потенциальными генами-мишенями белка GAGA, а нарушение их экспрессии — причиной дефектов в миграции КЗЛ у *Trl*-мутантов. Однако известно, что среди генов, контролирующих процесс миграции КЗЛ, много генов развития (Moore *et al.*, 1998), например гены *Abd-B* и *ftz*, которые являются генами-мишенями ТФ GAGA (Shimojima *et al.*, 2003; Bhat *et al.*, 1996). На рис. 19 представлена схема сети генетически взаимодействующих генов, контролирующих разные этапы миграции КЗЛ. Из неё

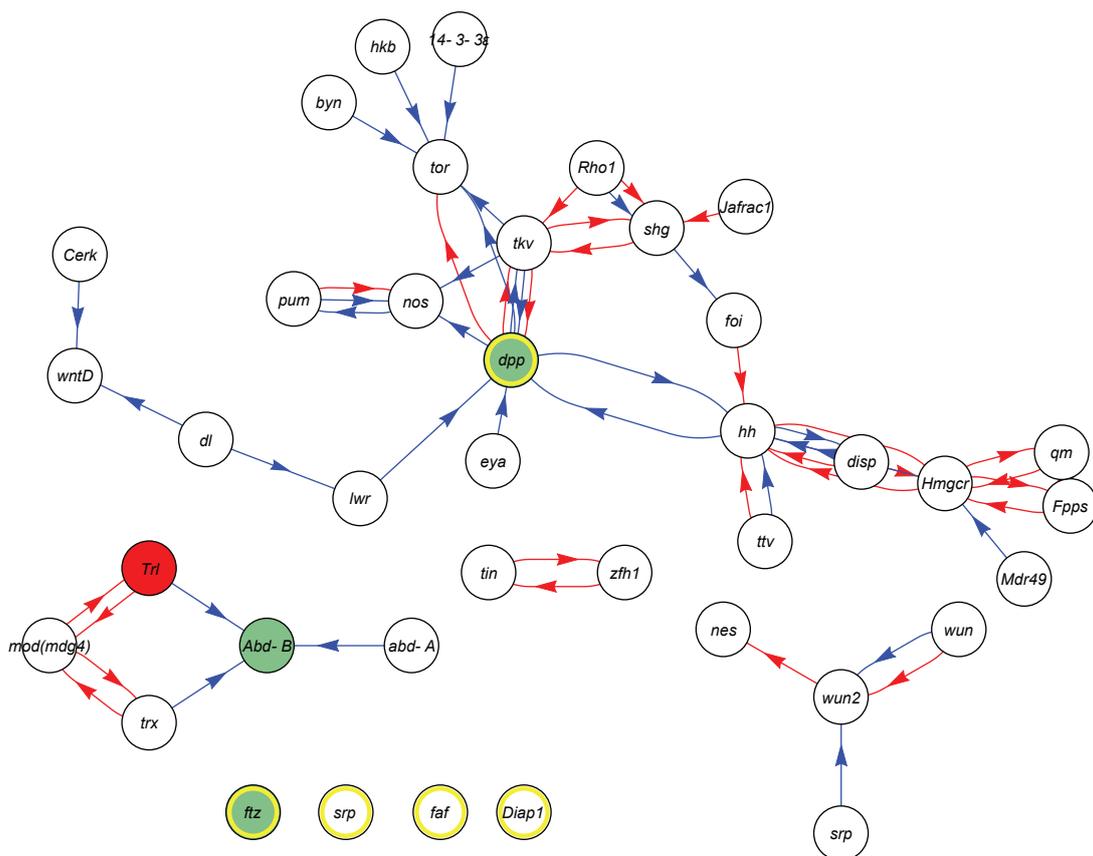


Рис. 19. Сеть генетически взаимодействующих генов, влияющих на миграцию КЗЛ по данным FlyBase. Красные стрелки — усиление фенотипа, синие стрелки — супрессия. Зеленым цветом показаны известные из литературы гены, содержащие GAGA-сайты. Желтым обведены гены, экспрессия которых меняется в яичниках на фоне снижения количества GAGA по данным микроципового анализа.

видно, что важную роль в этом процессе играет ген *dpp*, который взаимодействует со многими другими генами, контролирующими миграцию КЗЛ. Следует напомнить, что в ходе оогенеза экспрессия гена *dpp* уменьшается на фоне снижения количества белка GAGA. Поэтому мы предполагаем, что возможной причиной нарушения миграции КЗЛ может быть нарушение экспрессии этого гена. Кроме того, на миграцию КЗЛ влияют гены *serpent (srp)*, *fat facets (faf)* и *Death-associated inhibitor of apoptosis 1 (Diap1)*, экспрессия которых меняется в яичниках *Trl*-мутантов по данным проведенного нами микрочипового анализа.

8. GAGA влияет на сперматогенез *D. melanogaster*

Нами впервые было продемонстрировано, что недостаток GAGA приводит к нарушениям процесса сперматогенеза и снижает фертильность самцов. У *Trl*-мутантов выявляются многочисленные дефекты в структуре цитоплазмы и особенно митохондрий в зародышевых клетках, находящихся на ранних и поздних стадиях сперматогенеза. Патологические изменения в цитоплазме, приводящие к гибели клеток, начинается уже у личинок 3 возраста, а в дальнейшем этот процесс усиливается. У *Trl^{R85}/Trl^{ex(15)}* мутантов, характеризующихся наиболее сильными отклонениями в ходе сперматогенеза, наблюдается значительное нарушение структуры митохондрий. Они значительно крупнее нормальных и имеют сильно разряженный электронно-прозрачный матрикс, их наружная мембрана в некоторых местах лишена четких очертаний и выглядит разрыхленной. Внутри таких митохондрий часто отсутствуют кристы (рис. 20). В норме митохондрии равномерно распределены в цитоплазме в виде компактных телец, а у *Trl*-мутантов часто наблюдается агрегация митохондрий и образование локальных их скоплений, не характерных для этой стадии. В дальнейшем в клетках появляются многочисленные аутофагосомы, включающие в себя клеточные органеллы и участки цитоплазмы. В результате у мутантов *Trl^{R85}/Trl^{ex(15)}* наблюдается быстрая и масштабная вакуолизация цитоплазмы, которая заканчивается массовым лизисом как внутриклеточных структур, так и плазматической мембраны. Все выше перечисленные дефекты приводят драматическому снижению фертильности *Trl*-мутантов. Однако самцы *Trl*-мутантов показывают полностью нормальный сперматогенез и нормальную фертильность при введении трансгена *hsp83:GAGA-519* (Dorogova *et al.*, 2014). Это указывает на то, что именно снижение количества GAGA является причиной нарушений сперматогенеза у *Trl*-мутантов.

9. Влияние белка GAGA на формирование глаза дрозофилы

Ранее было показано, что уменьшение количества белка GAGA приводит к огрублению поверхности глаза, изменению количества и размера первичных пигментных клеток, увеличению количества пигментных клеток, располагающихся вокруг омматидиев, отсутствию некоторых щетинок (Farkas *et al.*, 1994; Dos-Santos *et al.*, 2008). Использование полученных нами мутантов по гену *Trl* позволило выявить целый ряд новых дефектов,

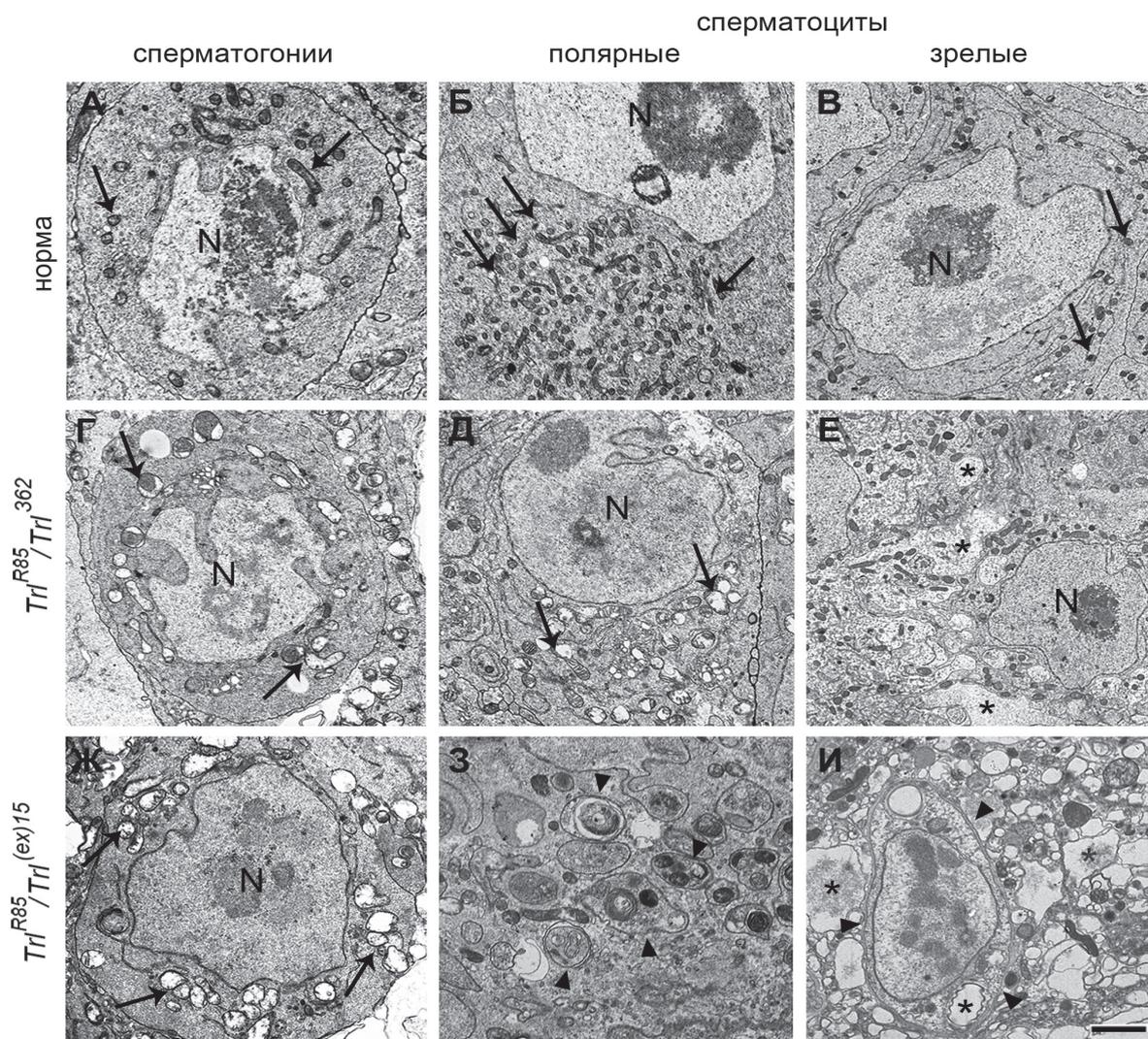


Рис. 20. Электронно-микроскопическое исследование дефектов сперматогенеза в норме и у *Trl*-мутантов на разных стадиях (сперматогонии, полярные сперматоциты и зрелые сперматоциты). У самцов дикого типа видны митохондрии нормальной морфологии. Митохондрии компактны и равномерно распределены по цитоплазме клеток. У мутантов Trl^{R85}/Trl^{362} митохондрии неправильной формы, виден лизис цитоплазмы и деградирующие сперматогонии и сперматоциты. У мутантов $Trl^{R85}/Trl^{362(ex)15}$, дефекты усиливаются. Наблюдается формирование аутофагосом и массовый лизис органелл и цитоплазмы. N — ядро. Стрелками указаны митохондрии.

возникающих в процессе формирования глаза дрозофилы, на фоне недостатка ТФ GAGA. Нами впервые было продемонстрировано, что у *Trl*-мутантов наблюдается: 1) изменение количества фотонейронов; 2) изменение количества конусных клеток; 3) изменение ориентации отдельных омматидиев; 4) изменение организации рядов из омматидиев.

В нашей работе был впервые осуществлен поиск генов, ответственных за наблюдаемые дефекты в развитии глаз *Trl*-мутантов. Мы полагаем, что нарушения структуры глаз *Trl*-мутантов могут быть связаны с изменением экспрессии гена *lz* и генов комплекса *Bar*, нарушение экспрессии которых приводит к дефектам, сходным с теми, которые наблюдаются у *Trl*-мутантов. Нами установлено, что эти гены, играющие важную роль

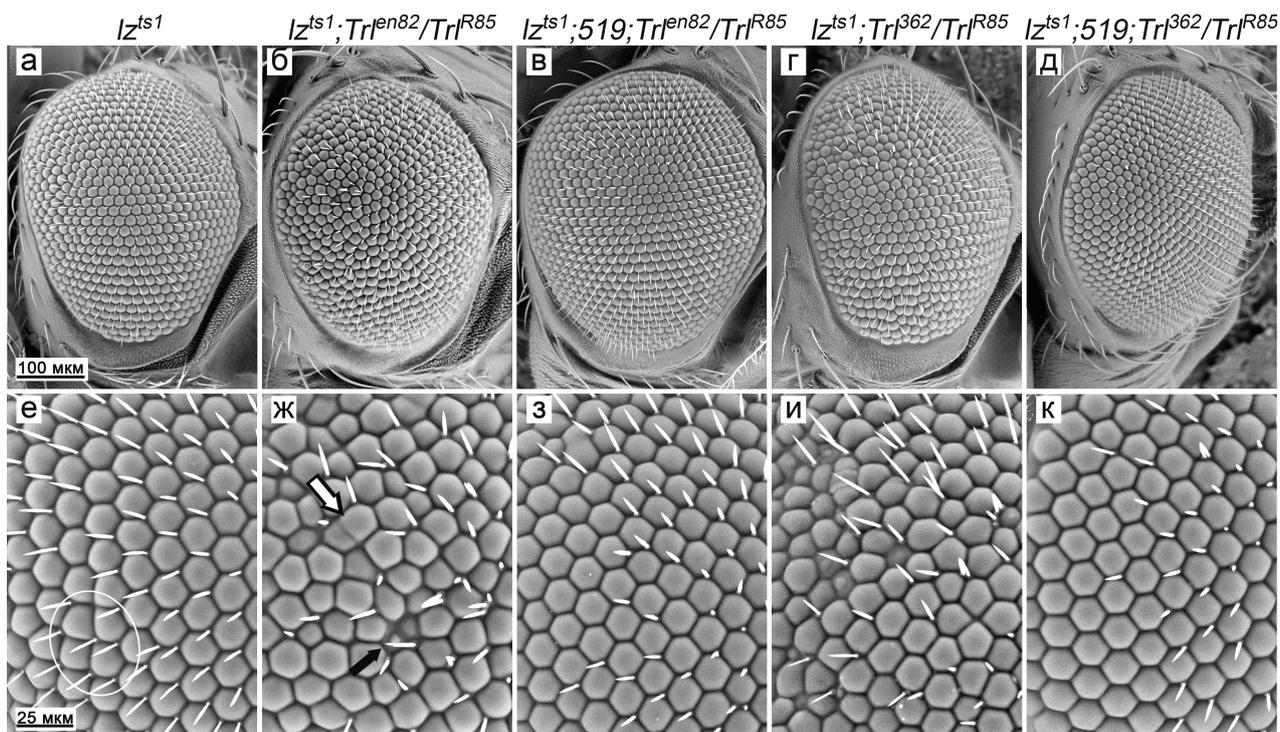


Рис. 21. Усиление проявления мутации lz^{ts1} на фоне мутаций по гену Trl . Глаза самцов мутантов: (а, е) lz^{ts1}/Y ; (б, ж) $lz^{ts1}/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}$; (г, и) $lz^{ts1}/Y; Trl^{362}/Trl^{R85}$. (б, ж, г, и) Локализация многих щетинок изменена, а четкость рядов линз нарушена. На заднем краю глаза многие линзы имеют ненормальную форму и размер, наблюдаются слитые (белая стрелка) и плохо сформированные линзы (черная стрелка). (в, з, д, к) Коррекция фенотипа мутантов $lz^{ts1}/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}$ (в, з) и $lz^{ts1}/Y; Trl^{362}/Trl^{R85}$ (д, к) путем введения двух копий трансгена $hsp83:GAGA-519$ (519), экспрессирующего мРНК, дающую начало белку GAGA-519. Масштаб: 100 мкм (а–д), 25 мкм (е–к).

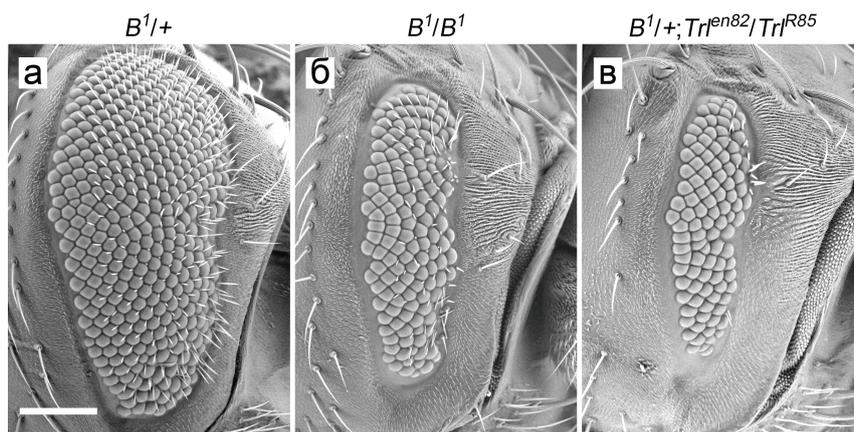


Рис. 22. Усиление проявления мутации гена $BarH1$ ($B1$) на фоне мутаций по гену Trl . (а) Глаз самки $B1/+$. В среднем глаз самки $B1/+$ содержит 350 омматидиев, что примерно в половину меньше, чем в норме. На переднем краю глаза видна выемка. (б) Глаз самки $B1/B1$. Глаз самки $B1/B1$ в среднем содержит 90 омматидиев. (в) Глаз самки $B1/+; Trl^{en82}/Trl^{R85}$. Глаз состоит из 76 омматидиев. По размеру и форме он схож с глазом гомозигот $B1/B1$. Отличительной особенностью глаза мутантов $B1/+; Trl^{en82}/Trl^{R85}$ является полное отсутствие большинства щетинок, в норме располагающихся вокруг омматидидиев. Масштаб: 100 мкм.

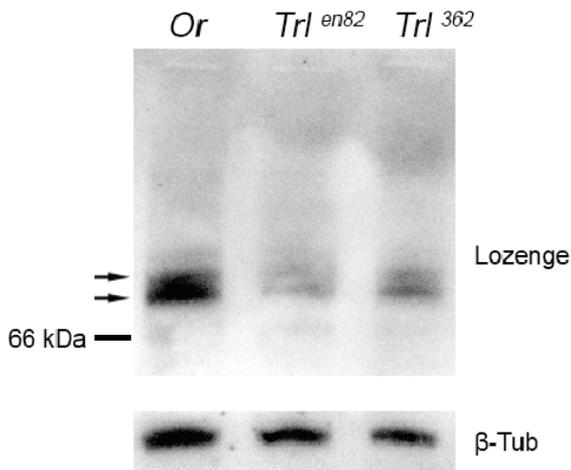


Рис. 23. Результаты иммуно-блот-гибридизации с моноклональными антителами против белка Lz демонстрируют снижение количества белка Lz у *Trl*-мутантов. На дорожки блота нанесены экстракты из глазо-антеннальных имагинальных дисков предкуколок дрософилы генотипов *OregonR*, *Trl^{en82}/Trl^{R85}* и *Trl³⁶²/Trl^{R85}*. Чертой отмечено положение белка BSA, молекулярный вес которого составляет 66 кДа. Во всех образцах выявляется две полосы (отмечены стрелками), соответствующие двум известным изоформам белка Lz. Внизу представлена гибридизация этого же блота с моноклональными антителами против β -Tub, используемого в качестве контроля нанесения.

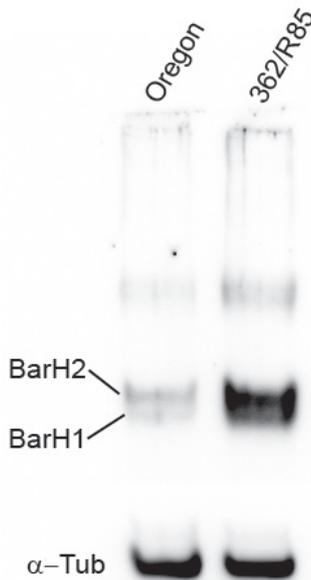


Рис. 24. Результаты иммуно-блот-гибридизации с антителами против белков Bar демонстрируют увеличение количества белков комплекса *Bar* у *Trl*-мутантов. На дорожки блота нанесены экстракты из глазо-антеннальных имагинальных дисков предкуколок дрософилы генотипов *OregonR* и *Trl³⁶²/Trl^{R85}*. Во всех образцах выявляется две полосы, соответствующие двум генам комплекса *Bar* (*BarH1* и *BarH2*). Внизу представлена гибридизация этого же блота с моноклональными антителами против β -Tub, используемого в качестве контроля нанесения.

в процессе формирования глаза, демонстрируют генетическое взаимодействие с геном *Trl* (рис. 21, 22). В регуляторных областях этих генов найдены сайты связывания GAGA.

С помощью Вестерн-блот-анализа показано снижение относительного количества белка Lz в глазо-антеннальных имагинальных дисках 0-часовых предкуколок мутантов *Trl^{en82}/Trl^{R85}* и *Trl³⁶²/Trl^{R85}* до уровня 50 и 80 % от нормы, соответственно (рис. 23). Экспрессия же генов комплекса *Bar* усиливается на фоне уменьшения экспрессии гена *Trl* (рис. 24). Известно, что дефекты формирования глаза у мутантов *B¹* связаны с увеличением экспрессии гена *BarH1* (Kojima *et al.*, 1991). На фоне *Trl*-мутаций нарушения формирования глаза у мутантов *B¹/+* усиливаются, что свидетельствует о том, что в норме белок GAGA обеспечивает репрессию генов *Bar*. О том, что белок GAGA может участвовать в подавлении активности генов, свидетельствует его участие в подавлении экспрессии собственного гена (Kosoy *et al.*, 2002), а также присутствие GAGA в белковых

комплексах, обеспечивающих репрессию генов (Horard *et al.*, 2000; Czermin *et al.* 2001; Roux *et al.*, 2001; Tie *et al.*, 2003).

Выводы

- 1) Показана специфичность экспрессии гена *Trithorax-like*, кодирующего транскрипционный фактор GAGA, в разных органах *D. melanogaster* в течение онтогенеза. Наибольший уровень экспрессии гена зарегистрирован у эмбрионов в формирующейся нервной трубке, у личинок разных возрастов в мозго-вентральном ганглии и прилегающих имагинальных дисках, а также в мозге и половой системе самок имаго. Установлено, что основными транскриптами гена *Trl* на всем протяжении онтогенеза являются транскрипт длиной 2,5 т. н., соответствующий изоформе GAGA-519 и транскрипт 3 т. н., соответствующий изоформе GAGA-581, однако представленность каждого из них сильно варьирует в зависимости от стадии развития или типа ткани.
- 2) Получена серия гипоморфных мутаций гена *Trithorax-like D. melanogaster*, необходимых для проведения структурно-функционального анализа гена: 6 новых мутаций, затрагивающих 5'-некодирующую область, и 10 новых мутаций, локализованных во втором интроне.
- 3) Показано значение разных участков промоторной области гена *Trl* для обеспечения тканеспецифичной экспрессии гена в контексте целого организма, а также продемонстрирована универсальная роль протяженного участка, расположенного выше стартов транскрипции, для обеспечения высокого уровня активности гена во всех проанализированных органах.
- 4) Во втором интроне (2,36 т. п. н.) гена *Trl* выявлены два участка, вовлеченные в регуляцию его экспрессии. Показано, что в обоих участках сосредоточены сайты, гиперчувствительные к действию ДНКазы I, эволюционно-консервативные последовательности и многочисленные сайты связывания GAGA и других транскрипционных факторов.
- 5) Впервые продемонстрировано плеiotропное действие транскрипционного фактора GAGA на процессы морфогенеза ряда органов *D. melanogaster*:
 - а) Показано, что недостаток белка GAGA у *Trl* мутантов приводит к различным дефектам в морфологии и функционировании всех типов клеток яйцевой камеры дрозофилы, что связано с изменением экспрессии ряда важнейших регуляторов оогенеза дрозофилы, включая гены *saxophone*, *jaguar*, *Actin5C*, *decapentaplegic* и *Delta*.
 - б) Впервые показано участие белка GAGA в развитии половой системы самцов *D. melanogaster*. Установлено, что уменьшение его количества приводит к снижению числа зародышевых клеток на разных стадиях формирования половой

системы, к нарушениям в морфологии митохондрий в этих клетках, а также к аутофагии в ходе сперматогенеза.

- в) Установлено, что в развивающемся глазу *Trl* мутантов наблюдается изменение количества фотонейронов и конусных клеток, а также изменение ориентации отдельных омматидиев и структуры рядов из омматидиев. Показано, что эти эффекты связаны с изменением экспрессии генов *lz* и *Bar*, которые, согласно полученным данным, являются генами-мишенями GAGA.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кокоза В. А., **Баричева Э. М.**, Катохин А. В. Клонирование и цитогенетическая локализация эволюционно консервативных экспрессирующихся в головах имаго геномных последовательностей *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1991. – Т. 27, № 1. – С. 51-60.
2. Перельгина Л. М., **Баричева Э. М.**, Себелева Т. Е., Катохин А. В., Соловьева И. В., Кокоза В. А. Изучение особенностей экспрессии последовательностей Nc18A, Nc34CD, Nc70F и Nc98F из генома *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 1992. – Т. 28, № 3. – С. 98-104.
3. Перельгина Л. М., **Баричева Э. М.**, Себелева Т. Е., Кокоза В. А. Эволюционно-консервативный ген *Nc70F*, экспрессирующийся в нервной ткани *Drosophila melanogaster*, кодирует белок, гомологичный δ транскрипционному фактору мыши // Генетика. – 1993. – Т. 29, № 10. – С. 1597-607.
4. **Baricheva E. M.**, Katokhin A. V., Perelygina L. M. Expression of *Drosophila melanogaster* gene encoding transcription factor GAGA is tissue-specific and temperature-dependent // FEBS Letters. – 1997. – Vol. 414, № 2. – P. 285-288.
5. **Баричева Э. М.**, Катохин А. В., Перельгина Л. М. Особенности экспрессии гена, кодирующего транскрипционный фактор GAGA *D. melanogaster*: тканеспецифичность и зависимость от температуры // Доклады Академии Наук. – 1997. – Т. 355, № 6. – С. 827-829.
6. Катохин А. В., Пиндюрин А. В., Федорова Е. В., **Баричева Э. М.** Молекулярно-генетический анализ гена *Trithorax-like*, кодирующего транскрипционный фактор GAGA *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 467-474.
7. Трунова С. А., Федорова С. А., Лебедева Л. И., Булгакова Н. А., Омелянчук Л. В., Катохин А. В., **Баричева Э. М.** Влияние некоторых мутаций по гену *Trl* на митоз в эмбриональной и личиночной тканях и морфологию яйцевых камер у *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 12. – С. 1604-1615.

8. Огиенко А. А., Карагодин Д. А., Федорова С. А., Федорова Е. В., Лашина В. В., **Баричева Э. М.** Влияние гипоморфной мутации гена *Trithorax-like* на оогенез *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. – 2006. – Т. 37, № 3. – С. 157–166.
9. Федорова Е. В., Огиенко А. А., Карагодин Д. А., Айманова К. Г., **Баричева Э. М.** Получение и анализ новых мутаций по гену *Trithorax-like* *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 149-158.
10. Огиенко А. А., Федорова С. А., **Баричева Э. М.** Основные аспекты развития половой системы самок *Drosophila melanogaster* // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 10. – С. 1341-1357.
11. Огиенко А. А., Карагодин Д. А., Павлова Н. В., Федорова С. А., Волошина М. В., **Баричева Э. М.** Молекулярно-генетическая характеристика новой гипоморфной мутации гена *Trithorax-like* и анализ ее влияния на оогенез *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. – 2008. – Т. 39, № 2. – С. 134-142.
12. Огиенко А. А., Лаухина О. В., Васильев Г. В., **Баричева Э. М.** Нарушение функционирования соматических клеток в яйцевых камерах *Drosophila melanogaster* у мутантов по гену *Trithorax-like* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2008. – Т. 12, № 3. – С. 399-405.
13. Фёдорова Е. В., Пиндюрин А. В., **Баричева Э. М.** Поддержание паттернов экспрессии гомеозисных генов в развитии *Drosophila melanogaster* белками групп Polycomb, trithorax и ETP // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 10. – С. 1301-1318.
14. Fedorova S. A., Karagodin D. A., Ogienko A. A., **Baricheva E. M.** Cytoplasmic transport during *Drosophila* oogenesis // OVARIAN CYSTS: SYMPTOMS, CAUSES AND TREATMENT. Nova Science Publishers, Inc., 2010. – P. 77-93.
15. Павлова Н. В., Карагодин Д. А., Байбородин С. И., **Баричева Э. М.** Анализ структуры глаза мутантов по гену *Trithorax-like* *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2010. – Т. 14, № 3. – С. 558-568.
16. Omelina E. S., **Baricheva E. M.**, Oshchepkov D. Y., Merkulova T. I. Analysis and recognition of the GAGA transcription factor binding sites in *Drosophila* genes // Computational Biology and Chemistry. – 2011. – Vol. 35, № 6. – P. 363-370.
17. Омелина Е. С., Павлова Н. В., Огиенко А. А., **Баричева Э. М.** Для формирования дорзальных выростов хориона *Drosophila melanogaster* требуется белок GAGA // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 436, № 5. – С. 696-698.
18. Огиенко А. А., **Баричева Э. М.**, Байбородин С. И. Архитектура клеточного скелета // Наука из первых рук. – 2012. № 3. – С. 100-103.
19. Омелина Е. С., **Баричева Э. М.** Основные компоненты генной сети, контролирующей развитие дорзальных выростов хориона яиц *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. – 2012. – Т. 43, № 3. – С. 163-174.

20. Омелина Е. С., **Баричева Э. М.**, Федорова Е. В. Основные типы строения респираторных систем яйцевых оболочек насекомых и гены, участвующие в их формировании // Журнал общей биологии. – 2012. – Т. 73, № 3. – С. 198-209.
21. Karagodin D. A., Omelina E. S., Fedorova E. V., **Baricheva E. M.** Identification of functionally significant elements in the second intron of the *Drosophila melanogaster* *Trithorax-like* gene // Gene. – 2013. – Vol. 520, № 2. – P. 178-184.
22. Ogienko A. A., Karagodin D. A., Lashina V. V., Baiborodin S. I., Omelina E. S., **Baricheva E. M.** Capping protein beta is required for actin cytoskeleton organisation and cell migration during *Drosophila* oogenesis // Cell Biol Int. – 2013. – Vol. 37, № 2. – P. 149-59.
23. Dorogova N. V., Fedorova E. V., Bolobolova E. U., Ogienko A. A., **Baricheva E. M.** GAGA protein is essential for male germ cell development in *Drosophila* // Genesis. – 2014. – Vol. 52, № 8. – P. 738-51.
24. Дорогова Н. В., Хрущева А. С., Федорова Е. В., Огиенко А. А., **Баричева Э. М.** Роль фактора GAGA в миграции примордиальных зародышевых клеток и формировании гонад дрозофилы // Онтогенез. – 2016. – Т. 47, № 1. – С. 40-48.
25. Карагодин Д. А., Баттулина Н. В., Меркулова Т. И., Баричева Э. М. Анализ причин нарушения экспрессии гена *Trithorax-like* *Drosophila melanogaster* у мутантов *Trl³⁶⁰⁹* // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 471, № 6. – С. 732-735.

