

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

БАРИЧЕВА ЭЛИНА МИХАЙЛОВНА

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

03.02.07 — генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
д. б. н., профессор Т. И. Меркулова

Новосибирск — 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1. Характеристика гена <i>Trithorax-like</i>	18
1.1.1. Структура и экспрессия гена <i>Trithorax-like</i>	18
1.1.2. Регуляция экспрессии гена <i>Trl</i>	20
1.1.3. Структура белка GAGA	22
1.1.3.1. Доменная структура белка GAGA.....	23
1.1.4. Эволюционная консервативность белка GAGA.....	26
1.1.5. Взаимодействие изоформ белка GAGA между собой, а также с другими белками и белковыми комплексами	27
1.1.6. Роль белка GAGA в регуляции экспрессии генов	30
1.1.6.1. Белок GAGA играет важную роль в регуляции экспрессии генов дрозофилы, изменяя структуру хроматина в регуляторных элементах генов.....	30
1.1.6.2. Белок GAGA влияет на транскрипцию, воздействуя на функционирование инсуляторов	32
1.1.6.3. GAGA может влиять на транскрипцию генов, взаимодействуя с белками, связывающимися с ТАТА боксом	32
1.1.6.4. GAGA может участвовать в элонгации транскрипции генов	33
1.1.6.5. GAGA может участвовать в паузировании РНК полимеразы II... 33	
1.1.6.6. GAGA может обеспечивать контакт удаленных регуляторных элементов.....	35
1.1.6.7. Белок GAGA действует как активатор, так и репрессор транскрипции генов	35
1.1.7. Влияние белка GAGA на деление клеток	38
1.1.8. Белок GAGA участвует в обеспечении дозовой компенсации у самцов дрозофилы	39
1.2. Развитие половой системы <i>Drosophila melanogaster</i>	41
1.2.1. Ранние этапы развития половой системы дрозофилы.....	41
1.2.2. Развитие половой системы самок дрозофилы.....	43

1.2.3. Развитие яйцевой камеры после выхода из гермария.....	48
1.2.4. Транспорт питающих веществ, нарабатываемый в питающих клетках в ооцит	56
1.2.4.1. Структура актинового цитоскелета питающих клеток во время быстрого транспорта.....	57
1.2.5. Эволюционная консервативность оогенеза	59
1.3. Развитие половой системы самцов <i>Drosophila melanogaster</i>	60
1.4. Формирование глаза дрозофилы.....	65
1.4.1. Структура глаза дрозофилы	66
1.4.2. Развитие глаза дрозофилы.....	68
1.4.3. Дифференцировка клеток омматидия	69
1.4.4. Генетический контроль дифференцировки клеток омматидия.....	72
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	77
2.1. Материалы, использованные в работе	77
2.2. Олигонуклеотиды используемые в работе	78
2.3. Линии <i>Drosophila melanogaster</i> , использованные в работе	79
2.4. Анализ жизнеспособности дрозофил	81
2.5. Получение мутаций, затрагивающих 5'-область гена <i>Trl</i> с помощью неправильных эксцизий	81
2.6. Введение трансгенов, экспрессирующих кДНК гена <i>Trl</i> , в геном мутантных мух.....	82
2.7. Выделение ДНК	82
2.8. Секвенирование ДНК с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator Ready Mix.....	82
2.9. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	83
2.10. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	83
2.11. Выделение РНК.....	84
2.12. Получение ³² P-меченых ДНК-зондов.....	84
2.13. Гибридизация <i>in situ</i> на гистологических срезах.....	84
2.14. Нозерн-блот гибридизация.....	85
2.15. Обработка РНК ДНКазой I.....	85
2.16. Обратная транскрипция (ОТ).....	86
2.17. Полногеномный анализ экспрессии с использованием микрочипов	86

2.18. ПЦР в «реальном времени»	88
2.19. Вестерн-блот-анализ	88
2.20. Иммунохимическое окрашивание тканей дрозофилы	89
2.21. Окрашивание яичников дрозофилы с помощью фаллоидина	89
2.22. Приготовление препаратов для электронной микроскопии.....	90
2.23. Приготовление полутонких срезов глаз дрозофилы.....	90
2.24. Приготовление препаратов хромосом слюнных желез дрозофилы для световой микроскопии	90

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 91

3.1. Изучение экспрессии гена <i>Trithorax-like</i> в различных органах и тканях в ходе развития <i>Drosophila melanogaster</i>	91
3.2. Анализ 5'-некодирующей области гена <i>Trl</i>	96
3.2.1. Получение и картирование мутаций, затрагивающих 5'-некодирующую область гена <i>Trl</i>	97
3.2.2. Жизнеспособность мутантов с нарушением структуры 5'-области гена <i>Trl</i>	99
3.2.3. Анализ фертильности мутантов с нарушением структуры 5'-области гена <i>Trl</i>	100
3.2.4. Анализ экспрессии гена <i>Trl</i> у мутантов с нарушенной структурой 5'-области гена	103
3.2.4.1. Экспрессия гена <i>Trl</i> на стадии куколки.....	103
3.2.4.2. Экспрессия гена <i>Trl</i> в разных тканях дрозофилы	105
3.2.4.2.1. Экспрессия гена <i>Trl</i> в яичниках.....	105
3.2.4.2.2. Экспрессия гена <i>Trl</i> в комплексе мозг- вентральный ганглий и прилегающих имагинальных дисках	107
3.2.5. Анализ мутантов <i>Trl</i> ³⁶⁰⁹	108
3.3. Анализ регуляторного потенциала второго интрона гена <i>Trl</i> <i>Drosophila melanogaster</i>	113
3.3.1. Получение и картирование мутаций, затрагивающих второй интрон гена <i>Trl</i>	113
3.3.2. Жизнеспособность мутантов с нарушением структуры второго интрона гена <i>Trl</i>	121
3.3.3. Анализ экспрессии гена <i>Trl</i> у мутантов с нарушенной структурой второго интрона гена.....	122

3.3.4. Анализ молекулярной структуры второго интрона гена <i>Trl</i>	123
3.4. Ген <i>Trl</i> и оогенез <i>Drosophila melanogaster</i>	128
3.4.1. Морфологические нарушения, наблюдаемые в питающих клетках <i>Trl</i> -мутантов	130
3.4.1.1. Нарушение числа питающих клеток <i>Trl</i> -мутантов	130
3.4.1.2. Изменение структуры хроматина в питающих клетках <i>Trl</i> -мутантов	133
3.4.1.3. Нарушения в формировании цитоплазматических актиновых филаментов питающих клеток <i>Trl</i> -мутантов	135
3.4.2. Морфологические нарушения ооцита у <i>Trl</i> -мутантов	137
3.4.3. Нарушения в функционировании фолликулярных клеток <i>Trl</i> -мутантов	138
3.4.4. Причины нарушения оогенеза у <i>Trl</i> -мутантов	142
3.4.4.1. Причины нарушения в структуре ЦАФ у <i>Trl</i> -мутантов	145
3.4.4.2. Причины нарушения в функционировании соматических клеток яйцевой камеры <i>Trl</i> -мутантов	148
3.5. Влияние белка GAGA на сперматогенез дрозофилы	154
3.5.1. Развитие половой системы <i>Trl</i> -мутантов на стадии эмбриогенеза ..	156
3.5.2. Формирование гонад у личинок самцов дрозофилы в норме и у <i>Trl</i> -мутантов	161
3.5.3. Сперматогенез на фоне снижения количества белка GAGA	162
3.6. Влияние белка GAGA на формирование глаза дрозофилы	168
3.6.1. Анализ поверхности глаза у <i>Trl</i> -мутантов	168
3.6.2. Анализ полутонких срезов глаз имаго дрозофилы	170
3.6.3. Анализ глазо-антеннальных имагинальных дисков <i>Trl</i> -мутантов	173
3.6.4. Взаимодействие генов <i>Trithorax-like</i> и <i>lozenge</i>	178
3.6.5. Генетическое взаимодействие генов <i>Trl</i> и <i>BarH1</i>	182
3.6.6. Анализ экспрессии генов <i>lz</i> и <i>Bar</i> у мутантов <i>Trl</i> ³⁶² / <i>Trl</i> ^{R85} и <i>Trl</i> ^{en82} / <i>Trl</i> ^{R85}	183
ВЫВОДЫ	190
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	192

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

а. к. — аминокислотный остаток

АТФ — аденозинтрифосфат

БК — бордюрные клетки

дАТФ — дезоксиаденозинтрифосфат

ДВХ — дорзальные выросты хориона

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ — смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов

дУ — дезоксиуридин

е. а. — единица активности

КЗЛ — клетки зародышевой линии

КК — кольцевые каналы

КТ — комнатная температура

мин — минута

об/мин — обороты в минуту

ОТ-ПЦР — обратная транскрипция и последующая ПЦР

п. н. — пара нуклеотидов

ПГК — пигментные клетки

ПК — питающие клетки

ППК — предшественники половых клеток

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РНК — рибонуклеиновая кислота

т. е. — то есть

т. н. — тысяча нуклеотидов

т. п. н. — тысяча пар нуклеотидов

ТФ — транскрипционный фактор

тыс. — тысяча

ФК — фолликулярные клетки

ЦАФ — цитоплазматические актиновые филаменты

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота или её остаток

BrdU — бромдезоксиуридин

BSA — бычий сывороточный альбумин

DEPC — диэтилпирокарбонат

g — ускорение свободного падения

SDS — додецилсульфат натрия

ВВЕДЕНИЕ

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 вовлечен в регуляцию экспрессии многих генов дрозофилы, включая гомеостатические гены, гены теплового шока, домашнего хозяйства и др. (цит. по [Granok et al., 1995](#)). 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, которые могут располагаться как в одной, так и в разных молекулах ДНК ([Mahmoudi et al., 2002](#)). Таким образом, ТФ GAGA участвует в функционировании энхансеров, сайленсеров, граничных элементов и инсуляторов ([Ohtsuki & Levine, 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](#)). Известно, что белок GAGA связывается с GA-богатыми последовательностями, расположенными не только в эухроматине, но также и в гетерохроматине. Возможно он участвует в установлении границ между эу- и гетерохроматином ([Raff et al., 1994](#)). Косвенным свидетельством в пользу предположения о его роли в организации гетерохроматиновых районов может служить тот факт, что мутации гена *Trl* являются доминантными энхансерами эффекта положения мозаичного типа ([Farkas et al., 1994](#)). Кроме того, возможно, что этот белок участвует в формировании «клеточной памяти» о выбранном пути дифференцировки ([Cavalli & Paro, 1998](#)), а также в других процессах.

Хорошо известно, что ген *Trl* экспрессируется практически на всех стадиях онтогенеза дрозофилы. Однако каждая стадия онтогенеза характеризуется строго определенной картиной экспрессии данного гена ([Перелыгина и др., 1992](#); [Soeller et al., 1993](#); [Bhat et al., 1996](#)). Однако, до сих пор плохо изучена экспрессия гена в разных тканях и органах дрозофилы. Плохо изучена также регуляция экспрессии гена *Trl*: к настоящему времени исследован регуляторный потенциал только некоторых фрагментов его 5'-области. Исследования, проведенные на культуре

клеток (Kosoy *et al.*, 2002), не позволяют сделать вывод о значении разных фрагментов этой области для его экспрессии в различных тканях и органах на разных стадиях онтогенеза условиях *in vivo*. Кроме того, в последнее время становится все более очевидным, что наряду с 5'-областями генов, существенный вклад в регуляцию экспрессии генов вносят интроны. Предполагается, что в ряде случаев интроны оказывают даже большее влияние на экспрессию генов, чем промоторные районы (цит. по Rose, 2008). Часто в больших интронах генов располагаются *цис*-регуляторные элементы, участвующие в ткане- или стадия-специфической экспрессии генов. К настоящему времени описано множество как позитивных, так и негативных регуляторных элементов, расположенных в интронах. Однако данные о регуляторном потенциале интронов гена *Trl* в до начала наших исследований полностью отсутствовали. В то же время было известно, что одна из локализованных во втором, самом большом интроне гена *Trl*, мутация *Trl^{EP(3)3184}*, оказывает серьезное влияние на процессы компактизации и сегрегации хромосом, а также на морфологию яйцевых камер самок дрозофилы (Трунова *и др.*, 2001). Это дает основание предполагать, что изменение структуры второго интрона гена *Trl* негативно сказывается на его функционировании.

Уже в первых работах, посвященных гену *Trl*, было показано, что нарушение его экспрессии драматически сказывается на жизнедеятельности мутантов (Farkas *et al.*, 1994). Особи, несущие нуль-аллели данного гена гибнут на стадиях эмбриона или личинки, и только в отдельных случаях мутанты доживают до стадии куколки (Катохин *и др.*, 2001). Влияние белка GAGA на более поздние стадии онтогенеза дрозофилы было изучено крайне слабо. Это объяснялось прежде всего тем, что существовало мало гипоморфных мутаций, которые бы серьезно сказывались на функционировании гена *Trl* и позволяли проследить, к каким последствиям в онтогенезе приводят нарушения в его экспрессии. Анализ наиболее часто используемой гипоморфной мутации *Trl^{l3C}* приводит к серьезным проблемам в процессе митоза в ходе эмбриогенеза мутантов (Bhat *et al.*, 1996; Трунова *и др.*, 2001). Кроме того, авторы отметили, что самки такого генотипа откладывают небольшое количество маленьких яиц неправильной формы (Bhat *et al.*, 1996). Это свидетельствует о нарушениях у этих мутантов процесса оогенеза. Однако авторы не провели анализ влияния GAGA на оогенез дрозофилы. Вероятно, это связано с тем, что в гомозиготе или в сочетании с нуль-аллелем у мутантов *Trl^{l3C}* до стадии имаго доживают только отдельные особи, что сильно затрудняет исследование процесса их развития на постэмбриональных стадиях.

развития. О том, что GAGA должен оказывать влияние на развитие половой системы дрозофилы косвенно свидетельствует также тот факт, что этот белок очень сильно экспрессируется в яичниках самок. Поскольку развитие половой системы самок и самцов имеет общие черты, нельзя исключить, что GAGA может влиять и на развитие половой системы самцов. Однако в литературе отсутствовали какие-либо данные по этому вопросу.

В самых первых работах, посвященных исследованию мутаций гена *Trl* было показано также, что у мутантов нарушена поверхность глаз (Farkas *et al.*, 1994). Позднее было показано, что у мутантов нарушена не только поверхность глаза, но и его внутренняя структура (Dos-Santos *et al.*, 2008). Поскольку GAGA является транскрипционным фактором (ТФ), можно было предполагать, что у *Trl*-мутантов нарушена экспрессия генов-мишеней этого ТФ, которые контролируют формирование глаза дрозофилы. Однако такие гены не были выявлены, что затрудняет определение причин нарушений в развитии глаза *Trl*-мутантов.

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 (Огиенко *и др.*, 2006; Kumar, 2009). Поэтому все эти процессы являются очень популярными моделями для выявления таких ансамблей. Данные, касающиеся органогенеза дрозофилы, 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 трудности. Всестороннее исследование влияния ТФ GAGA на гаметогенез дрозофилы и формирование ее глаза представляется чрезвычайно актуальным, поскольку позволит выявить целую сеть взаимосвязанных генов, участвующих в обеспечении генетического контроля этих важнейших процессов. Кроме того, актуальность исследования влияния белка GAGA на онтогенез дрозофилы обусловлена также тем, что этот белок сам является эволюционно-консервативным. В настоящее время гомологи белка GAGA найден 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, чем у дрозофилы. Поэтому расширение

представлений о функционировании ТФ GAGA в ходе разных процессов онтогенеза дрозофилы представляется чрезвычайно интересным, поскольку может пролить свет на функции его гомологов у других организмов.

Цель исследования заключалась в выявлении особенностей тканеспецифической экспрессии гена *Trithorax-like*, идентификации и исследовании регуляторных элементов гена, ответственных за специфичность экспрессии, а также в определении роли и механизмов действия транскрипционного фактора 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 *Trithorax-like* в разных органах *D. melanogaster* на протяжении всего периода ее онтогенеза.
- 2) Получить серию новых гипоморфных аллелей гена *Trithorax-like* *D. melanogaster*. Провести картирование и молекулярно-генетический анализ вновь полученных мутаций и отобрать мутации, позволяющие решить 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 новый набор гипоморфных мутаций по гену *Trl*, затрагивающих разные области гена и снижающие в разной степени экспрессию гена. Полученные мутации прокартированы и охарактеризованы. Использование этих и других мутаций по гену *Trl* позволило нам впервые в контексте живого организма провести анализ регуляторного потенциала разных областей 5'-области гена. В результате было показано, что участок, расположенный выше первых стартов транскрипции важен для обеспечения высокого уровня транскрипции не только в культуре клеток, но и в других проанализированных нами органах и тканях дрозофилы на разных стадиях ее развития. Район в котором располагаются два последние старта транскрипции, по-видимому, не вносит большого вклада в обеспечение высокого уровня транскрипции гена в живом организме, в отличие от культуры клеток. Район, в котором располагаются два первых старта транскрипции, важен для нормального функционирования гена в соматических клетках, но не в питающих клетках яйцевой камеры дрозофилы. Нами впервые продемонстрирована необходимость участков второго интрона гена *Trl* для обеспечения нормальной экспрессии гена. Удаление второго участка второго интрона длиной 700 п. н. приводит к нарушению строго стадийспецифической картины наработки определенных транскриптов, у *Trl*-мутантов меняется соотношения количества разных транскриптов. Нами впервые продемонстрировано, что недостаток белка GAGA приводит к нарушению функционирования всех типов клеток яйцевой камеры. Впервые 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, которые наблюдаются в ходе сперматогенеза у *Trl*-мутантов. Нами был проведен всесторонний анализ изменения структуры глаза дрозофилы на фоне уменьшения количества белка GAGA и выявлены гены, которые меняют свою экспрессию у мутантов и относятся к числу важнейших регуляторов процесса формирования глаза. Так, нами впервые продемонстрировано, что такие важнейшие регуляторы формирования глаза, как гены *lozenge* и *Bar*, меняют свою экспрессию на фоне снижения экспрессии гена *Trl*.

Практическая ценность работы

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 аналогичного процесса и у других видов, у которых подобные исследования затруднены по ряду биологических или морально-этических проблем. Кроме того, поскольку большинство генов, 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, белок, во многом схожий с белком GAGA, найден и у ряда высших позвоночных, где он может выполнять схожие с ТФ GAGA дрозофилы функции. Однако весь спектр этих функций у позвоночных еще плохо исследован и его еще следует изучать. Данные, полученные при анализе GAGA у дрозофилы, могут значительно облегчить данный процесс. 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) Онтогенетический и тканеспецифический паттерн экспрессии гена *Trl* обеспечивается за счет регуляции транскрипции с помощью регуляторных последовательностей, расположенных в промоторном районе и во втором интроне гена, а также с посредством 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. Анализ экспрессии генов в норме и у мутантов выполнен при участии Д. А. Карагодина (ИЦиГ СО РАН). Приготовление полутонких срезов глаза дрозофилы проводился совместно с С. И. Байбородиныным (ИЦиГ СО РАН). 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. Анализ нарушений у самцов *Trl*-мутантов проводился совместно с Н. В. Дороговой и Е. У. Болоболовой. В большинстве научных работ фамилия автора диссертации стоит на первом или последнем месте, что отражает его роль в проведении экспериментов, включенных в диссертацию.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, объединенных результатов и их обсуждения, 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.

Список публикаций

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. Перелыгина 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. Перелыгина 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика гена *Trithorax-like*

1.1.1. Структура и экспрессия гена *Trithorax-like*

Ген *Trithorax-like* (*Trl*), кодирующий белок GAGA, расположен в 70F1-2 районе 3L хромосомы полигенных хромосом *Drosophila melanogaster* (Перелыгина и др., 1992; Федорова и др., 2006). При определении экзон-интронной структуры гена *Trl*, в нем было выявлено семь экзонов (рис. 1; Катохин и др., 2001). Экзоны 2 (427 п. н.), 3 (466 п. н.) и 4 (336 п. н.) присутствуют во всех известных кДНК, тогда как 5'- и 3'-районы отличаются у разных транскриптов. Обнаружены четыре варианта первого нетранслируемого экзона — 1a (46 п. н.), 1b (112 п. н.), 1c (290 п. н.) и 1d (469 п. н.). Пятый экзон представлен коротким (5a) и длинным (5b) вариантами, длиной 138 п. н. и 773 п. н. соответственно. Шестой экзон также представлен двумя вариантами: коротким 6a (506 п. н.) и длинным 6b (1531 п. н.). Экзон 6b завершается сайтом полиаденилирования и может сочетаться как с экзоном 5a, так и с экзоном 5b, в то время как экзон 6a обнаруживается только в сочетании с экзонами 5b и 7. Седьмой экзон найден только в одном транскрипте,

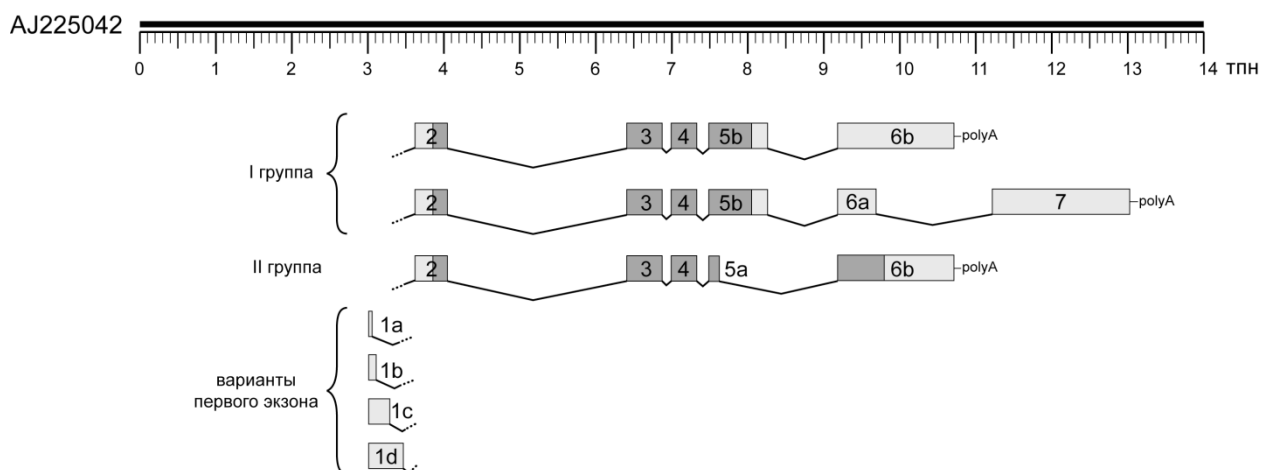


Рис. 1. Схема гена *Trl*. Координаты даны в соответствии с последовательностью GenBank #AJ225042. Выделены две группы транскриптов. В первую группу включены транскрипты, которые содержат кодирующие экзоны 2, 3, 4 и 5b, и кодируют изоформу GAGA-519. Транскрипты, относящиеся ко второй группе, содержат кодирующие экзоны 2, 3, 4, 5a и 6b, и кодируют изоформу белка GAGA-581. Варианты первого экзона показаны в нижней части рисунка. Светлые прямоугольники соответствуют некодирующим районам, темные — кодирующим.

где он также завершается сайтом полиаденилирования (Катохин и др., 2001). В зависимости от количества экзонов в первичных транскриптах может присутствовать 5 или 6 интронов (рис. 1). Второй интрон является самым большим, его размер составляет 2353 п. н. Размеры других интронов существенно меньше. Длина первого интрона варьирует от 154 до 576 п. н. в зависимости от использованного сайта сплайсинга. Длина третьего и четвертого интронов постоянна и составляет 118 п. н. и 158 п. н. соответственно. Длина пятого интрона может меняться в зависимости от использованного сайта сплайсинга и в максимальном виде достигает размера 1,5 т. п. н. (Катохин и др., 2001).

Исследования многих лабораторий свидетельствуют, что транскрипция гена *Trl* отмечена на протяжении всего онтогенеза дрозофилы (Перельгина и др., 1992; Soeller *et al.*, 1993; Bhat *et al.*, 1996). Наиболее подробно она исследована в ходе эмбриогенеза дрозофилы. В этот период развития основными являются транскрипты длиной 2,4 и 3 т. н. Транскрипты длиной 2,4 т. н. преобладают на первых этапах эмбриогенеза (0–4 часа), тогда как в дальнейшем увеличивается представленность транскриптов длиной 3 т. н. (Bhat *et al.*, 1996; Karagodin *et al.*, 2013). У личинок всех трех возрастов транскрипция гена *Trl* значительно ниже, чем у эмбрионов, однако на стадии куколки происходит небольшое ее увеличение. У взрослых самок дрозофилы был отмечен достаточно высокий уровень транскрипции гена *Trl*, тогда как у взрослых самцов выявляются только следовые количества транскриптов (Bhat *et al.*, 1996). Следует отметить, что, несмотря на то, что экспрессия данного гена выявляется практически на всех стадиях онтогенеза дрозофилы, процесс экспрессии гена *Trl* еще остается недостаточно изученным. Так, в частности, существует немного данных об экспрессии в разных органах и тканях. Показано только, что в половой системе самок дрозофилы выявлена сильная экспрессия данного гена, что и определяет достаточно высокий уровень транскрипции у взрослых самок *Drosophila melanogaster* в целом (Bhat *et al.*, 1996). Однако не очень понятно, как данный ген экспрессируется в других органах и тканях дрозофилы. Сложная картина экспрессии гена *Trl* предполагает наличие сложной системы регуляторных элементов. К сожалению, регуляция экспрессии данного гена также изучена недостаточно.

1.1.2. Регуляция экспрессии гена *Trl*

В настоящий момент в культуре клеток S2 дрософилы изучен регуляторный потенциал только некоторых фрагментов 5'-области гена *Trl*. Исследования, проведенные с помощью метода защиты от РНКаз, на культуре клеток S2, имеющей эмбриональное происхождение, выявили наличие как минимум трех основных сайтов инициации транскрипции — дистального (позиция 3067), промежуточного (позиция 3245) и проксимального (позиция 3621) (рис. 2 А, [Kosoy et al., 2002](#)). Все координаты здесь и далее даются в соответствии с последовательностью GenBank #AJ225042. Были выявлены также два дополнительных сайта инициации транскрипции. Один из них расположен примерно за 50 нуклеотидов до дистального сайта инициации, а второй — за несколько нуклеотидов до проксимального сайта инициации ([Kosoy et al., 2002](#)). Авторы отмечают, что при удалении проксимального старта транскрипционная активность гена уменьшается приблизительно в два раза, поэтому предполагается, что именно этот старт транскрипции является наиболее важным для обеспечения экспрессии

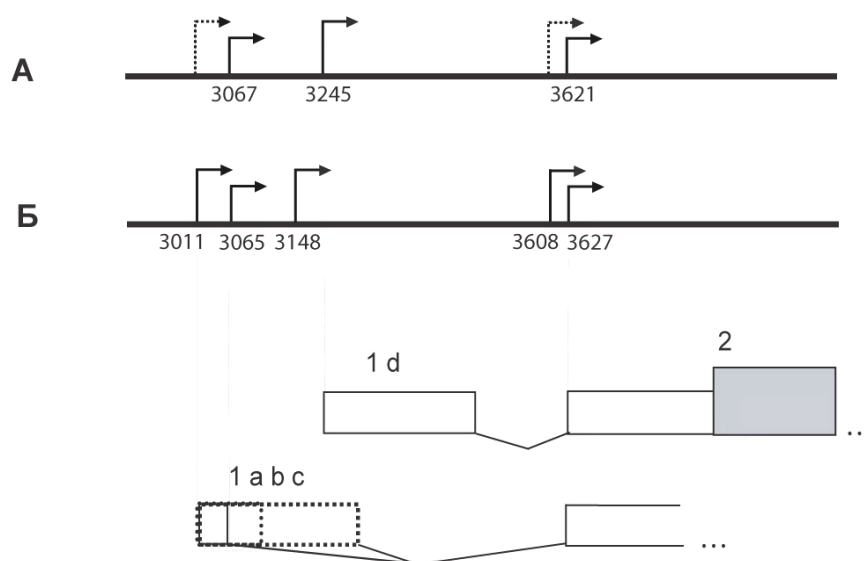


Рис. 2. Схема расположения стартов транскрипции гена *Trl* (сайты инициации транскрипции указаны изогнутыми стрелками). А — старты, картированные с помощью метода защиты от РНКаз в клетках S2 ([Kosoy et al., 2002](#)). Пунктиром указаны не основные сайты, выявленные этими авторами; Б — сайты инициации транскрипции, картированные в яичниках с помощью метода продления праймера (Карагодин, личное сообщение). Внизу рисунка представлена 5'-концевая часть транскриптов. Узкие белые прямоугольники соответствуют некодирующим районам гена, высокие — кодирующим. Участок, соответствующий POZ/VTB домену, обозначен серым цветом.

гена в S2 клетках. Делеционный анализ 5'-области гена *Trl* показал, что в данной культуре клеток удаление районов 5'-области до позиции 2722 не отражается на транскрипционной активности гена, тогда как удаление 2722–3018 полностью блокирует транскрипционную активность гена (Kosoy *et al.*, 2002). Эти данные свидетельствуют о важности для обеспечения нормальной экспрессии гена в культуре клеток района, расположенного выше стартов транскрипции.

В нашей лаборатории в яичниках взрослых самок методом продления праймера было выявлено также 5 сайтов инициации транскрипции (рис. 2 Б). Транскрипты, содержащие экзоны 1b и 1c, начинаются со стартов транскрипции, картированных в позициях 3009 и 3065, соответственно. Два дополнительных сайта инициации были обнаружены перед началом второго экзона в позициях 3607 и 3619 (личное сообщение Д. А. Карагодина). Таким образом, старты транскрипции, используемые в культуре клеток и в яичниках взрослых самок, в значительной степени сходны.

Следует отметить, что теоретический анализ не выявил в 5'-регуляторной области гена *Trl* не только ТАТА бокса, но и других классических структур характерных как для ТАТА-содержащих, так и для не содержащих ТАТА боксов промоторов *Drosophila* (Катохин *и др.*, 2001).

Показано, что ген *Trl* относится к числу ауторегулируемых генов, т. е. продукт гена — белок GAGA регулирует экспрессию собственного гена (Kosoy *et al.*, 2002; Bernues *et al.*, 2007). При этом отсутствие доменов POZ/BTV или поли-Q не влияет на способность белка GAGA к репрессии, в то время как единственная точечная замена, нарушающая структуру ДНК-связывающего домена, делает его неспособным узнавать GAGA сайты и существенно снижает способность белка влиять на репрессию гена. Было установлено, что GAGA сайты, необходимые для репрессии транскрипции, равномерно распределены по 5'-регуляторной области гена (Kosoy *et al.*, 2002).

В настоящее время плохо изучен регуляторный потенциал не только 5'-области гена *Trl*, но и других районов гена. Однако хорошо известно, что такие последовательности могут располагаться не только в 5'-регуляторных областях генов, но и в других их районах. Так, например, известно, что в интронах (особенно в больших интронах генов) могут располагаться как позитивные, так и негативные цис-регуляторные элементы, включая энхансеры, участвующие в ткане- или стадия-специфической регуляции экспрессии. У *D. melanogaster* было описано значительное количество интронных регуляторных элементов,

участвующих в ткане- или стадия-специфической экспрессии генов и локализованных в интронах. Так, например, в единственном интроне гена *yellow* был найден ткане-специфический энхансер, который, наряду с энхансерами в 5'-области, необходим для обеспечения правильной экспрессии гена в кутикуле, включая крылья, тело и щетинки (Geyer & Corces, 1987; Wittkopp *et al.*, 2002). В первом интроне гена *glucose dehydrogenase* был найден целый кластер энхансеров и сайленсеров, взаимодействие которых с элементами проксимального промотора гена определяет сложную экспрессию данного гена (Keplinger *et al.*, 2001). В первом интроне гена β 3-тубулина локализованы негативные регуляторные элементы, которые репрессируют транскрипцию в отсутствии 20-гидроксизидизона в культуре клеток дрозофилы, а также позитивные регуляторные элементы, стимулирующие гормон-зависимую активность промотора этого гена (Bruhat *et al.*, 1990). Поскольку нами было установлено, что мутации, затрагивающие второй интрон гена *Trl*, сказываются на жизнеспособности мух (Трунова *и др.*, 2001), не исключено, что в этом районе могут располагаться какие-либо регуляторные элементы.

Таким образом, ген *Trl* характеризуется сложной структурой и наличием множественных транскриптов, образующихся за счет альтернативного сплайсинга и разных сайтов инициации транскрипции. Известно, что представленность транскриптов меняется на разных стадиях онтогенеза дрозофилы. Однако в настоящее время плохо изучена регуляция экспрессия данного гена, особенно его экспрессия в разных органах и тканях дрозофилы, а также не так много известно относительно регуляции активности данного гена в ходе онтогенеза.

1.1.3. Структура белка GAGA

В результате анализа открытых рамок считывания гена *Trl* было установлено, что его многочисленные транскрипты могут быть разделены на два основных класса. К первому классу относятся транскрипты, содержащие открытую рамку считывания, которая начинается в экзоне 2, проходит через экзоны 3 и 4 и заканчивается в экзоне 5b. С этих транскриптов считывается изоформа из 519 а. к. — GAGA-519 (рис. 3). У транскриптов второго класса рамка считывания также начинается во втором экзоне, проходит через экзоны 3, 4, 5a и завершается в экзоне 6b. Эти транскрипты дают начало изоформе из 581 а. к. — GAGA-581 (Катохин *и др.*, 2001). Установлено, что аминокислотные последовательности

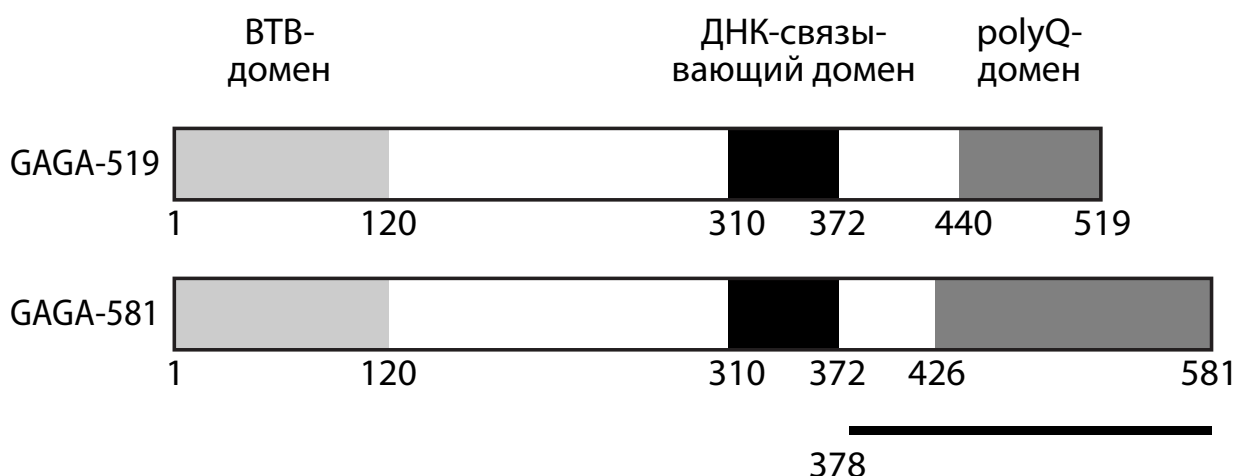


Рис. 3. Структура белка GAGA, изоформы GAGA-519 и GAGA-581 (из [Wilkins & Lis, 1997](#), с модификациями). Цифрами обозначены координаты границ доменов в аминокислотных остатках от N-конца белковых последовательностей. Область, в которой GAGA-519 и GAGA-581 отличаются друг от друга, обозначена черным прямоугольником в нижней части рисунка.

двух изоформ белка GAGA совпадают до позиции 378 а. к. и различаются только С-концевой частью. Молекулярный вес GAGA-519 оценивается примерно в 70–75 кДа, GAGA-581 — в 80–90 кДа ([Benyajati et al., 1997](#)).

Известно, что обе приведенные выше изоформы белка GAGA присутствуют на всех стадиях развития дрозофилы, однако их соотношение несколько меняется в зависимости от стадии онтогенеза. Так, первые 6 часов эмбриогенеза доминирует изоформа GAGA-519, затем начинает накапливаться изоформа GAGA-581 и после 12-ти часов развития эмбриона соотношение двух изоформ становится примерно одинаковым ([Benyajati et al., 1997](#)).

С помощью антител, специфичных к изоформам GAGA-519 и GAGA-581, было показано, что обе изоформы связываются с одними и теми же районами политенных хромосом слюнных желез дрозофилы, что позволяет предположить, что они могут функционировать вместе в виде гетеромеров, когда они представлены примерно в одинаковых количествах. В периоды развития, когда GAGA-581 мало (например, в начале эмбриогенеза), возможно, что GAGA-519 может функционировать и без GAGA-581 ([Benyajati et al., 1997](#)).

1.1.3.1. Доменная структура белка GAGA

Анализ структуры белка GAGA выявил наличие в нем нескольких доменов — ДНК-связывающего, ВТВ- и polyQ-доменов.

ДНК-связывающий домен

Установлено, что в середине обеих изоформ белка GAGA находится один ДНК-связывающий домен типа цинковый палец (рис. 3). Он относится к классическому Cys₂-His₂ типу и состоит из 28 аминокислотных остатков, включая два консервативных Cys и два His, которые взаимодействуют с ионом цинка (Pedone *et al.*, 1996). Наличие только одного такого домена отличает данный транскрипционный фактор от многих других транскрипционных факторов, поскольку обычно их бывает несколько. Показано, что минимальной последовательностью для связывания белка GAGA с ДНК в условиях *in vitro* является тринуклеотид GAG. Однако в условиях *in vivo* связывания данного белка с тринуклеотидом практически не наблюдается (Wilkins & Lis, 1998). В нормальных условиях для связывания GAGA необходимы, по крайней мере, два GA/CT повтора, для эффективного же связывания, по-видимому, требуется 2,5 или 3 повтора. Следует отметить, что белок GAGA связывается с одинаковой частотой в любой ориентации относительно направления транскрипции и по степени связывания (GA)_n и (CT)_n мотивы практически не отличаются друг от друга. Длина (GA)_n и (CT)_n повторов может варьировать от 10 п. н. до 40 п. н. и более, но наиболее часто она составляет примерно 15 п. н. Консенсусом же для связывания GAGA считается последовательность GAGAG (Omichinski *et al.*, 1997). Белок связывается с ДНК через распознавание первых трех нуклеотидов GAG, а его расположение на молекуле стабилизируется дополнительным взаимодействием с нею белка, посредством прилегающих к цинковому пальцу положительно заряженных районов BR1 и BR2 (basic amino acid residues). Анализ последовательности генома дрозофилы позволил установить, что GAGAG элементы встречаются в нем достаточно часто, в среднем через каждые 652 п. н. (van Steensel *et al.*, 2003). Из этого следует, что практически каждый ген имеет несколько таких элементов как в своем составе, так и в своем ближайшем окружении. Однако вероятно, что GAGA связывается далеко не со всеми своими потенциальными сайтами, в таком случае наблюдалось бы равномерное окрашивание всех хромосом. Однако иммуноокрашивание политенных хромосом в разных тканях дрозофилы выявляет не диффузное распределение данного белка, а отчетливо выраженные полосы (Tsukiyama *et al.*, 1994; Benyajati *et al.*, 1997).

Домен polyQ белка GAGA

На С-конце белка GAGA (рис. 3) располагается глутамин-богатый (polyQ-) домен. Разные изоформы белка имеют в своем составе разные polyQ-домены, которые различаются числом глутаминовых остатков. Значение этого домена в настоящее время не очень понятно, поскольку в разных работах, касающихся этой темы, авторы зачастую приходят к противоречивым выводам. Считается, что этот домен может играть важную роль в формировании гомомультимерных комплексов (Wilkins & Lis, 1999). Также были получены данные о том, что ему свойственна транс-активационная функция, поскольку было показано, что в S2 клетках Q-домен может активировать репортерный ген, тогда как белок GAGA, лишенный этого домена, не обладает такими свойствами (Vaquero *et al.*, 2000). Однако несколько позднее были получены результаты, опровергающие мнение о том, что polyQ-домен играет решающую роль в транскрипционной активации или ремоделировании хроматина (Greenberg & Schedl, 2001). Гринберг и Шедл показали, что разные изоформы белка GAGA, отличающиеся только polyQ-доменами, имеют сходные, но не полностью перекрывающиеся функции. Так, обе изоформы могут спасти зиготическую летальность *Trl* мутаций, причем GAGA-581 делает это более эффективно. С другой стороны, GAGA-519 изоформа более эффективно исправляет другие дефекты мутаций по гену *Trl*. Например, трансформация сегмента A5 в сегмент A6, которая наблюдается у ряда *Trl*-мутантов, благодаря неправильной экспрессии гена *Abd-B*, может спастись изоформой GAGA-519, но не изоформой GAGA-581.

ВТВ-домен белка GAGA

На N-конце обеих изоформ белка GAGA расположен ВТВ-домен длиной 122 а. к., получивший свое название по белкам дрозофилы (Bric a brac, Tramtrack, Broad Complex), в которых подобный домен был первоначально обнаружен (рис. 3). Этот высоко консервативный домен встречается не только в белках дрозофилы и других эукариот, но и в белках вирусов, где он называется POZ-доменом. В настоящее время экспериментально доказано, что ВТВ-домен необходим для образования гомо- и гетеромеров между изоформами GAGA, а также для взаимодействия GAGA с другими белками (Espinass *et al.*, 1999; Read *et al.*, 2000).

Установлено, что изоформы белка GAGA (GAGA-519 и GAGA-581) могут подвергаться разным посттрансляционным модификациям, в частности

фосфорилированию (Bonet *et al.*, 2005). С помощью антител к различным частям GAF было продемонстрировано наличие нескольких форм белка, вес этих форм колеблется от 70 до 110 кДа. При этом белки молекулярным весом 70–75 и 80–90 кДа являются доминирующими (Benyajati *et al.*, 1997). Поскольку в геноме дрозофилы ген *Trl* представлен единственной копией, предполагается, что образование нескольких дополнительных форм может быть следствием посттрансляционных модификаций белка.

В настоящее время в базе данных Flybase (<http://flybase.org/reports/FBgn0013263.html>), помимо подробно описанных выше основных изоформ белка GAGA, приведены данные и о других изоформах белка GAGA. Так, описаны изоформы GAGA-567, GAGA-608 и GAGA-623. Все они различаются С-концевой частью. В РНК, дающей начало изоформе GAGA-567 содержатся экзоны 5а, 6а и 7. В РНК, дающей начало изоформе GAGA-608 — экзоны 5с, 6а и 7, в РНК GAGA 623 — экзоны 5с и 6в.

1.1.4. Эволюционная консервативность белка GAGA

Следует отметить, что, несмотря на то, что у позвоночных гомолог гена *Trl* не был выявлен, при сравнении аминокислотных последовательностей было установлено, что у позвоночных все же есть белки, имеющие гомологию с белком GAGA дрозофилы. Особенно консервативными являются районы функциональных доменов — ВТВ-домена и ДНК-связывающего домена. У мыши и человека белком, имеющим высокую степень гомологии с GAGA, является белок Крох (Kruppel-related zinc finger protein)/Th-ПОК (T-helper inducing POZ/Kruppel-like factor) (Matharu *et al.*, 2010; Kumar, 2011). Перекрестная реакция белков GAGA и Крох/Th-ПОК с антителами, наработанными против одного из них, свидетельствует о схожести этих белков. Все белки имеют высоко консервативный ВТВ-домен и ДНК-связывающий домен, хотя последние и отличаются по количеству цинковых пальцев. Так у дрозофилы в белке GAGA, как было отмечено выше, содержится один цинковый палец, в гомологичном белке у пчелы — два, у позвоночных — четыре пальца. (Matharu *et al.*, 2010).

Результаты экспериментов по задержке в геле и иммунопреципитации хроматина показали, что белок с-Krox/Th-ПОК связывается с GA-богатыми последовательностями ДНК таких генов млекопитающих, с которыми он связывается и у дрозофилы. Так, например, он также как и GAGA связывается с

Hox-генами, но у млекопитающих (Matharu *et al.*, 2010). Показано, что у позвоночных связывание белка с *GA*-богатыми районами вблизи ряда генов, в том числе и *Hox*-генов, важно для регуляции экспрессии этих генов (Li *et al.*, 1998; Min *et al.*, 1998; Bevilacqua *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002, 2005).

1.1.5. Взаимодействие изоформ белка GAGA между собой, а также с другими белками и белковыми комплексами

Одним из важнейших свойств белка GAGA является его способность взаимодействовать с разными белками. Как было показано в многочисленных экспериментах, разные изоформы белка GAGA способны формировать гомо- и гетеродимеры. Кроме того, данный белок может взаимодействовать и с другими белками или белковыми комплексами. Так, белок GAGA способен взаимодействовать с комплексами, участвующими в ремоделировании хроматина, например, с комплексами FACT (*f*acilitates *c*hromatin *t*ranscription) и NURF (*n*ucleosome *r*emodeling *f*actor). Было установлено, что хроматин-ремоделирующий комплекс NURF способен разрушать нуклеосомную укладку в регуляторных районах генов, содержащих GAGA сайты, причем количество удаляемых нуклеосом зависит от числа сайтов связывания GAGA, расположенных в этих районах. Как оказалось, самая большая субъединица комплекса NURF — NURF301 может непосредственно взаимодействовать с GAGA (Xiao *et al.*, 2001). Другой хроматин-ремоделирующий комплекс — FACT при участии GAGA связывается с нуклеосомами, что приводит к сдвигу (*sliding*) нуклеосом (Shimojima *et al.*, 2003). Эксперименты показали, что FACT посредством одной из своих субъединиц dSSRP1 может напрямую взаимодействовать с белком GAGA.

В начале этого века появились работы, в которых было продемонстрировано взаимодействие белка GAGA с некоторыми белками, также имеющими BTB/POZ домены. К их числу относятся транскрипционные факторы Tramtrack (TTK), Pipsqueak (PSQ), Batman (BAN) (Pagans *et al.*, 2002; Schwendemann & Lehmann, 2002; Faucheux *et al.*, 2003).

Было установлено, что белок TTK участвует в репрессии ряда генов, включая гены *fushi tarazu* (*ftz*) и *even-skipped* (*eve*). GAGA активирует транскрипцию гена *eve* со второго его промотора, а TTK подавляет эту GAGA-зависимую транскрипцию (Pagans *et al.*, 2002). Поскольку репрессивная функция TTK зависит от BTB доменов белков TTK и GAGA, авторы делают заключение о том,

что именно взаимодействие этих двух белков важно для репрессии генов дрозофилы. Авторы подчеркивают, что многие гены дрозофилы содержат в своих промоторных районах сайты связывания GAGA и ТТК.

Белок PSQ, являющийся важным регулятором развития дрозофилы, как и белок GAGA, связывается с GA-богатыми последовательностями. Поскольку PSQ имеет больший по сравнению с GAGA ДНК-связывающий домен, считается, что для связывания PSQ требуется более протяженная $(GA)_n$ последовательность, чем для белка GAGA (Lehmann *et al.*, 1998). Было показано белки PSQ и GAGA взаимодействуют друг с другом через их ВТВ домены (Schwendemann & Lehmann, 2002). В действии генов, кодирующих эти белки, много общего. Подобно *Trl* мутациям, мутации *psq* усиливают проявление мутаций гена *extra sex combs (esc)*. Мутации гена *psq*, так же как и мутации гена *Trl*, являются доминантными энхансерами эффекта положения мозаичного типа. Кроме того, мутации *psq* усиливают генетическое взаимодействие между генами *Trl* и *Ubx*. Поскольку PSQ и GAF были коиммунопреципитированы из ядерных экстрактов и связываются с одними и теми же эухроматическими районами, а также центромерными районами хромосом, предполагается, что эти белки взаимодействуют в ходе своего совместного функционирования. Так, в частности, вероятно, они совместно действуют в ходе активации или репрессирования транскрипции генов (Schwendemann & Lehmann, 2002).

Белок BAN также как и GAGA содержит эволюционно-консервативный ВТВ домен. Было установлено, что этот домен обеспечивает взаимодействие между этими белками. Белок BAN как и GAGA задействован в регуляции транскрипции гомеозисных генов. Белки связываются с регуляторными элементами этих генов, в частности с PRE элементами, например с PRE гена *Ubx* (Faucheux *et al.*, 2003). Авторы полагают, что взаимодействие BAN с белками PSQ и GAGA является необходимым для привязки PcG или trxB комплексов к PRE элементам.

Белок SAP18, ассоциированный с Sin3-HDAC комплексом, также взаимодействует с белком GAGA (Espinosa *et al.*, 2000). Эти два белка колаколизуются во многих общих районах политенных хромосом дрозофилы, в частности в районе комплекса *bithorax*. Мутации по генам, кодирующим эти белки усиливают трансформацию сегмента A6 в сегмент A5. Все это дает основание авторам высказать предположение о том, что посредством рекрутирования Sin3-HDAC комплекса GAGA может вносить вклад в регулирование экспрессии гомеозисных генов.

Белок CORTO играет важную роль в PcG сайленсировании экспрессии генов (Salvaing *et al.*, 2003). Ген *corto* генетически взаимодействует с геном *Trl*. Белки CORTO и GAGA колоколизуются во многих районах политеменных хромосом и взаимодействуют между собой, как это было показано с помощью дигибридной системы.

Таким образом, важнейшей особенностью белка GAGA является то, что он вступает во взаимодействие с широким кругом белков и белковых комплексов. Многие из них кодируются генами, входящими в группы ETP, Polycomb и Trithorax и являются эволюционно-консервативными. Несмотря на то, что к настоящему времени эти взаимодействия еще не до конца изучены, очевидно, что именно они определяют широкое разнообразие функций данного белка. Одной из важнейших функций белка GAGA является функция регулятора транскрипции генов. При этом в зависимости от того с какими белками он кооперируется в ходе данного процесса зависит механизм его воздействия на экспрессию генов, т. е. он может выступать как в роли активатора, так и репрессора транскрипции.

Наиболее хорошо изучено влияние белка GAGA на регуляцию экспрессии гомеозисного гена *Ultrabithorax (Ubx)*, генов сегментации *engrailed (en)* и *fushi tarazu (ftz)* (Biggin & Tjian, 1988; Soeller *et al.*, 1988; Topol *et al.*, 1991; Bhat *et al.*, 1996). Известно также, что белок GAGA вовлечен в регуляцию генов теплового шока — *hsp26* (Glaser *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1993) и *hsp70* (Lee *et al.*, 1992), генов сегментации — *Krüppel (Kr)* (Kerrigan *et al.*, 1991), *even-skipped (eve)* (Read *et al.*, 1990), генов «домашнего хозяйства» — *histone3 (his3)*, *his4* (Gilmour *et al.*, 1989), *Actin5C (Act5C)* (Chung & Keller, 1990), *α1-tubulin* (O'Donnell & Wensink, 1994). Однако данные о связывании GAGA с регуляторными последовательностями многих других генов свидетельствуют о том, что к его потенциальным мишеням можно отнести еще не менее 600 генов дрозофилы (de Wit *et al.*, 2008; van Steensel *et al.*, 2010).

В настоящее время выявлены разные механизмы участия GAGA в регуляции экспрессии генов. Ниже мы остановимся на рассмотрении важнейших механизмов.

1.1.6. Роль белка GAGA в регуляции экспрессии генов

1.1.6.1. Белок GAGA играет важную роль в регуляции экспрессии генов дрозофилы, изменяя структуру хроматина в регуляторных элементах генов

К настоящему времени появилось много работ, в которых приводятся данные о том, что связывание транскрипционного фактора GAGA со своими сайтами, расположенными в регуляторных последовательностях генов, включая промоторы, энхансеры, сайленсеры, изменяет структуру хроматина регуляторных районов, облегчая тем самым процесс транскрипции. О том, что связывание GAGA с ДНК приводит к изменению структуры хроматина, свидетельствует тот факт, что районы, расположенные вокруг мест его связывания, становятся гиперчувствительным к действию нуклеаз (Lu *et al.*, 1993).

Одним из первых генов, для которых был показан такой механизм действия GAGA в регуляции транскрипции, был ген теплового шока *hsp70*. Было установлено, что связывание белка GAGA с его промоторным участком приводит к локальному изменению структуры хроматина в нем, что связано с разрушением и/или перемещением нуклеосом. В результате вокруг сайтов связывания данного белка образуется открытая конформация хроматина, о чем свидетельствует образование в этих районах сайтов, гиперчувствительных к действию ДНКазы I (Wu, 1980; Costlow & Lis, 1984; Shopland *et al.*, 1995). Авторы считают, что образование открытой конформации хроматина облегчает РНК-полимеразе II, а также различным транскрипционным факторам доступ к местам связывания. В экспериментах с использованием трансгенных конструкций, содержащих промоторные районы генов *hsp26* и *hsp70*, было показано, что удаление (CT)_n/(GA)_n-последовательностей, с которыми *in vitro* связывается белок GAGA, приводят к подавлению активации репортерного гена после воздействия теплового шока, а также к резкому снижению доступности этих районов к действию нуклеаз. (Shopland *et al.*, 1995; Wilkins & Lis, 1997; Farkas *et al.*, 2000; Leibovitch *et al.*, 2002). Участие белка GAGA в разрушении нуклеосомной укладки обусловлено его способностью взаимодействовать с ремоделирующими белковыми комплексами, например с NURF-комплексом, участвующим в АТФ-зависимом ремоделировании хроматина. Большая субъединица комплекса NURF — NURF301, может связываться с белком GAGA, а также с нуклеосомами. Белок NURF301, также как и белок ISWI, входящий в данный комплекс,

обладают хроматин-ремоделирующей активностью (Tsukiyama *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 2001).

Взаимодействие белка GAGA с комплексом FACT также может приводить к ремоделированию хроматина. Установлено, что комплекс FACT, состоящий из субъединиц dSPT16 и dSSRP1, напрямую взаимодействует с GAGA фактором посредством белка dSSRP1. Генетический анализ и иммунопреципитация хроматина показали, что FACT взаимодействует с GAGA в процессе регуляции транскрипции таких генов, как *Ultrabithorax (Ubx)* и *Abdominal-B (Abd-B)* (Shimojima *et al.*, 2003). Авторы показали, что комплекс GAGA-FACT связывается с GAGAG последовательностью ДНК, в результате FACT связывается с нуклеосомами и стимулирует ремоделирование хроматина. В дальнейшем было показано, что белок GAGA совместно с комплексом FACT вовлечен в процесс замещения в нуклеосомах гистона H3 на гистон H3.3. Об этом свидетельствует то, что снижение уровня белка GAGA у *Trl*-мутантов приводит к нарушению данного процесса в районе граничного элемента *Fab-7* гена *Abd-B* и в районе *dl* гена *white* (Nakayama *et al.*, 2007).

Методом иммунопреципитации хроматина с последующим использованием его для ДНК-ДНК гибридизации на микрочипах (ChIP-on-chip) было показано, что белок GAGA связывается примерно с половиной PRE-элементов, характеризующихся наличием не только GAGA сайтов, но и сайтов связывания белков ENHANCER OF ZESTE (E(Z)) и POSTERIOR SEX COMBS (PSC) из группы Polcomb (PcG). В этих элементах наиболее интенсивная замена нуклеосом, содержащих гистон H3, на нуклеосомы с гистоном H3.3 происходит именно в районе сайтов связывания GAGA-фактора (Schuettengruber *et al.*, 2009; Deal *et al.*, 2010).

Таким образом, взаимодействие GAGA и белков, входящих в состав хроматин ремоделирующих комплексов приводит к изменению структуры хроматина в регуляторных областях генов, что вероятно является одним из основных механизмов воздействия белка GAGA на процесс транскрипции.

1.1.6.2. Белок GAGA влияет на транскрипцию, воздействуя на функционирование инсуляторов

GAGA-фактор также может быть вовлечен в регуляцию экспрессии генов посредством влияния на функционирование инсуляторов — элементов, разделяющих области действия разных регуляторных элементов. В ряде работ было показано, что связывание белка GAGA с последовательностями инсуляторов является необходимым условием для реализации их блокирующей активности. Так известно, что в регуляторном районе гена *Sex combs reduced* (*Scr*) из комплекса *Antennapedia* находится ген *ftz*. Инсулятор *SF1*, содержащий кластер консервативных GAGA-сайтов, требуется для блокировки действия дистального энхансера гена *ftz* на промотор гена *Scr*. Установлено, что функционирование данного инсулятора уменьшается на фоне *Trl*-мутаций (Belozerov *et al.*, 2003). В промоторной области гена *eve* также был обнаружен инсулятор, блокирующий активность собственного энхансера. Снижение количества белка GAGA препятствует взаимодействию энхансера, расположенного правее транскрипционной единицы *eve* со вторым промотором данного гена (Ohtsuki & Levine, 1998). При замене даже единственного нуклеотида в сайте связывания белка GAGA, расположенного между TATA-боксом и стартом транскрипции функционирование данного инсулятора нарушается.

1.1.6.3. GAGA может влиять на транскрипцию генов, взаимодействуя с белками, связывающимися с TATA боксом

Анализ транскрипции гена *hsp26* показал, что связывание GAGA с сайтами, локализованными в промоторной области данного гена, предшествует и требуется для рекрутирования комплекса TFIID (Leibovitch *et al.*, 2002). В дальнейшем было установлено, что белок dmTAF3 (TBP-associated factor 3), являющийся компонентом TFIID комплекса, взаимодействует с GAGA (Chopra *et al.*, 2008). На примере гена *Ubx* было продемонстрировано генетическое взаимодействие генов, кодирующих белки dmTAF3 и GAGA (Chopra *et al.*, 2008). Кроме того, данные иммунопреципитации также свидетельствуют о том, что dmTAF3 и GAGA взаимодействуют в системе *in vivo*. Все это позволило авторам сформулировать гипотезу об участии GAGA в регуляции транскрипции генов, взаимодействуя с TFIID. Согласно их гипотезе связавшийся со своими сайтами GAGA может взаимодействовать с dmTAF3, который помогает рекрутировать TFIID комплекс.

1.1.6.4. GAGA может участвовать в элонгации транскрипции генов

Как уже было отмечено выше, GAGA взаимодействует с белком FACT, состоящим из двух высоко консервативных белков SPT16 и SSRP1. У человека FACT был выявлен как фактор, требующийся для элонгации транскрипции (Orphanides *et al.*, 1998). Было установлено, что и у *Drosophila melanogaster* именно этот комплекс обеспечивает элонгацию Pol II в процессе ее прохождения по хроматину. При анализе транскрипции гена *hsp70* было установлено, что FACT и Pol II элонгирующий комплекс вместе передвигаются вдоль гена, начиная с первой нуклеосомы. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что FACT принимает участие в элонгации транскрипции.

Поскольку GAGA взаимодействует с FACT, то не исключено, что этот белок также принимает участие в элонгации транскрипции (Shimojima *et al.*, 2003). Возможно, именно участием GAGA в элонгации транскрипции обусловлено наличие многочисленных сайтов связывания данного белка не только в регуляторных районах генов, но и в интронах, а также в экзонах генов (van Steensel *et al.*, 2010; Omelina *et al.*, 2011). Предполагается, что взаимодействие GAGA с хроматин-ремоделирующим комплексом FACT, может облегчать прохождение комплекса элонгации через нуклеосомную упаковку этих районов (van Steensel *et al.*, 2003). Было показано, что белок GAGA появляется в 3'-области генов теплового шока через 120 секунд после их индукции, что сопоставимо со скоростью перемещения РНК-полимеразы II (O'Brien *et al.*, 1995).

Следует отметить, что другие нуклеосо-ремоделирующие комплексы, такие как SWI/SNF и NURF, по-видимому не участвуют в процессе элонгации транскрипции гена *hsp70* (Saunders *et al.*, 2003).

1.1.6.5. GAGA может участвовать в паузировании РНК полимеразы II

Установлено, что РНК полимеразы II (Pol II) может располагаться в промоторных районах не только активных, но и неактивных генов. В настоящее время установлено, что у дрозофилы тысячи генов содержат паузированную Pol II в своих промоторных районах (Li & Gilmour, 2013). Было высказано предположение, что в клетках эукариот судьба транскрипции определяется не только

расположенной там Pol II, но и связывающимися неподалеку от стартов транскрипции факторами транскрипции. Первыми факторами, для которых было продемонстрировано участие в паузировании Pol II являются DSIF (Spt5, Spt4) и NELF (Negative elongation factor), стабилизирующие Pol II во время данного процесса. Оба эти фактора, как было показано, ингибируют элонгацию *in vitro* и локализованы в районах с паузированной Pol II. Кроме того, уменьшение количества этих факторов приводит к редукции паузирования (Yamaguchi *et al.*, 2013). Ингибирование элонгации транскрипции в клетках дрозофилы, по-видимому, обеспечивается взаимодействием NELF с Pol II, поскольку было установлено, что паузированная Pol II часто располагается вблизи от NELF. Существуют данные о том, что белок GAGA может быть важен для процесса паузирования транскрипции ряда генов. Связывание GAGA со своими сайтами было отмечено для 20 % таких генов. (Fuda & Lis, 2013; Hendrix *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008). Прямые указания на то, что GAGA участвует в паузировании транскрипции были получены при изучении транскрипции гена *hsp70*. В ходе экспериментов было установлено, что GAGA сайты, локализованные в промоторном районе данного гена, важны для паузирования Pol II. Изменения структуры GAGA сайтов приводят к прекращению паузирования (Shopland *et al.*, 1995). К сожалению, в настоящее время не совсем понятно, каким образом GAGA участвует в паузировании Pol II. Однако существуют данные о том, что GAGA может участвовать в рекрутировании NELF (Li *et al.*, 2013).

Таким образом, Pol II участвует в синтезе мРНК двумя основными способами. Во-первых, она располагается на промоторах, встраиваясь в преинициаторный комплекс, который быстро начинает процесс транскрипции. Во-вторых, она участвует в приостановке процесса элонгации, т.е. участвует в процессе паузирования. Вероятно, выбор пути, по которому будет развиваться процесс транскрипции, во многом зависит от набора ТФ, взаимодействующих с Pol II и модулирующих эффективность транскрипции, приводя или к элонгации или к паузированию данного процесса. Не исключено, что белок GAGA играет роль в обеспечении и того, и другого пути развития транскрипции. Однако механизмы, контролируемые то или иное развитие процесса транскрипции, а также роль белка GAGA в выборе этого пути пока остаются слабо изученными.

1.1.6.6. GAGA может обеспечивать контакт удаленных регуляторных элементов

Благодаря способности к олигомеризации, GAGA может обеспечивать контакт друг с другом удаленных регуляторных элементов (Mahmoudi *et al.*, 2002), влияя тем самым на транскрипцию генов. Были получены данные о том, что GAGA обеспечивает контакт удаленных регуляторных элементов. Установлено, что взаимодействие удаленных регуляторных элементов сильно зависит от ВТВ/POZ домена. Предполагается, что взаимодействие разных изоформ белка GAGA посредством этого домена способствует формированию белкового моста, обеспечивающего физический контакт удаленных регуляторных элементов, например, энхансера и регулируемого им промотора (Mahmoudi *et al.*, 2002).

Таким образом, белок GAGA является ключевым регулятором экспрессии генов дрозофилы, использующим различные механизмы воздействия на транскрипцию. Оказалось, что, регулируя процесс транскрипции, он может выступать не только как активатор транскрипции, но и как ее репрессор.

1.1.6.7. Белок GAGA действует как активатор, так и репрессор транскрипции генов

Первоначально ТФ GAGA был выявлен как активатор транскрипции гомеостатических генов и поэтому отнесен к группе trithorax (trxG) (Farkas *et al.*, 1994). В эту группу входят гены, продукты которых необходимы для активации транскрипции, в то время как продукты генов, входящих в другую группу — Polycomb (PcG), требуются для поддержания неактивного состояния гомеостатических генов (Paro *et al.*, 1998). В 2000 году Гильдеа с соавторами предложили добавить к группам trxG и PcG еще одну группу генов — ETP (Enhancer of trithorax and Polycomb group) (Gildea *et al.*, 2000). В эту группу были включены гены из групп Polycomb и trithorax, продукты которых могут выступать в роли как активаторов, так и репрессоров транскрипции. В состав этой группы был внесен и ген *Trl*, поскольку многочисленные данные свидетельствуют о том, что его продукт — белок GAGA может участвовать как в активации, так и подавлении транскрипции генов. Если роль GAGA в активации транскрипции изучена достаточно хорошо, то участие данного белка в репрессировании активности генов изучена недостаточно. Однако существует ряд данных указывающих на такую роль белка GAGA.

Как было отмечено выше, GAGA выступает в роли репрессора активности собственного гена, используя механизм отрицательной обратной связи (Kosoy *et al.*, 2002). Об участии белка GAGA в подавлении экспрессии генов свидетельствуют также и другие данные. Во-первых, было обнаружено, что на фоне мутаций гена *Trl* усиливается проявление мутаций генов группы Polycomb *Polycomb* (*Pc*), *polyhomeotic proximal* (*ph*) и *pleiohomeotic* (*pho*), что приводит к эктопической активации гомеозисных генов (Strutt *et al.*, 1997; Busturia *et al.*, 2001; Hodgson *et al.*, 2001; Федорова *и др.*, 2009). Во-вторых, в экспериментах по иммунопреципитации хроматина с использованием эмбриональных экстрактов было выявлено, что белок GAGA взаимодействует с комплексом Polycomb repressive complex 1 (PRC1) и, возможно, с комплексом ESC-E(Z), которые участвуют в поддержании неактивного состояния генов. Гистон-деацетилаза (HDAC) RPD3, с которой коиммунопреципитируется GAGA, является компонентом комплекса ESC-E(Z). Коровые компоненты PRC1 комплекса (PC и Polyhomeotic (PH)) также коиммунопреципитируются с белком GAGA (Horard *et al.*, 2000; Czermin *et al.*, 2001; Poux *et al.*, 2001; Tie *et al.*, 2003; Федорова *и др.*, 2009). В-третьих, в экспериментах с использованием дигибридной дрожжевой системы было показано, что GAGA взаимодействует с SAP18 — белком, входящим в состав Sin3-HDAC репрессорного комплекса (Espinass *et al.*, 2000).

Поскольку большинство белков, входящих в репрессорные белковые комплексы, состоящих из продуктов генов PcG, не содержат ДНК связывающих доменов, то предполагается, что GAGA помогает им в рекрутировании этих комплексов, участвующих в репрессии генов, к PRE элементам. Было установлено, что GAGA связывается с некоторыми PRE в комплексах bithorax и antennapedia (Strutt *et al.*, 1997), и это связывание важно для обеспечения PcG-зависимой репрессии репортерных генов. С помощью трансгенных конструкций было выявлено, что нарушение структуры GAGA сайтов в PRE генов *Abd-B* и *Ubx* приводят к эктопической активации репортерных генов, а снижение экспрессии гена *Trl* у *Trl* мутанов приводит к нарушению работы конструкций, несущих один из этих PRE (Hagstrom *et al.*, 1997; Horard *et al.*, 2000; Busturia *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2001; Poux *et al.*, 2002). Эти данные свидетельствуют об участии белка GAGA совместно с белками группы PcG в функционировании PRE.

Таким образом, белок GAGA может выступать как в роли активатора, так и репрессора транскрипции. Все больше исследователей склоняется к мысли, что GAGA, вместе с ремоделирующими комплексами, подготавливает почву для

других белков или белковых комплексов, которые и будут определять дальнейшую судьбу транскрипции, т. е. определять будет ли это активация или репрессия транскрипции гена. Как отмечалось выше, GAGA взаимодействует с двумя хроматин-ремоделирующими комплексами, которые разрушают или изменяют укладку нуклеосом.

В настоящее время предлагается многоэтапная модель, описывающая функционирование GAGA и белковых комплексов в обеспечении активации или репрессии активности генов (Lehmann, 2004). На первом этапе белок GAGA, работающий в комплексе с другими белками, при помощи NURF или FACT разрушает и/или сдвигает нуклеосомы, делая доступными для активаторов или репрессоров необходимые сайты связывания. Предполагается, что первоначально GAGA может работать в комплексе с белком PSQ, который как и GAGA связывается с GA-богатыми последовательностями, а также с белком BAN. После связывания этого комплекса с ДНК и приращивании хроматин-ремоделирующих комплексов происходит изменение структуры хроматина в прилегающих к месту его посадки областях. Изменение структуры хроматина в регуляторных областях генов позволяет перейти ко второму этапу в регуляции активности генов. В ходе этого этапа активирующие или репрессирующие белки, а также их комплексы, могут напрямую взаимодействовать с транскрипционной машиной или рекрутировать другие белки, опосредующие активацию или репрессию транскрипции. Поскольку GAGA-элементы зачастую располагаются не только в промоторах, но и в дистальных регуляторных районах, то возможно физическое сближение отдаленных регуляторных элементов, обеспечиваемое белком GAGA. Таким образом предполагается, что GAGA может объединять различные белки, белковые комплексы и регуляторные элементы гена в единую регуляторную систему.

По мнению многих исследователей, образующаяся в результате действия GAGA структура хроматина сама по себе еще не определяет судьбу транскрипции, но делает ее восприимчивой к действию как активационных так и репрессивных комплексов. Предполагается, что функционирование GAGA как бы предваряет все последующие события транскрипции, которые будут зависеть от соотношения между белками активаторами и репрессорами (Bejarano & Busturia, 2004). Взаимодействие между всеми компонентами этой сложной регуляторной системы, вероятно, определяет судьбу экспрессии не только отдельных генов, но и целых комплексов генов (Zuckerkindl, 1999). Такая важная

многообразная роль GAGA в изменение структуры хроматина, по-видимому, определяет его значительную роль в огромном числе процессов, происходящих в ходе онтогенеза дрозофилы.

1.1.7. Влияние белка GAGA на деление клеток

Одним из процессов, в котором принимает участие ТФ GAGA, является процесс деления клеток. Было показано, что нарушение транскрипции гена *Trl* приводит к нарушениям митозов в ходе эмбриогенеза. У *Trl*-мутантов выявлено большое разнообразие нарушений при делении клеток во время раннего эмбриогенеза: аномальная конденсация хроматина, аномальная сегрегация и фрагментация хромосом (Bhat *et al.*, 1996; Трунова *и др.*, 2001). Основной причиной наблюдаемых дефектов считается уменьшение количества белка GAGA, которое приводит к модификации структуры центромерного гетерохроматина, что играет важную роль в обеспечении процесса деления клеток. Как было описано выше, белок GAGA изменяет структуру хроматина в регуляторных областях генов, большинство из которых располагается в эухроматиновых районах. Таким образом, GAGA влияет на транскрипцию генов. Однако было установлено, что этот белок может связываться и с гетерохроматином. Связывание GAGA с гетерохроматином обусловлено тем, что в последнем были выявлены многочисленные $(AAGAG)_n$ и $(AAGAGAG)_n$ сателлитные повторы, образующие протяжённые сайты связывания белка GAGA (Raff *et al.*, 1994). Связываясь с GAGA сайтами гетерохроматина, GAGA модифицирует структуру последнего. По данным Раффа и соавторов GAGA может связываться с некоторыми гетерохроматиновыми районами хромосом на всех стадиях клеточного цикла. Однако по данным других авторов, в диплоидных клетках личинок GAGA локализуется в центромерных районах метафазных хромосом, а после их деконденсации он выявляется уже только в эухроматине (Platero *et al.*, 1998).

Имеются данные, свидетельствующие о том, что белок GAGA требуется и для обеспечения мейотических делений (Sekelsky *et al.*, 1999), поскольку одна из полученных авторами мутаций гена *Trl* нарушает спаривание, рекомбинацию и расхождение половых хромосом в мейозе самок. Эта мутация, названная *mei-P24*, представляет собой вставку *P*-элемента во второй интрон гена на расстоянии около 500 п.н. от вставки транспозона в линии, несущей мутацию *Trl*^{13C}. У самок, гомозиготных по этой мутации, наблюдается необычайно

высокий уровень нерасхождения X-хромосом в мейозе. Так первоначально было установлено, что процент нерасхождения X-хромосом у самок *mei-P24* составлял 32,2 %, однако при повторном эксперименте он составил 4,3 %. Авторы высказали предположение, что причиной нарушений расхождения хромосом у самок *Trl*-мутантов также является нарушение структуры прицентромерного гетерохроматина. Следует отметить, что у самцов влияние белка GAGA на мейоз не было изучено.

1.1.8. Белок GAGA участвует в обеспечении дозовой компенсации у самцов дрозофилы

Как известно, кариотипы самцов и самок многих видов животных и растений отличаются числом и структурой половых хромосом. Поэтому для выравнивания уровня транскрипции генов, расположенных в половых хромосомах, у разных видов используются различные способы дозовой компенсации. У дрозофилы самцы имеют одну, а самки две X-хромосомы. У дрозофилы для выравнивания уровня транскрипции у разных полов используется специальный многокомпонентный комплекс MSL (male-specific-lethal). Он состоит из шести различных белков (Msl1, Msl2, JIL-1 и др.) и двух некодирующих РНК ([Meller et al., 2000](#)). Предполагается, что в X-хромосоме находятся определенные участки, в которых начинается сборка комплексов дозовой компенсации, так называемые «входные сайты хроматина» («chromatin entry sites»), из которых этот процесс распространяется на соседние районы X-хромосомы. ([Kelley et al., 1999](#)).

Поскольку было обнаружено, что некоторые комбинации аллелей *Trl* влияют на жизнеспособность самцов в гораздо большей степени, чем на жизнеспособность самок, было высказано предположение, что ген *Trl* может быть вовлечен в MSL-опосредованную дозовую компенсацию ([Greenberg et al., 2004](#)). Был проведен ряд экспериментов, подтверждающих это предположение. Эти эксперименты включали: двойное иммуноокрашивание политенных хромосом с помощью антител к изоформе GAGA-581 и белкам Msl-1 или Msl-2, сравнение жизнеспособности самцов и самок дигетерозигот, несущих мутации по генам комплекса MSL на фоне *Trl* мутаций, анализ трансгенов. Было установлено, что уменьшение количества белка GAGA приводит к тому, что один из входящих сайтов, локализованных в районе 12DE, где должна начинаться сборка MSL комплекса, перестает функционировать. Однако этот комплекс начинает неожиданно

выявляться в неположенных местах, расположенных в аутосомах (Greenberg *et al.*, 2004). Поскольку с помощью антител в районе 12DE обнаруживается белок GAGA, авторы делают заключение о том, что последний, видимо, важен для формирования и/или функционирования этого сайта. Возможно GAGA может использоваться для закоривания и распространения MSL комплексов не только в районе 12DE, но и в других сайтах посадки комплексов, поскольку установлено, что GAGA связывается в непосредственной близости и от других входящих сайтов MSL комплекса. Авторы полагают, что поскольку GAGA участвует в формировании районов хроматина, свободных от нуклеосом, он делает входящие сайты более доступными для компонентов комплекса MSL.

Не исключено, что белок GAGA участвует и в других процессах, происходящих в клетках дрозофилы. Так Рафф с соавторами полагают, что GAGA требуется для установления границ между эухроматином и гетерохроматином, т. е. GAGA может предотвращать распространение гетерохроматина в эухроматиновые области (Raff *et al.*, 1994). Предполагается, что именно это свойство данного белка является причиной того, что некоторые мутации гена *Trl* являются доминантными энхансерами эффекта положения мозаичного типа (Farkas *et al.*, 1994). Возможно также, что белок GAGA принимает участие в обеспечении так называемой «клеточной памяти». Считается, что GAGA, в отличие от многих других белков, не покидает хромосомы во время деления, а остается связанным с ДНК в течение всего клеточного цикла. Поэтому предполагается, что он может использоваться в качестве метки, которая позволяет белковым комплексам формироваться быстро и в нужном месте после окончания процесса деления клетки (Raff *et al.*, 1994; Cavalli & Paro, 1998; Brock & Fisher, 2005).

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют о том, что белок GAGA задействован во многих процессах происходящих в клетке. В настоящее время показано, что продукты гена *Trl* присутствуют на всех стадиях онтогенеза дрозофилы, а недостаток этих продуктов приводит к нарушениям развития мух. В настоящее время наиболее хорошо изучено влияние GAGA на эмбриогенез дрозофилы. Выявлены многие гены, которые контролируют эту стадию онтогенеза дрозофилы и транскрипционная активность которых зависит от ТФ GAGA. Влияние GAGA на другие стадии онтогенеза изучено слабо. Существуют данные о том, что он влияет на оогенез дрозофилы и формирование ее глаза. Однако какие этапы этих сложных процессов зависят от ТФ GAGA до недавнего времени было изучено слабо, что во многом определялось

отсутствием подходящих для этих целей гипоморфных мутаций. Рассмотрим подробнее все этапы этих процессов, для того, чтобы в дальнейшем установить роль GAGA в обеспечении нормального протекания оогенеза, сперматогенеза и формирования глаза дрозофилы.

1.2. Развитие половой системы *Drosophila melanogaster*

1.2.1. Ранние этапы развития половой системы дрозофилы

Установлено, что у самок и самцов *Drosophila melanogaster* формирование половой системы начинается на самых ранних стадиях эмбриогенеза, при этом на первых этапах развитие половой системы у обоих полов имеет много общего. На первых стадиях эмбриогенеза ядра синцития постепенно перемещаются к периферии. На 3-й стадии эмбриогенеза небольшое количество ядер (8–10 ядер) достигают области зародышевой или полярной плазмы, расположенной на заднем полюсе эмбриона. Зародышевая плазма характеризуется наличием так называемых полярных гранул, состоящих из белков и РНК. Находящиеся в них вещества определяют судьбу клеток зародышевого пути ([Mahowald, 2001](#)). Вскоре ядра в области половой плазмы обособляются (рис. 4 А) и приобретают клеточную оболочку, становясь предшественниками половых клеток (ППК). В этих клетках вплоть до 8–9 стадии эмбриогенеза процесс транскрипции приостанавливается, и они начинают делиться отличным от других клеток синцития образом. В то время как ядра синцития синхронно делятся, проходя 11–13 циклов дробления, ППК делятся не синхронно и не более 2 раз. В результате этих делений на заднем конце эмбриона образуется около 40 ППК ([Williamson & Lehmann, 1996](#)).

Во время гаструляции ППК перемещаются внутрь эмбриона. Этот процесс тесным образом связан с инвагинацией зачатка задней кишки (рис. 4 Б, В). ППК, прибредшие к этому времени амебообразную форму, начинают активно двигаться сквозь эпителий задней кишки (рис. 4 Д, Е). В ходе дальнейшего движения ППК разделяются на две группы и объединяются с соматическими клетками мезодермального происхождения (рис. 4 Е, Ж). ППК с дефектами миграции подвергаются апоптозу. К 13-й стадии эмбриогенеза формирование зачаточных гонад завершается, в это время каждая из них состоит из 10–15 клеток зародышевой линии (КЗЛ) и примерно из 200 соматических клеток. Таким образом, к концу эмбриогенеза в брюшном сегменте эмбриона образуются две

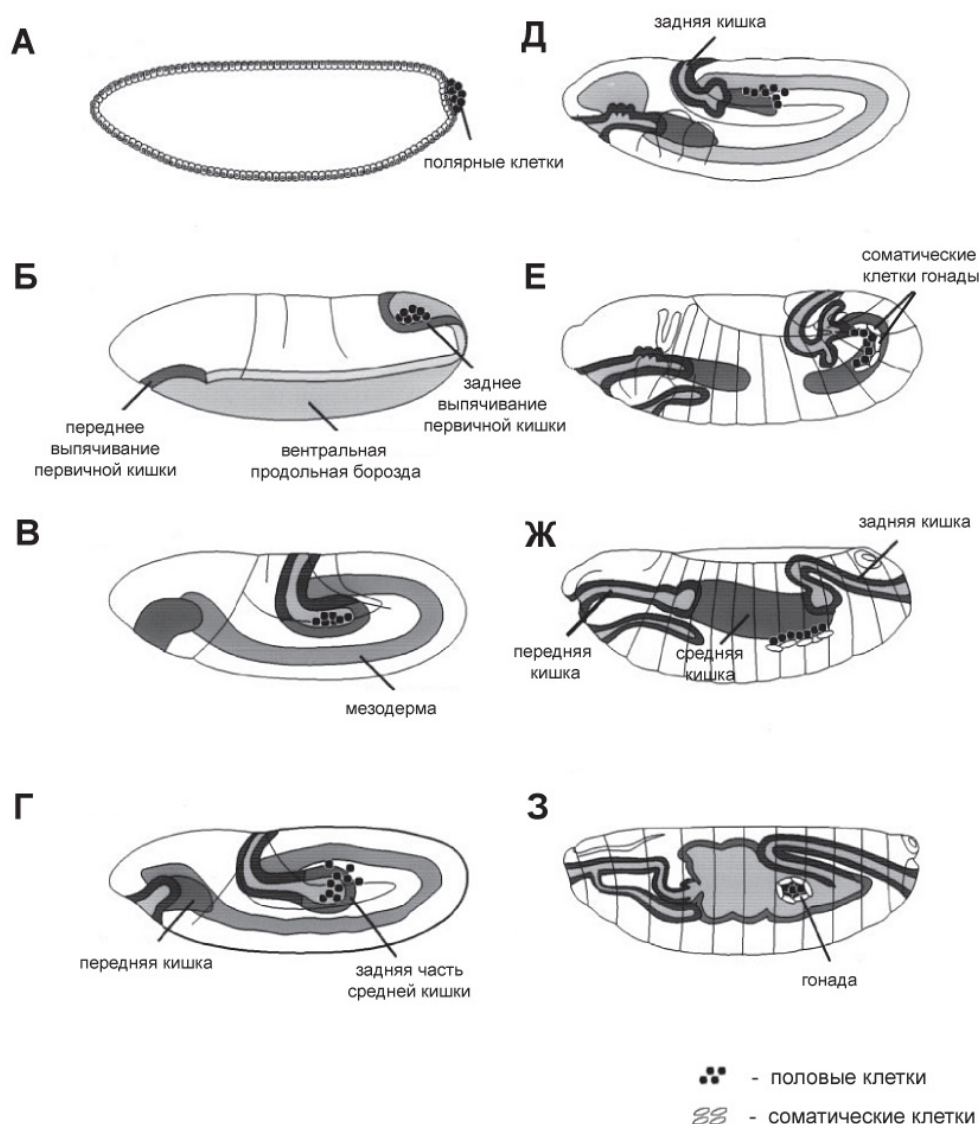


Рис. 4. Развитие половой системы дрозофилы на стадии эмбриогенеза (из [Williamson & Lehmann, 1996](#), с модификациями). Эмбрионы на всех рисунках обращены передней частью влево и дорзальной стороной вверх. А — 5-я стадия эмбриогенеза; Б — 7-я стадия эмбриогенеза; В — 8-я–9-я стадия эмбриогенеза; Г — 10-я стадия эмбриогенеза; Д — 11-я стадия эмбриогенеза; Е — 12-я стадия эмбриогенеза; Ж — 13-я стадия эмбриогенеза; З — 15-я стадия эмбриогенеза.

округлые зачаточные гонады, состоящие из соматических и КЗЛ ([Coffman, 2003](#)). У самок дрозофилы, сформировавшиеся зачаточные гонады значительно меньше по размеру, чем у самцов. Дальнейшее их развитие будет иметь значительные различия у разных полов.

Следует отметить, что миграция КЗЛ *Drosophila melanogaster* является удобной моделью для изучения механизмов и факторов миграции и других типов клеток других у разных видов. В современных исследованиях клеточной миграции КЗЛ дрозофилы рассматриваются как адекватная модельная система,

воспроизводящая особенности движения клеток иммунной системы и клеток метастазирующих опухолей (Jang *et al.*, 2007). Клетки злокачественных опухолей у многоклеточных эукариот, так же как и КЗЛ, слабо дифференцированы и мигрируют в индивидуальном порядке, поэтому данные, полученные при изучении миграции КЗЛ дрозофилы, могут быть использованы для поиска новых мишеней при терапии метастазирования. Несмотря на то, что для КЗЛ характерен низкий уровень транскрипционной активности, гены, которые в них экспрессируются, специфически определяют миграционное поведение (Richardson & Lehmann, 2010). Миграция КЗЛ запускается с помощью эволюционно-консервативного Jak/Stat сигнального пути и в этом участвует ген *stat92e*, экспрессия которого специфична для КЗЛ. В КЗЛ также экспрессируется ген *trapped in endoderm 1 (trel)*, который кодирует рецептор G-белка (G-protein-coupled receptor — GPCR). Ген *trel* является ортологом *CXCR4* гена человека, экспрессия которого нарушается при метастазах рака молочной железы. Trel имеет важное значение в ходе инициации и трансэпителиальной миграции КЗЛ. Этот белок участвует в активации высоко-консервативного белка — ГТФазы RHO1, которая регулирует динамику актинового цитоскелета. Процесс миграции КЗЛ сквозь эпителий кишечника и объединение с мезодермальными клетками контролируется помимо выше перечисленных генов и рядом других генов, включая гены *Hmgcr*, *fpps*, *quema*, *slow as molasses* и др. (Santos & Lehmann, 2004).

1.2.2. Развитие половой системы самок дрозофилы

Яичник взрослой самки дрозофилы состоит из 16–20 овариол (рис. 5), каждая из которых представляет собой полую трубку, внутри которой последовательно расположены растущие яйцевые камеры. В каждой овариоле зрелого яичника можно выделить три района: терминальный филамент, гермарий и вителларий (рис. 5).

На конце гермария располагаются 6–9 клеток, образующих терминальный филамент. В гермарии дрозофилы (рис. 6) можно выделить четыре функциональных района: 1, 2А, 2В и 3 (Spradling, 1993; Огиенко *и др.*, 2007). В первом районе гермария рядом с терминальным филаментом находятся 2–3 соматические клетки, называемые кэп-клетками (cap cells), а в непосредственной близости от них располагаются стволовые клетки, дающие начало всем половым клеткам яичников. У *D. melanogaster* стволовые клетки делятся митотически, в результате

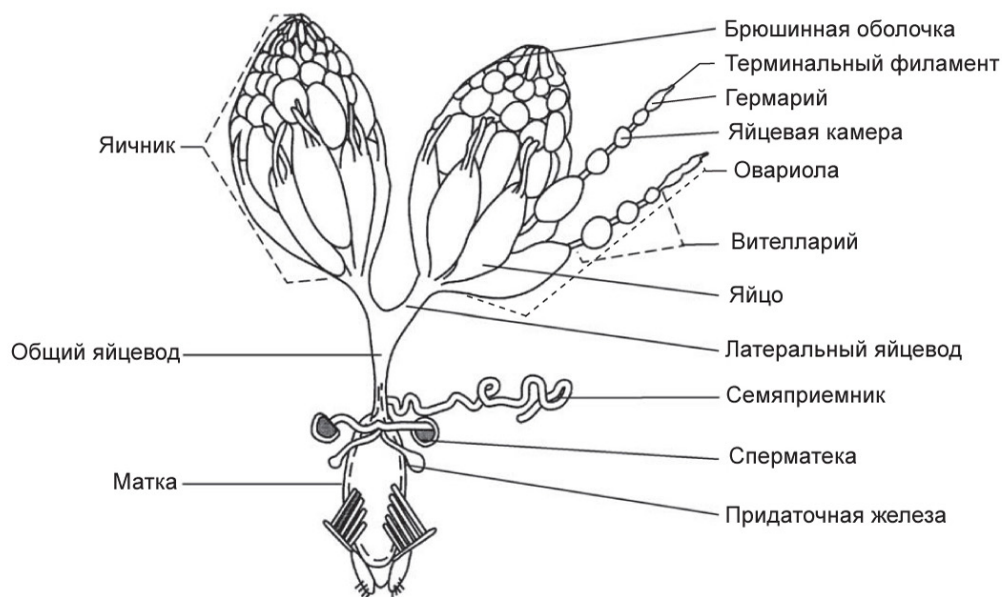


Рис. 5. Общий вид половой системы самок дрозофилы (с модификациями из [Miller, 1950](#)).

чего из одной клетки образуется цистобласт и новая стволовая клетка, которая занимает место материнской стволовой клетки (рис. 6). Вновь образованный цистобласт также как и стволовая клетка снова делится. В результате последовательных делений цистобласта в первом районе гермария образуются цисты, состоящие из двух, четырех и восьми половых клеток, а также 16-ти клеточные цисты, образованные в результате четырех делений цистобласта. В норме нарушение числа делений цистобласта случается крайне редко. У *D. melanogaster* деление цистобласта сопровождается неполным цитокинезом, в результате чего образуется синцитий, в котором клетки соединены между собой цитоплазматическими мостами, называемыми также кольцевые каналы (КК). Было установлено, что деление стволовых клеток и цистобластов происходит строго определенным способом и зависит от организации фусомы. Эта органелла мембранного происхождения обнаружена только в половых клетках ([Lin et al., 1994](#)). Первоначально фусома, называемая в это время спектросомой, имеет сферическую форму и состоит из множества мелких везикул. Спектросома ориентирует веретено деления, прикрепляясь к одному из его полюсов. Во время цитокинеза ее материал распределяется в обе дочерние клетки. Одна из образовавшихся в ходе деления клеток, получившая большую часть материала спектросомы, остается стволовой, а клетка, получившая меньшее количество спектросомы — цистобластом ([Deng & Lin, 1997](#)). В дальнейшем, в анафаза-телофаза, спектросома вытягивается

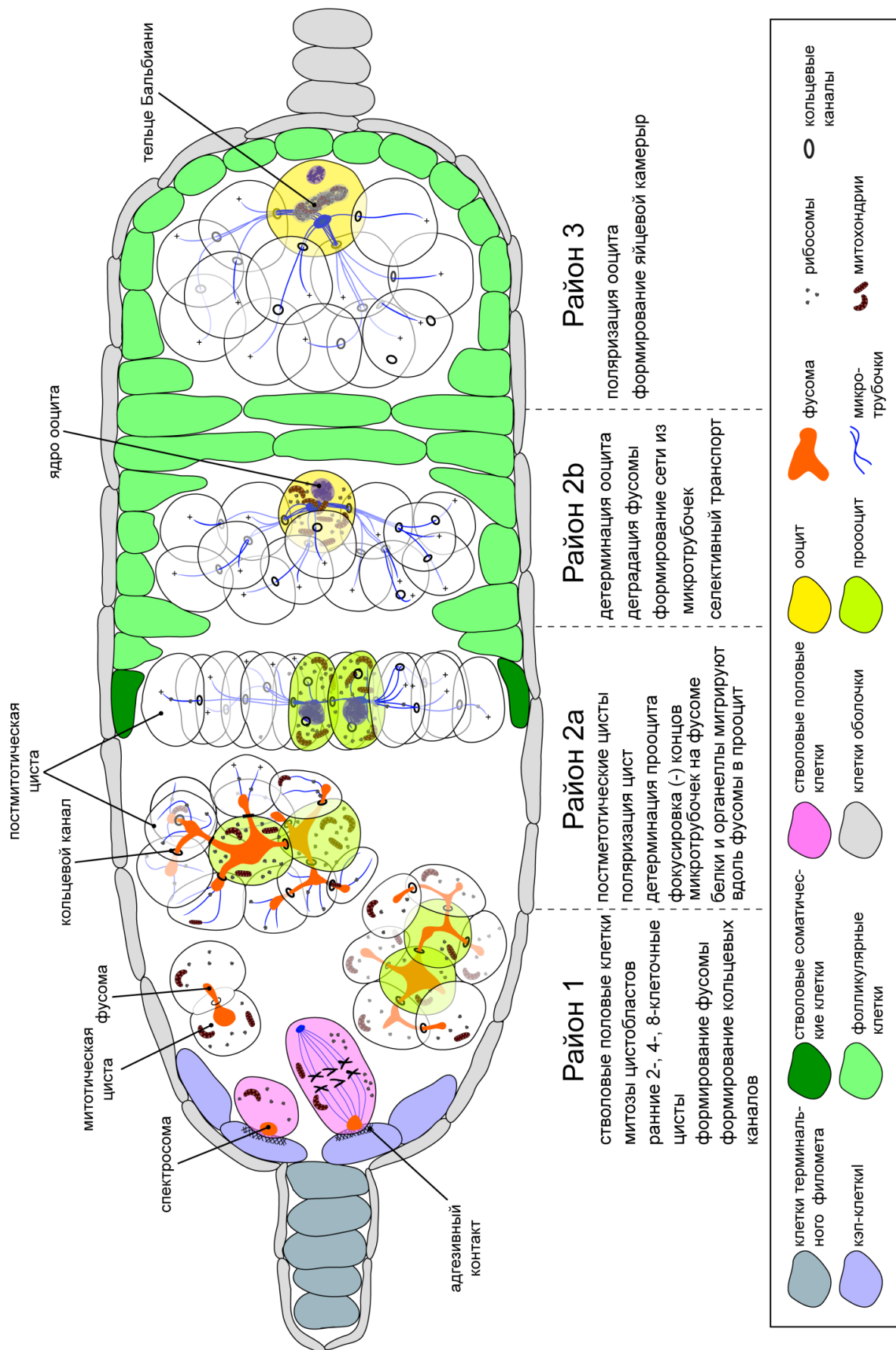


Рис. 6. Развитие яйцевой камеры в гермариуме.

вдоль оси веретена. Процесс деление цистобласта сопровождается изменением структуры спектросомы, которая с этого момента называется фусомой. **Во втором районе** гермария, который состоит из двух частей 2А и 2В (рис. 6), каждая клетка в 16 клеточной цисте характеризуется определенным числом КК (рис. 6). Две клетки цисты содержат четыре и две клетки — три канала, четыре клетки содержат два канала, а оставшиеся восемь содержат только по одному каналу (de Cuevas *et al.*, 1997). В этот период все клетки цисты морфологически выглядят достаточно единообразно, за исключением числа КК. Однако в цисте, проходящей через второй район гермария, одна из клеток начинает приобретать отличия от других клеток, становясь будущим ооцитом (проооцит). Им становится одна из двух клеток с четырьмя КК, содержащая наибольшее количество фусомного материала. В районе 2А гермария к центру фусомы направляются минус-концы микротрубочек, формируя центр, организующий микротрубочки. В цистах, находящихся в районе 2В, плюс-концы микротрубочек проходят через КК и попадают в каждую из 15 питающих клеток (рис. 6) (Theurkauf *et al.*, 1993). По сети микротрубочек и фусоме в ооцит начинают поступать необходимые для его развития вещества, включая мРНК генов *Bicaudal D*, *oskar*, *orb* и *hu-li tai shao* (Suter *et al.*, 1989), а также белки BIC-D и ORB. В этот же период в ооцит начинают также перемещаться центриоли, митохондрии и аппарат Гольджи (Cox & Spradling, 2003).

В 2А районе гермария в клетках цисты, обладающих тремя и четырьмя КК, формируется синаптонемальный комплекс, что свидетельствует о том, что эти клетки готовы к мейотическому делению. В дальнейшем большинство клеток цисты теряют синаптонемальный комплекс, за исключением одной клетки, обладающей четырьмя КК. В дальнейшем эта клетка станет ооцитом, а клетки, потерявшие синаптонемальный комплекс, станут питающими клетками. В районе 2В начинается процесс мейоза, однако на стадии профазы I он приостанавливается, а ДНК ооцита конденсируется, в результате чего формируется специфическая структура — кариосома. Продолжение мейотического деления происходит только на 10-й стадии развития яйцевой камеры (Spradling, 1993).

На границе 2А и 2В районов гермария происходит окружение сформировавшейся цисты фолликулярными клетками (ФК), которые образуются из двух стволовых клеток-предшественниц соматических клеток (рис. 6). Цисты, находящиеся в 2В районе гермария, уже полностью разделены между собой ФК. На этом этапе фолликулярные клетки можно разделить на три типа. Две

пары полярных клеток, располагаются на двух полюсах фолликула. От 4 до 6 интерфолликулярных клеток разделяют фолликулы между собой. И наконец, каждую цисту окружают многочисленные эпителиальные фолликулярные клетки. Клетки первых двух типов прекращают делиться уже в этом районе гермария, а эпителиальные фолликулярные клетки продолжают активно делиться с помощью митозов вплоть до 6-й стадии развития яйцевой камеры (Margolis & Spradling, 1995). Установлено, что все выше перечисленные типы ФК очень важны для формирования нормальной яйцевой камеры. Так, передние полярные клетки участвуют в определении судьбы многих ФК, включая бордюрные, центрипетальные, интерфолликулярные клетки, а также ФК, окружающие питающие клетки (Torres *et al.*, 2003). Задние полярные клетки определяют расположение ооцита внутри камеры, а их отсутствие приводит к нарушению его локализации. Они также требуются для установления передне-задней и дорзально-вентральной осей ооцита, способствуя реорганизации его цитоскелета (Grammont & Irvine, 2002). В полярных клетках активно экспрессируются гены *fringe* и *Notch*. Мутации по генам *fringe* приводят к отсутствию полярных клеток, в то время как мутации по гену *Notch* приводят к формированию сложных фолликулов, в которых несколько цист окружено единым слоем фолликулярных клеток.

В третьем, последнем, районе гермария обычно располагается только одна круглая циста (рис. 6). Пройдя этот район, яйцевая камера покидает гермарий и попадает в вителларий. Дальнейшее развитие яйцевой камеры дрозофилы изучено многими авторами чрезвычайно детально. Согласно морфологическим критериям этот период можно разделить на 14 стадий (рис. 7, Cummings & King, 1969). Яйцевая камера, покидающая гермарий, находится на первой стадии развития, а яйцо, находящееся на четырнадцатой стадии, уже готово к оплодотворению.

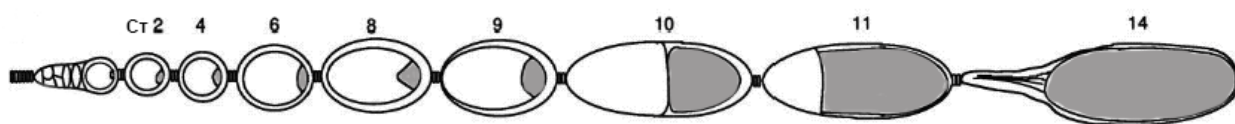


Рис. 7. Овариола яичника *D. melanogaster*. Сверху приведены стадии развития яйцевых камер. Слева расположен терминальный филамент, затем виден гермарий и далее вителларий.

1.2.3. Развитие яйцевой камеры после выхода из гермария

Растущие яйцевые камеры, покинув гермарий, продвигаются вдоль по овариоле, в которой может одновременно находиться по 6–7 яйцевых камер разных стадий развития. Эти камеры соединены между собой интерфолликулярными клетками (рис. 8). Рост и созревание яйцевой камеры после выхода из гермария сопровождается ростом ооцита и питающих клеток, а также активным делением ФК.

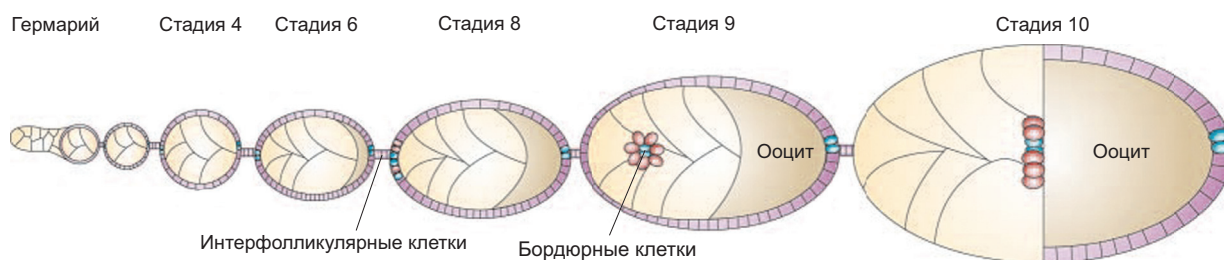


Рис. 8. Овариола яичника дрозофилы. Показано расположение разных типов фолликулярных клеток, включая мигрирующие бордюрные клетки.

Фолликулярные клетки яйцевой камеры дрозофилы

ФК активно делятся с помощью митозов вплоть до шестой стадии развития яйцевой камеры, в результате чего к седьмой стадии развития их число составляет около 700 клеток (Margolis & Spradling, 1995). В течение 7–9 стадии ДНК ФК проходит три цикла эндорепликации, в итоге каждая ФК содержит 16 копий геномной ДНК (Calvi *et al.*, 1998). Процесс перехода ФК от митоза к эндорепликации контролируется сигнальным путем Notch. Непосредственно перед началом этого процесса в половых клетках яйцевой камеры начинается активная экспрессия гена *Delta*, кодирующего белковый лиганд для трансмембранного рецептора — белка NOTCH, расположенного в ФК. Взаимодействие лиганда и рецептора инактивирует ген *string*, кодирующий Cdc25 фосфатазу. Уменьшение количества Cdc25 приводит к переходу ФК от митоза к эндорепликации (Lopez-Schier & St Johnston, 2001). Следует отметить, что до 6-й стадии развития яйцевой камеры эпителиальные ФК достаточно однородны, однако в дальнейшем их морфология и миграция будут значительно различаться. Большинство ФК во время 7–8 стадии развития яйцевой камеры начинают мигрировать в сторону растущего ооцита, приобретая цилиндрическую форму. В дальнейшем они с трех сторон окружают растущий ооцит (Spradling, 1993).

Бордюрные клетки

В течение 9-й стадии начнет формироваться и мигрировать в сторону растущего ооцита небольшая, но очень важная группа ФК, получившая название бордюрных клеток (БК). Эта группа, состоящая из 6–8 ФК (2 полярные и прилегающие к ним к ним эпителиальные ФК) отсоединяются от однослойного эпителия в передней части камеры и начинают мигрировать между питающими клетками по направлению к ооциту (рис. 9, [Montell et al., 1992](#)). Движение БК является примером коллективной миграции клеток ([Montell et al., 2012](#)), имеющей важное значение в морфогенезе различных органов и тканей, например, при формировании и самообновлении кровеносных сосудов, системы бронхов, эпителия кишечника, при движении кластеров эпидермальных кератиноцитов процессе заживления ран, а также при инвазийном росте опухолей. Это определяет интерес исследователей к изучению генетического контроля миграции БК. Несмотря на немногочисленность этих клеток, их движения контролируется продуктами многих генов, что свидетельствует о важности данного процесса для обеспечения нормального развития яйцевой камеры. Важную роль в миграции этих клеток играют PDGF/VEGF и JAK/STAT сигнальные пути ([Duchek & Rorth, 2001](#); [Harrison et al., 1998](#)).

Миграция БК, как и КЗЛ, инициируется с помощью JAK/STAT сигнального пути, который запускает экспрессию гена *slow border cells (slbo)*, кодирующего одноименный транскрипционный фактор, являющийся гомологом ССААТ enhancer binding protein (CEBP) млекопитающих. Идентифицировано несколько генов-мишеней Slbo, такие как: *DE-cadherin*, *Fak* (киназа фокальной адгезии), *singed (sn, fascin* дрозофилы), *armadillo (arm, β -catenin* дрозофилы) и некоторые другие. Большинство белков, кодируемых генами-мишенями Slbo, являются консервативными факторами ([Wang et al., 2006](#)). Важную роль в контроле миграции БК играют также белки, связанные со стероидным гормоном экдизоном. Так, мутации по гену *taiman*, который кодирует ко-активатор экдизонового рецептора, вызывают нарушение процесса миграции БК ([Bai et al., 2000](#)). Если первоначально БК двигаются прямо по направлению к ооциту, продвигаясь между питающими клетками, то во время второй, дорзальной, стадии миграции БК достигают ооцита и поворачиваются на девяносто градусов, и далее их движение продолжается в дорзальную сторону яйцевой камеры ([Spradling, 1993](#)). Было показано, что эта фаза миграции БК контролируется белком EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) и его лигандом белком Gurken ([Duchek & Rorth,](#)

2001). К десятой стадии, когда ядро ооцита мигрирует в передне-верхний угол ооцита, заканчивается миграция БК, в это время они достигают переднего края ооцита. В дальнейшем эти клетки участвуют в формировании такой важнейшей структуры как микропиле, которое необходимо для прохождения спермы.

Центрипетальные клетки

К началу 10-й стадии большинство ФК, имеющих цилиндрическую форму, располагаются над ооцитом. Над питающими клетками к этому времени находится только около 50 ФК, формирующих однослойный эпителий (рис. 9). На 10В стадии ФК, расположенные на краю цилиндрического эпителия (центрипетальные клетки, ЦК), уплощаются и начинают мигрировать между питающими клетками и ооцитом (рис. 9). Миграция центрипетальных клеток заканчивается, когда они достигают бордюрных клеток. В результате к этому времени весь ооцит полностью покрывается фолликулярным эпителием (Horne-Badovinac & Bilder, 2005). Установлено, что в клетках лидирующего края центрипетальных клеток активно экспрессируется ген *decapentaplegic (dpp)*, который является важнейшим регулятором миграции этих клеток (Twombly *et al.*, 1996).

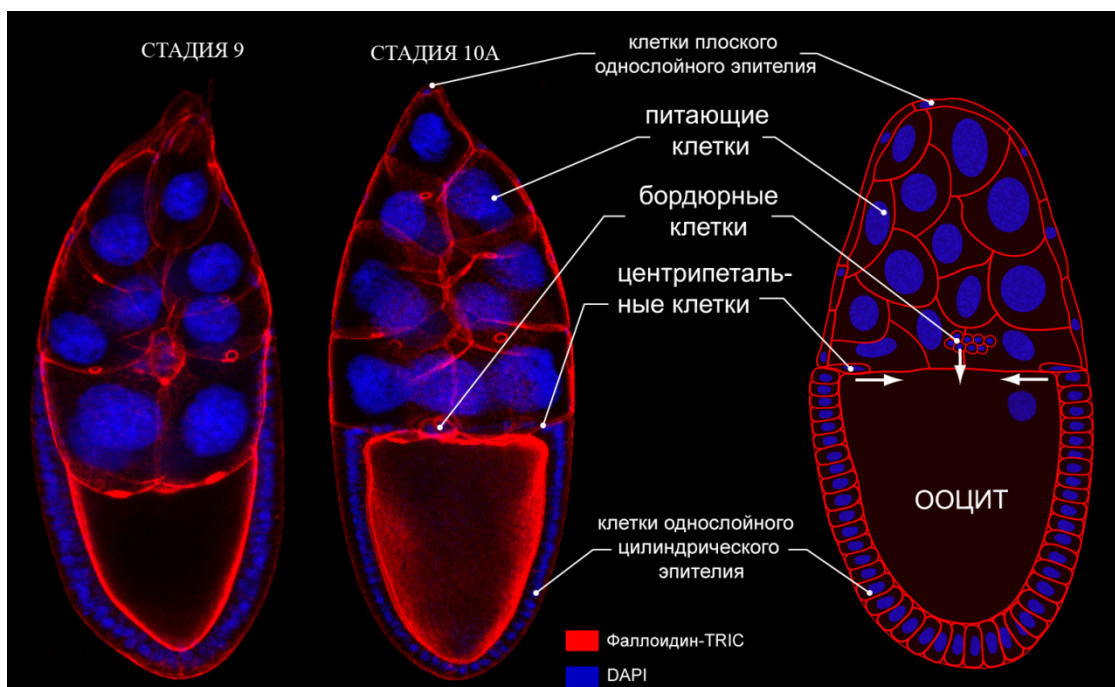


Рис. 9. Миграция бордюрных клеток на 9–10 стадиях развития яйцевой камеры дрозофилы.

Клетки, дающие начало дорзальным выростам хориона

На последних стадиях развития яйцевой камеры (стадии 8–14) две группы ФК, расположенных на переднем конце ооцита, дают начало дорзальным выростам хориона (ДВХ) — специализированным структурам, которые удерживают эмбрион на поверхности корма, обеспечивая его дыхание (Spradling, 1993). Каждая группа содержит около 150 клеток. В настоящее время изучение процесса генетического контроля ДВХ является одним из наиболее интенсивно развивающихся и популярных направлений в исследованиях оогенеза дрозофилы. Такое пристальное внимание данному процессу привлекает, поскольку ДВХ, являясь полыми трубками, представляют собой прекрасную модель для изучения процессов тубулогенеза, т.е. превращение эпителиальной ткани в трубчатые структуры. Тубулогенез является консервативным процессом. Он наблюдается у разных видов животных в процессе формирования таких органов как легкие, сердце, почки, нервная трубка, кишечник и т.д. Консервативными также являются многие гены, контролирующие данный процесс (Berg, 2008).

Как показано на рис. 10, в норме ДВХ состоят из двух частей — ножки и расширенной части, называемой лопастью. ДВХ формируются из фолликулярных клеток, расположенных на переднем конце ооцита. Многоэтапный процесс развития ДВХ контролируется продуктами многих генов, большинство из которых являются эволюционно-консервативными. Наиболее важную роль в развитии ДВХ играют три сигнальных пути EGFR, DPP и NOTCH (Dobens & Raftery, 2000; Омелина и Баричева, 2012).

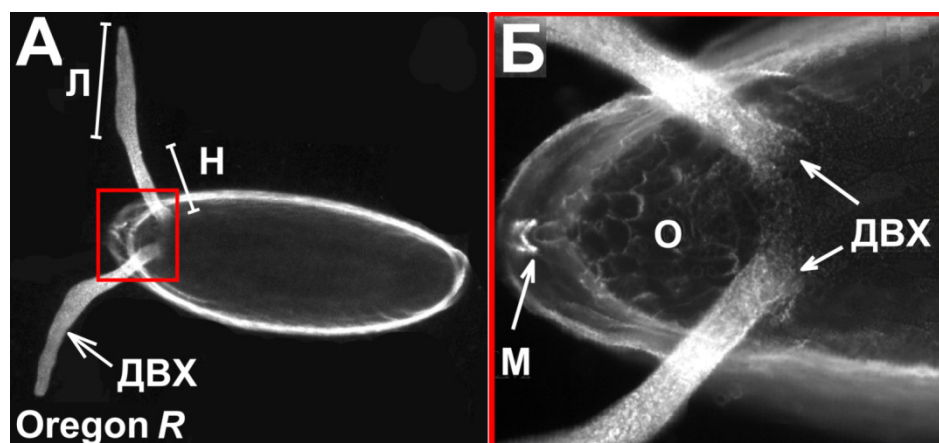


Рис. 10. Яйцо *D. melanogaster* дикого типа (А); увеличенное изображение передней области яйца дрозофилы (Б). ДВХ — дорзальные выросты хориона, О — оперкулум, М — микропиле, Н — ножка ДВХ, Л — лопасть ДВХ.

Сигналом для начала формирования ДВХ является секреция белка GURKEN (GRK), относящегося к классу трансформирующих факторов роста TGF- α (Neuman-Silberberg & Schupbach, 1993). Этот белок является лигандом рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR). Транскрипты гена *grk* впервые обнаруживаются на самых ранних этапах развития яйцевой камеры, когда она еще находится в районе 2В гермария (Neuman-Silberberg & Schupbach, 1993, 1996). Поскольку распределение транскриптов гена *grk*, также как и одноименного белка, чрезвычайно важно для правильного формирования ДВХ (Hsu *et al.*, 1996), этот процесс контролируется продуктами многих генов (Омелина и Баричева, 2012). В процессе формирования ДВХ GRK запускает две петли положительных и три петли отрицательных обратных связей, которые регулируют активность EGFR пути в клетках фолликулярного эпителия (Yakoby *et al.*, 2005; Омелина и Баричева, 2012).

Важную роль в формировании ДВХ играет также сигнальный путь Decapentaplegic (Dpp) (Twombly *et al.*, 1996). Центральный белок этого сигнального пути — белок DPP принадлежит к семейству трансформирующих факторов роста β (TGF- β) и требуется для правильного функционирования нескольких типов соматических клеток яичников дрозофилы, включая клетки, дающие начало ДВХ. Изменение экспрессии гена *dpp* приводит к нарушению длины яйца и неправильному формированию передних дорзальных структур яйцевой оболочки, включая ДВХ и оперкулум у *dpp*-мутантов (Padgett *et al.*, 1987; Twombly *et al.*, 1996). Впервые экспрессия гена *dpp* выявляется в конце 8-й стадии развития яйцевой камеры в 20–30 соматических фолликулярных клетках, расположенных на переднем конце яйцевой камеры, а на 10А стадии число клеток, характеризующихся экспрессией *dpp*, увеличивается примерно в два раза. На 10–11 стадиях развития яйцевой камеры экспрессия *dpp* наблюдается в лидирующей группе центрипетальных клеток, расположенных на границе ооцита и питающих клеток и в фолликулярных клетках, покрывающих питающие клетки. На стадиях 13–14 область экспрессии *dpp* ограничена фолликулярными клетками, лежащими над питающими, и клетками, окружающими микропиле (Twombly *et al.*, 1996). Таким образом, оказалось, что ген *dpp* экспрессируется в районах, удаленных от клеток, дающих начало ДВХ. Считается, что Dpp влияет на морфогенез ДВХ и дифференцировку оперкулума, диффундируя из передних фолликулярных клеток (Dobens & Raftery, 1998). В настоящее время сложный механизм воздействия Dpp на клетки, дающие начало ДВХ, достаточно хорошо

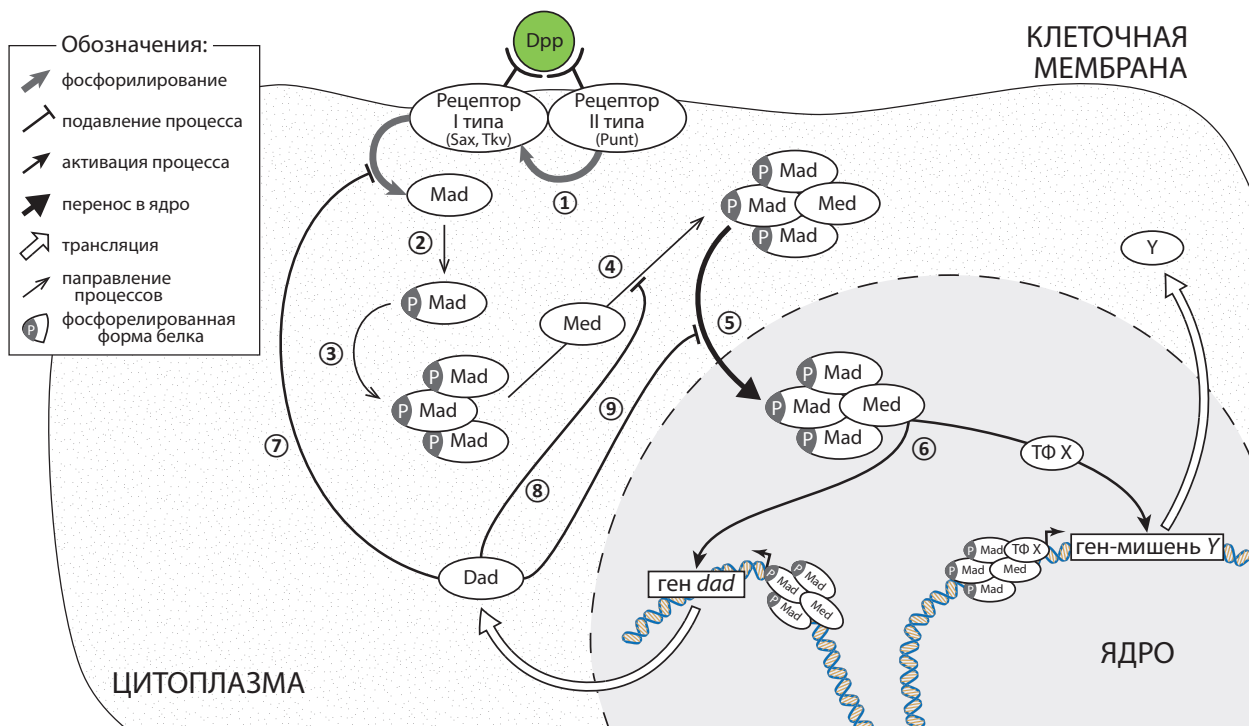


Рис. 11. Схема сигнального пути DPP.

изучен. Первоначально он взаимодействует с серин/треонин киназными рецепторами I и II типов (рис. 11; [Derynck, 1994](#)). Dpp-рецепторы I типа (Sax, Tkv) кодируются соответственно генами *saxophone* (*sax*) и *thickveins* (*tkv*) ([Brummel et al., 1994](#); [Nellen et al., 1994](#); [Xie et al., 1994](#)), а Dpp-рецептор II типа (Punt) кодируется геном *punt* ([Letsou et al., 1995](#); [Ruberte et al., 1995](#)). Связываясь с рецепторами I и II типов, Dpp обеспечивает пространственное сближение этих рецепторов на клеточной поверхности ([Shi & Massague, 2003](#)). Это позволяет рецептору II типа фосфорилировать киназный домен рецепторов I типа, которые далее передают сигнал посредством фосфорилирования белка Mad (рис. 11 ①, ②), относящегося к семейству SMAD. В настоящее время выявлено 8 различных белков SMAD, которые подразделяются на 3 класса: рецептор-регулируемые, включая Mothers against dpp (Mad), белки-посредники — комедиаторы, включая Medea (Med), и ингибирующие, включая Daughters against dpp (Dad). Далее передача Dpp-сигнала проходит через гомотримеризацию фосфорилированной формы Mad и формирование комплекса с Med (рис. 11 ③, ④). Этот комплекс проникает в ядро клетки (⑤) и там совместно с другими транскрипционными факторами регулирует различные гены-мишени сигнального пути Dpp (⑥). Экспрессия гена *dad*, кодирующего ингибирующий SMAD-белок, запускается активным комплексом Mad/Med (⑥). В свою очередь Dad ингибирует активность DPP-сигнала, поскольку стабильно связывается с рецептором Tkv и тем

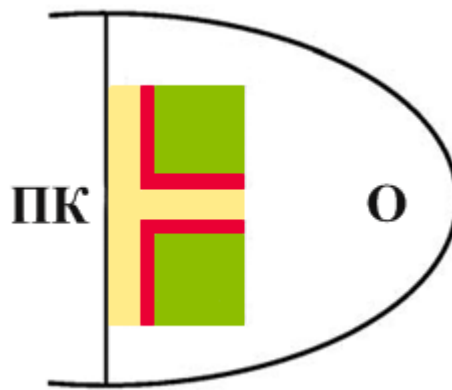


Рис. 12. Схематическое изображение клеток, дающих начало ДВХ, 10В стадия развития яйцевой камеры. Красным обозначены выстилающие клетки, Зеленым — покровные клетки, желтым цветом обозначена Т-область (из Ward *et al.*, 2006 с модификациями). О — ооцит, ПК — область питающих клеток.

самым подавляет Tkv-индуцированное фосфорилирование Mad (⑦). Кроме того, Dad может блокировать взаимодействие Mad и Med (⑧), а также перенос комплексов Mad/Med в ядро (⑨) (Inoue *et al.*, 1998). Нарушения в количестве белков, входящих в сигнальный путь Dpp, приводят к серьезным проблемам в формировании ДВХ (цитируется по Омелина и Баричева, 2012).

Формирование ДВХ контролируется также сигнальным путем Notch. Трансмембранный белок-рецептор Notch (N) контролирует различные процессы эмбрионального и постэмбрионального развития (Xu *et al.*, 1992), поскольку он играет важную роль в обеспечении различных клеточных взаимодействий (Artavanis-Tsakonas & Simpson, 1991). При формировании ДВХ он играет важную роль в установлении границы между покровными и выстилающими клетками (рис. 12), из которых и формируются ДВХ (Dorman *et al.*, 2004; Ward & Berg, 2005; Ward *et al.*, 2006).

В начале морфогенеза ДВХ, т. е. в середине 10В стадии, белок Notch накапливается в Т-зоне фолликулярных клеток, разделяющей две группы клеток, дающих начало ДВХ (рис. 12). Это приводит к подавлению экспрессии гена *broad (br)* в этой зоне (Ward *et al.*, 2006). В клетках же с низким содержанием Notch (BR-клетки), наблюдается высокий уровень экспрессии гена *br*, эти клетки (обозначены зеленым) формируют дорзальную и латеральную стороны ДВХ. В конце 10В стадии в фолликулярных клетках с высоким уровнем экспрессии гена *Notch* (клетки Т-области) начинается экспрессия гена *rhomboid (rho)*. В результате формируется слой клеток с высоким содержанием белка RHO (обозначены красным), окружающих с двух сторон кластеры клеток с высоким

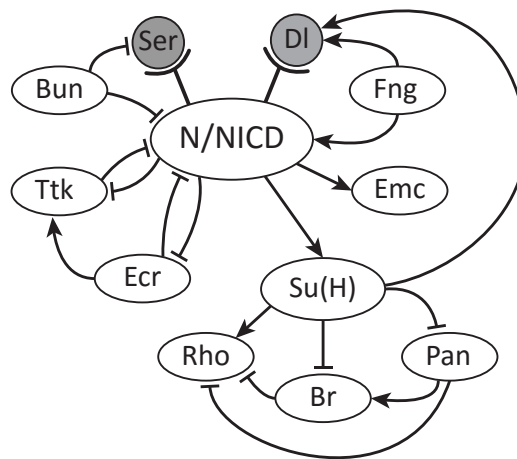


Рис. 13. Схема сигнального пути NOTCH. Цветом выделены лиганды рецептора NOTCH (N) (Омелина и Баричева, 2012).

содержанием белка BR. Эти клетки формируют вентральную сторону каждого ДВХ (Ward *et al.*, 2006).

В ходе установления границы между BR- и RHO-клетками рецептор Notch взаимодействует с лигандами Serrate (Ser) и Delta (Dl) (рис. 13; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995, 1999; Dobens *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2006).

Связывание лиганда с рецептором Notch запускает серию реакций, в результате которых освобождается внутриклеточный домен этого белка NICD (Notch Intracellular Domain), который является активной формой белка Notch (Pan & Rubin, 1997; Lieber *et al.*, 2002; Dobens *et al.*, 2005). NICD проникает в ядро, где взаимодействует с транскрипционным фактором SUPPRESSOR OF HAIRLESS (SU(H)). Это взаимодействие приводит к супрессии гена *br* и активации гена *rho* (рис. 13), что и способствует установлению строго определенной концентрации белков в BR- и RHO-клетках, о которых говорилось выше.

Установлено, что в ходе развития ДВХ с NOTCH-сигнальным путем взаимодействуют гены *extra macrochaetae* (*emc*) и *tramtrack* (*ttk*) (рис. 13). Экспрессия гена *emc* в фолликулярных клетках яйцевой камеры дрозофилы контролируется сигнальным путем NOTCH (Adam & Montell, 2004), а *emc*-мутанты откладывают яйца с различными нарушениями ДВХ. Экспрессия гена *ttk* необходима для удлинения трубок формирующихся ДВХ, поэтому *ttk*-мутанты откладывают яйца с укороченными ДВХ (French *et al.*, 2003; Boyle & Berg, 2009). Следует отметить, что во время морфогенеза дорзальных выростов хориона Notch и ТТК являются взаимными репрессорами. Кроме того, *Notch* и *ttk* взаимодействуют с *Ecdysone receptor* (*EcR*), экспрессия которого активирует *ttk*. На стадии 10В NOTCH-сигнальный путь может блокировать экспрессию *EcR* (Sun *et al.*, 2008),

а отсутствие экспрессии *EcR* приводит к активации *Notch* и, соответственно, отсутствию сигнала ТТК. Следовательно, *ECR* подавляет экспрессию *Notch* (Boyle & Berg, 2009).

С помощью разработанных нами и верифицированных компьютерных методов было установлено, что часть важнейших регуляторов процесса миграции клеток, дающих начало ДВХ, содержат в своих регуляторных районах сайты связывания GAGA (Omelina *et al.*, 2011). К их числу относятся гены *dpp*, *sax*, *tkv*, *N*, *gurken* (*grk*), *br* и *bunched* (*bun*).

Таким образом, многочисленные ФК яйцевой камеры дрозофилы выполняют разнообразные функции в течение ее развития. Они защищают растущий ооцит и формируют разнообразные структуры, необходимые для выживания и функционирования яйца. Обеспечение растущего ооцита питательными веществами обеспечивает другая группа клеток, называемых питающими. Они происходят из клеток зародышевой линии. В яйцевой камере дрозофилы находится 15 питающих клеток (ПК).

1.2.4. Транспорт питательных веществ, вырабатываемый в питающих клетках в ооцит

Одной из отличительных черт ПК насекомых является то, что ДНК в этих клетках проходит несколько циклов эндорепликации, в результате чего степень полиплоидии достигает в ближайших к ооциту питающих клетках 2048С. Благодаря огромному количеству ДНК в полиплоидных ядрах, в ПК вырабатываются огромные количества веществ, обеспечивающих развивающийся ооцит. Перенос питательных веществ из ПК в ооцит — сложный многоэтапный процесс, зависящий от правильной работы множества генов. На протяжении первых 2–3 суток развития яйцевой камеры питательные вещества, вырабатываемые ПК, медленно и селективно переносятся в ооцит. На 10В стадии развития яйцевой камеры начинается быстрый транспорт питательных веществ. В этот сравнительно небольшой период времени, занимающий около 30 минут, большая часть содержимого ПК переносится в ооцит. После окончания быстрого транспорта в ПК остаются только ядра, немного актиновых филаментов и очень мало цитоплазмы (Spradling, 1993). Нарушения процесса быстрого транспорта приводят формированию маленьких яиц неправильной формы. В настоящее время основными причинами нарушения процесса быстрого транспорта считаются нарушения

процессов формирования актинового цитоскелета ПК, а также нарушения миграции центрипетальных клеток.

1.2.4.1. Структура актинового цитоскелета питающих клеток во время быстрого транспорта

На стадии 10В в ПК, готовых к стадии быстрого транспорта, выделяют три типа актиновых филаментов: субкортикальный слой, выстилающий внутреннюю поверхность питающих клеток, актиновые филаменты, выстилающие КК, и сеть цитоплазматических актиновых филаментов, которые протягиваются от поверхности питающих клеток к ядрам (рис. 14).

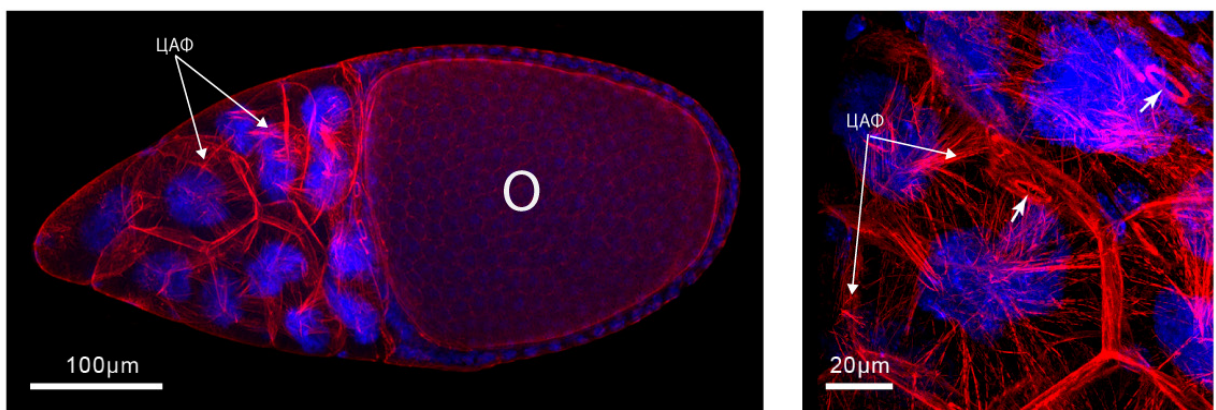


Рис. 14. Структура актинового цитоскелета яйцевой камеры 10В стадии развития. ЦАФ — цитоплазматические актиновые филаменты. О — ооцит.

В результате многочисленных экспериментов было установлено, что нарушение в формировании всех этих типов актиновых филаментов приводит к нарушению процесса быстрого транспорта. Так, в частности, было установлено, что фаза быстрого транспорта нарушается при неправильном формировании цитоплазматических актиновых филаментов (ЦАФ). Например, маленькие яйца неправильной формы, имеющие так называемый «dumple» фенотип, характерны для мутантов по генам *chickadee* (*chic*) (Cooley *et al.*, 1992), *quail* (Mahajan-Miklos & Cooley, 1994), *capping protein beta* (*cpb*) (Ogienko *et al.*, 2013) и *singed* (*sn*) (Paterson & O'Hare, 1991). Все эти гены кодируют актин-связывающие белки и у мутантов по этим генам нарушено формирование ЦАФ. Сеть ЦАФ у них развита значительно слабее, чем в норме, а сами ЦАФ выглядят тонкими и дезорганизованными. В результате, во время фазы быстрого транспорта, большие

полиплоидные ядра ПК не могут удерживаться вдали от КК дефективными ЦАФ и забивают КК, тем самым, блокируя дальнейший ток цитоплазмы из питающих клеток в ооцит. Яйца, полученные из таких камер, по размеру меньше, чем в норме, и часто гибнут в яичниках еще до их откладки.

Второй причиной нарушения фазы быстрого транспорта может быть нарушение структуры КК, которые обеспечивают связь между всеми ПК и ооцитом. Структура и размеры КК меняются на всем протяжении развития яйцевой камеры. У самок *Drosophila* размер КК варьирует от ~1 мкм в диаметре (первый район гермария), до ~10 мкм на 10-й стадии развития яйцевой камеры (Robinson & Cooley, 1996).

Кольцевые каналы образуются в результате неполного цитокинеза из сократительного кольца, к которому по мере развития цисты добавляются стабилизирующие белки. С помощью электронного микроскопа было установлено, что кольцевой канал имеет наружный, ассоциированный с мембранами и внутренний край. Внутренний край кольца состоит из неплотно упакованных актиновых пучков, а также из других белков, которые добавляются к КК по мере его развития (Tilney *et al.*, 1996). Одним из первых белков, связывающихся с будущим КК, является гликопротеин D-мucin. Он присоединяется к сократительному кольцу во время первого митотического деления и остается на своем месте в течение всего оогенеза (Kramarov *et al.*, 1997). В первом районе гермария к белкам внешнего края КК добавляются фосфотирозиновые белки, а в 2А районе гермария к КК добавляется фибриллярный актин и продукт гена *hu-li tai shao*, кодирующего белок HtsRC. В этом же районе гермария к остановившейся перетяжке добавляется филамин-подобный белок, кодируемый геном *cheerio*. В первом и втором районах гермария на формирующихся КК концентрируется актин-связывающийся белок анилин, однако по мере превращения сократительного кольца в зрелый кольцевой канал, количество этого белка постепенно снижается. Предполагается, что этот белок связывается с актиновыми филаментами временно до момента появления другого сшивающего белка — белка Kelch, который добавляется последним в начале третьего района гермария. Белок Kelch требуется для сохранения плотности внутреннего края КК. Мутации по генам, кодирующим вышеперечисленные белки, приводят к нарушениям структуры КК и к нарушению транспорта (цитируется по Огиенко *и др.*, 2007).

И, наконец, третьей причиной нарушения фазы быстрого транспорта является нарушение миграции центрипетальных клеток. В настоящее время

появились немногочисленные данные о том, что яйца «dumple» фенотипа наблюдаются у мутантов, характеризующихся нарушением миграции центрипетальных клеток (Dobens & Raftery, 2000; Cavaliere *et al.*, 2005). Центрипетальные клетки, лежащие между питающими клетками и ооцитом, формируют физический барьер против силы, обеспечивающей продавливание содержимого питающих клеток через маленькие КК в ооцит. Нарушение формирования этого барьера ведет к нарушению процесса быстрого транспорта.

1.2.5. Эволюционная консервативность оогенеза

Несмотря на то, что процесс оогенеза сильно отличается у разных видов, ряд общих черт характерен для многих видов, даже сильно удаленных в ходе эволюционного процесса.

Во-первых, гаметогенез у большинства видов сопровождается формированием группы клеток, так называемых цист. Последние образуются из одной половой клетки-предшественницы. У всех видов цисты характеризуются наличием КК и синхронными митотическими делениями. Следует отметить, что число клеток в цисте различно у разных видов. Так, в яичниках *Drosophila* клетка-предшественница делится четыре раза, в яичниках мыши число делений часто равно 2^n , в то же время у цыпленка и млекопитающих число клеток в цисте не фиксировано (Pepling & Spradling, 1998). Формирование цист в ходе гаметогенеза является широко распространенным явлением. Вероятно, это связано с тем, что их существование позволяет решать многие проблемы гаметогенеза. У самцов межклеточное взаимодействие внутри цисты способствует синхронности развития сперматоцитов и дает возможность продуктам генов беспрепятственно распределяться между всеми сперматоцитами (Braun *et al.*, 1989). У самок существование цисты дает возможность одной клетке, специализированной в качестве ооцита, получать наработанные питающими клетками вещества, необходимые для ее успешного развития.

Во-вторых, у многих видов мейоз происходит в течение всей взрослой жизни. Это характерно для самок высших насекомых и самцов большинства видов. У самок позвоночных, а также самцов и самок низших насекомых мейоз протекает преимущественно до наступления взрослой стадии. В яичниках взрослых самок этих видов цисты отсутствуют, однако ряд данных свидетельствует о том, что они формируются в зачаточных гонадах. Так, с помощью электронного

микроскопа цисты были выявлены в зачаточных гонадах самок позвоночных и низших насекомых.

В-третьих, общей для разных видов чертой гаметогенеза является формирование фолликулов, которые представляют собой специализированную структуру для развития половых клеток. Фолликул обычно состоит из одной или нескольких половой клеток, окруженных фолликулярными клетками. В половых клетках, которые в дальнейшем станут ооцитами, мейоз приостанавливается на стадии профазы мейоза I. Период приостановки может длиться от нескольких дней до многих лет в зависимости от вида. Фолликулы обеспечивают быстрый рост ооцита, способствуя накоплению питательных веществ, необходимых для развития будущего эмбриона. У дрозофилы фолликул или яйцевая камера представляет собой цисту, состоящую из 15 питающих клеток и одного ооцита, которые со всех сторон окружены слоем фолликулярных клеток. У млекопитающих формирование фолликулов является многоэтапным процессом. Вначале фолликулярные клетки окружают кластер ооцитов, формируя полиовулярные фолликулы. На этом этапе между ооцитами выявляются межклеточные мосты. На следующем этапе фолликулярные клетки уже окружают каждый ооцит в отдельности, в результате чего формируется примордиальный фолликул (Kurilo, 1981). У рыбки *Danio rerio* однослойный эпителий вначале окружает несколько ооцитов, и только в дальнейшем каждый ооцит окружается индивидуальным слоем эпителия (Selman *et al.*, 1993).

Таким образом, для разных видов характерны разные типы фолликулов, однако все они состоят из половых и соматических клеток и имеют ряд общих черт. Многие гены, контролирующие функционирование этих типов клеток, являются эволюционно консервативными. *Drosophila melanogaster* является прекрасной моделью, позволяющей выяснить роль отдельных генов и сообществ генов, работающих под контролем определенных транскрипционных факторов, контролирующих процесс оогенеза, а полученные на дрозофиле данные могут быть использованы и при анализе других видов.

1.3. Развитие половой системы самцов *Drosophila melanogaster*

Несмотря на то, что ранее отсутствовали данные о влиянии ТФ GAGA на развитие половой системы самцов, мы не исключали, что он важен также и для этого процесса, поскольку развитие половой системы самок и самцов имеет

ряд общих черт. Так, как было отмечено выше, первые этапы развития половой системы схожи у обоих полов. Кроме того, как для половой системы самцов, так и для половой системы самок, характерно наличие синцития. Поэтому ниже мы вкратце остановимся на рассмотрении формирования гамет у самцов дрозофилы. Репродуктивная система самцов *Drosophila melanogaster* (рис. 15) представлена двумя семенниками (с), базальный конец которых открывается в семенные каналы (ск). Последние соединяются с семенными пузырьками (сп), где накапливаются зрелые сперматозоиды.

Семенники взрослых самцов *Drosophila melanogaster* имеют форму цилиндра диаметром около 0,1 мм и длиной до 2 мм. На дистальном конце семенника расположены стволовые КЗЛ, которые окружены соматическими клетками. Кроме того здесь же, по две возле каждой стволовой клетки, располагаются специализированные соматические клетки, называемые цистными. Эти клетки претерпевают ряд митотических делений и в дальнейшем формируют оболочку цисты (Lindsley & Tokuyasu, 1980). В каждом семеннике находится по 5–9 стволовых клеток. Каждая такая клетка делится, давая начало новой стволовой клетке,

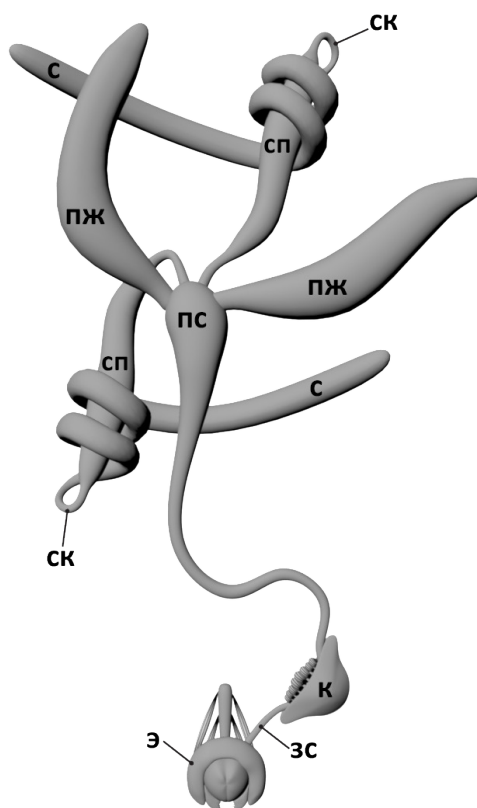


Рис. 15. Строение репродуктивной системы взрослых самцов *Drosophila melanogaster*. (с) семенник; (ск) семенной канал; (сп) семенной пузырёк; (пж) придаточная железа; (пс) передний семявыводящий канал; (к) камера семенного канала; (зс) задний семявыводящий канал; (э) эдеагус.

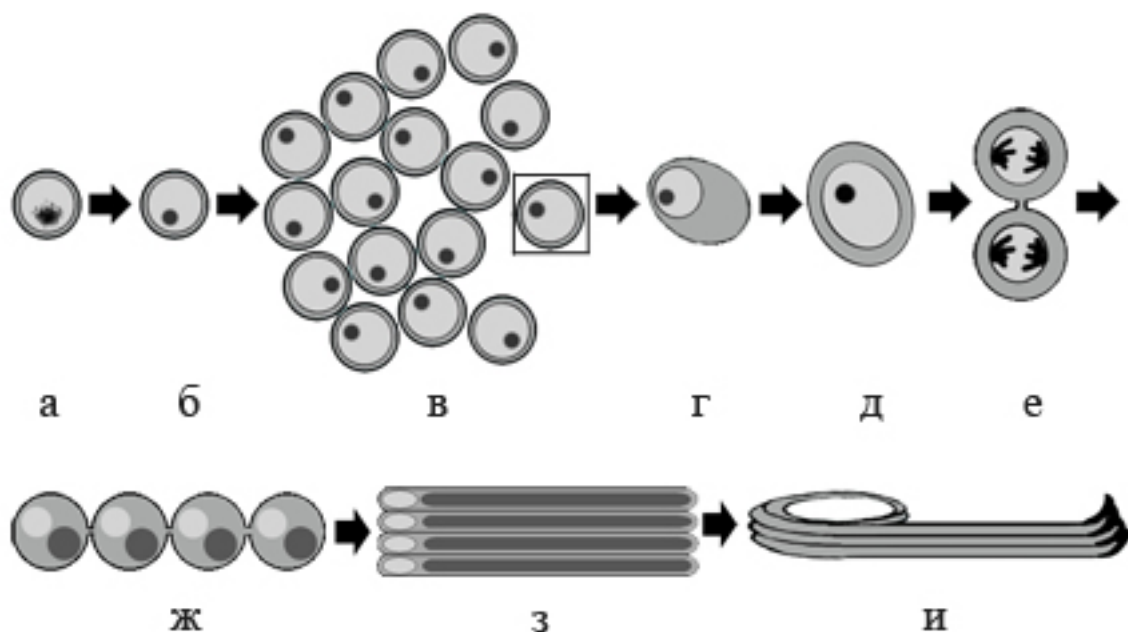


Рис. 16. Схема формирования сперматид у самцов *Drosophila melanogaster*. а) стволовая КЗЛ; б) первичная гониальная клетка; в) сперматогонии; г) полярный первичный сперматоцит; д) аполярный первичный сперматоцит; е) вторичные сперматоциты; ж) сперматиды на стадии луковицы; з) сперматиды на стадии элонгации; и) зрелые сперматиды после индивидуализации.

занимающей место материнской, и первичной гониальной клетке (рис. 16 А, Б). После ряда митотических делений из одной первичной гониальной клетки развиваются 64 спермия. Цистные клетки, в это время делятся синхронно с гониальной клеткой. В результате формируется циста внутри которой располагаются 64 спермия. Циста покрыта оболочкой, состоящей из потомков цистных клеток. Длительность формирования цисты, содержащей 64 зрелых спермия составляет 250 часов. В семеннике взрослого самца *Drosophila melanogaster* насчитывается примерно 170 цист.

На рис. 16 представлена схема формирования зрелых сперматид у взрослых самцов дрозофилы. На начальных этапах формирования сперматид первичная гониальная клетка (рис. 16 Б) претерпевает 4 митотических деления, в результате этого формируется циста, содержащая 16 сперматогоний (рис. 16 В). Эти первые митотические деления характеризуются неполным цитокинезом, поэтому сперматогонии остаются связанными между собой КК, которые сохраняются вплоть до заключительных стадий сперматогенеза. Сразу после четвертого митотического деления клетки вступают в S фазу мейоза, во время которой количество ДНК в каждой сперматогонии удваивается. После увеличения количества ДНК,

клетки в составе 16-клеточной цисты будут называться первичными сперматоцитами. Они вступают в фазу роста, длящуюся около 90 часов (Lindsley & Tokuyasu, 1980). За это время происходит транскрипция большого числа генов, продукты которых необходимы для последующего морфогенеза. Также увеличивается количество и степень развития органелл и объём первичных сперматоцитов возрастает в 25 раз (Fuller, 1993). По морфологическим признакам первичные сперматоциты можно разделить на несколько типов. Молодые первичные сперматоциты морфологически схожи с гониальными клетками, их цитоплазма, со слабо развитым эндоплазматическим ретикулюмом, содержит немного митохондрий; ядра клеток на этой стадии имеют неровные границы, ядерная мембрана одинарная, а ядрышко рыхлое. Первичные сперматоциты на следующей стадии называются полярными (рис. 16 Г). Они характеризуются наличием круглого ядра с хорошо заметным плотным ядрышком, а их митохондрии расположены на противоположном от ядра полюсе. В дальнейшем, на стадии аполярного первичного сперматоцита (рис. 16 Д), ядра смещаются в центр клеток, начинает формироваться второй слой ядерной мембраны, контуры ядра снова становятся неровными. На этой стадии митохондрии распределены равномерно по всей цитоплазме и связаны с хорошо развитым эндоплазматическим ретикулюмом. Зрелый первичный сперматоцит представляет собой крупную клетку, в цитоплазме которой выявляется множество митохондрий, ассоциированных с эндоплазматическим ретикулюмом и две пары центриолей.

По окончании стадии роста первичные сперматоциты вступают в мейоз. После первого, редукционного, деления мейоза формируется циста, содержащая 32 вторичных сперматоцита (рис. 16 Е). В процессе обоих мейотических делений цитокинез остаётся незавершённым, в результате чего получившиеся 64 сперматиды в составе одной цисты оказываются связанными КК.

Вышедшие из мейоза сперматиды сначала вступают в стадию слияния митохондрий. В это время митохондрии группируются полумесяцем, частично окружая ядро с той стороны, где находится единственная в клетке центриоль. Постепенно скопление митохондрий уплотняется и приобретает сферическую форму, отдельные митохондрии начинают сливаться, из них формируются две крупные митохондрии (Fuller, 1993). В это же время ядро увеличивается в размере, а центриоль частично погружается в ядро со стороны слившихся митохондрий, превращаясь в базальное тельце (Tates, 1971).

Далее сперматиды претерпевают стадию развития, называемую стадией луковицы (рис. 16 Ж). На этой стадии две крупные митохондрии представляют собой образование, состоящее из слоёв свёрнутых митохондриальных мембран, напоминающее луковицу, откуда и возникло название этой стадии. Поскольку это образование располагается рядом с ядром, то оно называется небенкерном (от немецкого слова *nebenkern*, находящийся около ядра). Предполагается, что небенкерн играет роль хранилища мембран, которые будут нужны клетке в период элонгации. На стадии луковицы из базального тельца начинает расти аксонема. Растущая аксонема окружается мембраной, которая, вероятно, является производной эндоплазматического ретикулума. Небенкерн удлиняется, постепенно сужаясь и разворачиваясь. В результате образуются два примерно равные по размеру производных небенкерна, которые удлиняются вместе с аксонемой. Стадия, для которой характерны длинные хвосты сперматид (от 35 до 120 мкм) и ядра сферической формы, называется стадией кометы. Постепенно одно из производных небенкерна становится меньше другого. К концу элонгации длина производного небенкерна достигает 1,8 мм. На стадии элонгации происходит также конденсация и удлинение ядер сперматид. В результате конденсации хроматина объём ядра уменьшается приблизительно в 200 раз ([Tates, 1971](#)).

Следующий этап сперматогенеза носит название индивидуализации (рис. 17). На этой стадии из сперматид удаляется почти вся цитоплазма, значительная доля органелл, меньшее производное небенкерна редуцируется до тонкого тяжа, идущего вдоль аксонемы. Кроме того, во время индивидуализации исчезают цитоплазматические мостики, связывающие до этого момента сперматиды, и клетки, происходящие из КЗЛ, становятся индивидуальными. В начале процесса индивидуализации вокруг ядер формируются конусовидные структуры,

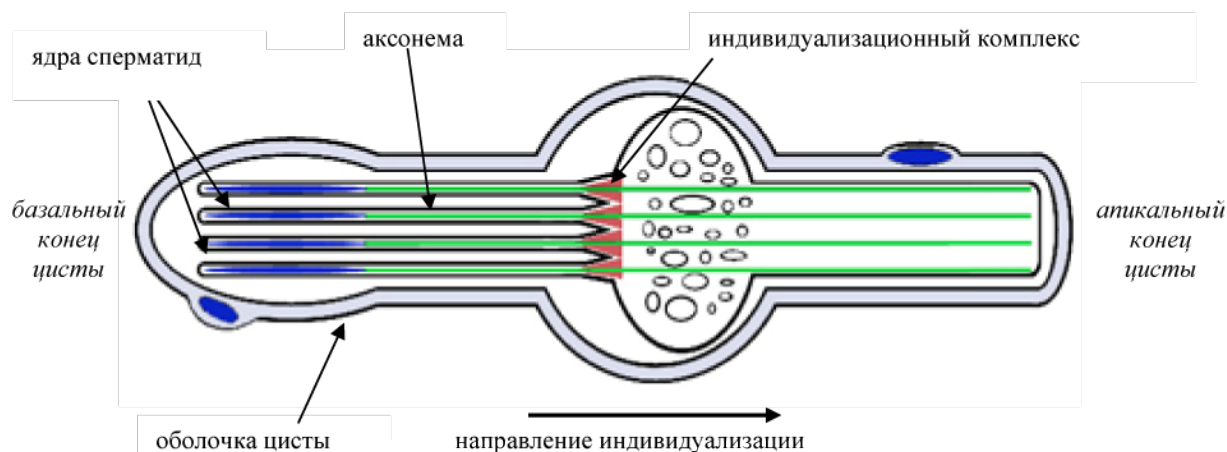


Рис. 17. Процесс индивидуализации сперматид у самцов дрозофилы.

богатые фибриллярным актином (Tokuyasu *et al.*, 1972). Эти структуры входят в состав индивидуализационного комплекса, который движется вдоль оси цисты с базального конца, где расположены ядра, до апикального конца. Вокруг индивидуализационного комплекса в цисте образуется утолщение, диаметр которого постепенно увеличивается в процессе индивидуализации. Увеличение размеров этого утолщения происходит за счет увеличения количества цитоплазмы и входящих в нее органелл, которые в его составе продвигаются к апикальному концу цисты. Когда индивидуализационный комплекс достигает конца цисты, утолщение удаляется из цисты вместе с содержащимися в нём цитоплазмой и деградирующими органеллами (Lindsley & Tokuyasu, 1980). После завершения стадии индивидуализации цисты закрепляются у основания семенника, а затем постепенно переходят в его базальную часть. В конце развития уже зрелые спермии освобождаются из оболочки цисты и проникают в семенной канал и движутся далее, благодаря своей способности к движению.

1.4. Формирование глаза дрозофилы

Еще в первых работах по изучению гена *Trl* было отмечено, что мутанты по данному гену характеризуются грубой поверхностью глаз (Farkas *et al.*, 1994). Позднее были найдены и другие нарушения структуры глаза у мутантов (Dos-Santos *et al.*, 2008). Было показано, что в глазах мутантов *Trl*^{13C} наблюдаются дополнительные вторичные и третичные пигментные клетки, что связано с подавлением процесса апоптоза, в норме удаляющего избыток этих клеток. Анализ мозаичных клонов показал, что в омматидиях, состоящих из гомозиготных по нуль-аллелю *Trl*^{81.1} клеток, в которых, по мнению авторов, драматически снижено количество GAGA, наблюдаются изменения формы и числа первичных пигментных клеток, а также отсутствие некоторых щетинок, расположенных между омматидиями. Эти нарушения свидетельствуют о том, что белок GAGA может быть вовлечен в регуляцию экспрессии генов, задействованных в развитии глаза дрозофилы. Ниже мы остановимся на рассмотрении структуры глаза и генов, которые контролируют процесс развития глаза дрозофилы, чтобы понять место ТФ GAGA в этих процессах.

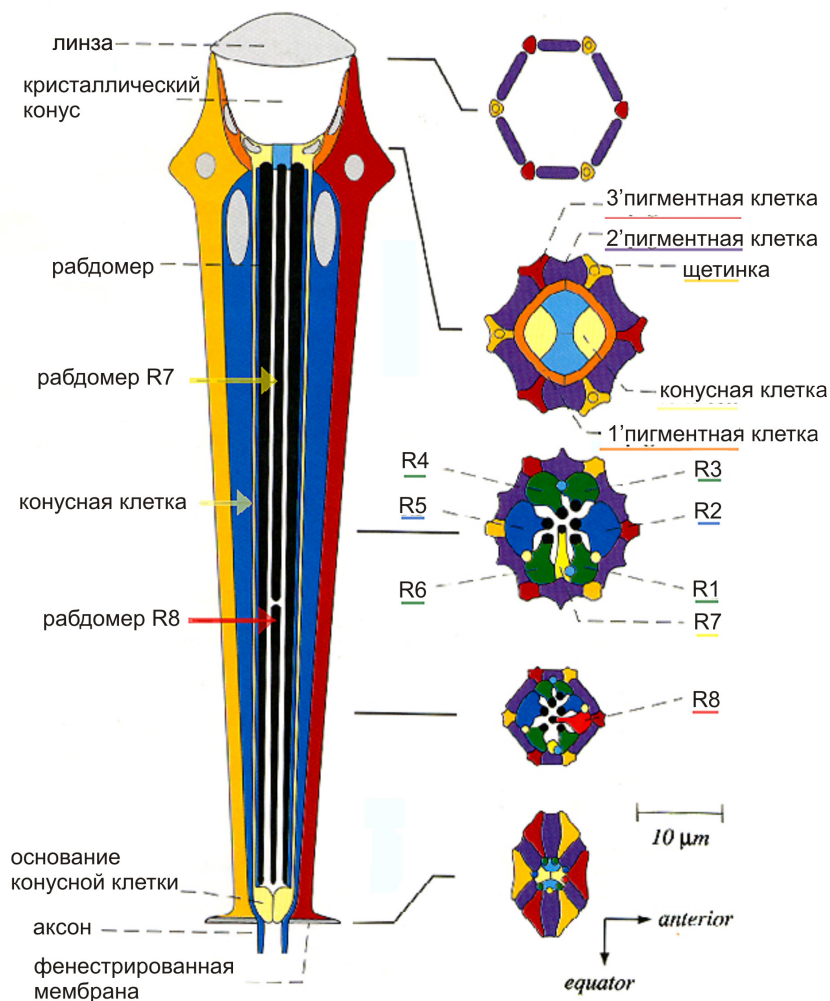


Рис. 18. Организация структурной единицы глаза дрозофилы — омматидия. Справа показан продольный срез, а слева пять поперечных срезов, проходящих через омматидий (с модификациями из Wolff & Ready, 1993).

1.4.1. Структура глаза дрозофилы

Сложный глаз дрозофилы состоит приблизительно из 800 структурных единиц, называемых омматидиями. Каждый омматидий содержит 8 фоторецепторных нейронов — фотонейронов (R1–R8), 4 конусные клетки, секретирующие линзы, и 2 первичные пигментные клетки (ПГК). Омматидии окружены вторичными и третичными ПГК, которые обеспечивают световую изоляцию, а также механо-сенсорные щетинками (Wolff & Ready, 1993; рис. 18).

Расположенные в середине омматидия восемь фотонейронов подразделяются на три функциональные группы, включающие фотонейроны R1–R6, R7 и R8. В фоторецепторах, входящих в каждую группу, присутствуют разные фоточувствительные пигменты, поэтому представители каждой группы имеют определенную спектральную восприимчивость. Кроме того, каждая из трех групп фотонейронов характеризуется различным положением синапсов в оптических

долях мозгового ганглия. Синапсы фотонейронов R1-R6 располагаются в ламине, а синапсы фотонейронов R7 и R8 занимают различные позиции в медуле — более глубоком слое оптической доли. Отличительной чертой всех фотонейронов является наличие специализированной структуры, называемой рабдомером, которая состоит из большого числа светочувствительных микроворсинок. В каждом из рабдомеров насчитывается около 60 тыс. микроворсинок, содержащих родопсин. Фотонейроны R1–R6 (внешние фоторецепторы) образуют гексагональную структуру вокруг внутренних фотонейронов, т. е. фотонейронов R7 и R8. Фотонейроны R1–R6 проходят по всей длине омматидия, в то время как фоторецептор R7 занимает позицию в центре верхней части омматидия, а R8 располагается в центре нижней части омматидия (рис. 18). Рабдомеры внешних фотонейронов R1–R6 образуют трапецевидную структуру вокруг внутренних рабдомеров R7 и R8. В дорзальной и вентральной частях глаза омматидии имеют зеркальные, относительно условной срединной линии, называемой экватором, ориентации трапецевидных структур, состоящих из рабдомеров (рис. 19).

Над фоторецепторами располагается заполненный жидкостью кристаллический конус, который является светопреломляющей частью омматидия. Кристаллический конус сверху ограничен корнеальной линзой, с боков двумя первичными ПГК, и снизу четырьмя конусными клетками. Все клетки омматидия,

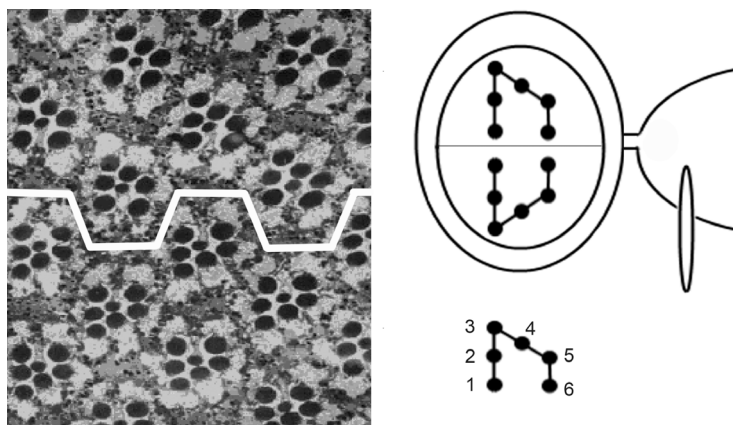


Рис. 19. Расположение омматидиев в глазу дрозофилы. На срезе глаза (слева) видны трапецевидные структуры, образованные внешними рабдомерами фотонейронов R1–R6 (отмечены на схеме справа цифрами 1–6). В дорзальной и вентральной частях глаза трапецевидные структуры ориентированы зеркально относительно горизонтальной линии — экватора, который отмечен белой линией. Справа схематично отображена голова мухи (вид сбоку). На схеме показана ориентация омматидиев относительно экватора. Внизу приведена схема расположения рабдомеров фотонейронов R1-R6 (с модификациями из [Rawls et al., 2007](#)).

за исключением первичных пигментных клеток, имеют протяженность от верхней поверхности глаза до основания ретины. Дно глаза выстилает фенестрированная мембрана. Она отделяет фоторецепторные клетки ретины от клеток головного мозга. В формировании этой мембраны принимают участие основания вторичных и третичных пигментных клеток, основания конусных клеток и внеклеточный матрикс. В результате формируется мембрана с небольшими отверстиями, через которые к мозгу проходят аксоны фотонейронов (Cagan & Ready, 1989; Wolff & Ready, 1993).

1.4.2. Развитие глаза дрозофилы

Глаз дрозофилы формируются из глазо-антеннальных имагинальных дисков. Зачатки этих дисков образуются из двух кластеров клеток эктодермального происхождения, располагающихся в передней части эмбриона. В каждом из кластеров насчитывается около двадцати клеток (Green *et al.*, 1993). Эти клетки многократно делятся в течение первой личиночной стадии, и глазо-антеннальный имагинальный диск оформляется как структура (Wolff & Ready, 1993). В течение второй личиночной стадии рост имагинального диска продолжается. В этот период в диске выделяются три компартмента, которые дадут начало глазу, антенне и головной кутикуле взрослой мухи (Haynie & Bryant, 1986). К концу второй личиночной стадии в морфогенетическом поле глаза устанавливается дорзо-вентральная ось. Это событие контролируется генами, входящими в сигнальные пути Wingless и Notch (Heberlein *et al.*, 1998; Tomlinson & Struhl, 1999). В начале третьей личиночной стадии на заднем краю глазного диска начинается дифференцировка клеток. Диск продолжает расти и волна дифференцировки, двигаясь от заднего края диска к переднему, проходит приблизительно за 48 часов по всему глазному диску. Своеобразной границей, разделяющей недифференцированные и дифференцированные клетки глазного диска, является так называемая морфогенетическая бороздка, которая располагается вдоль дорзо-вентральной оси диска (Ready *et al.*, 1976). Клетки, находящиеся в районе морфогенетической бороздки, останавливаются в G1-фазе клеточного цикла (Tomlinson & Ready, 1987). В данной области происходит дифференцировка фотонейронов R8, каждый из которых в дальнейшем выступит в роли фотонейрона-основателя омматидия. Этот фотонейрон посредством межклеточных взаимодействий, обеспечивает дальнейшее формирование кластера клеток

будущего омматидия. Этот процесс происходит в строго определенном порядке. Первоначально, за пределами морфогенетической бороздки к фотонейтрону R8 присоединяется пара фотонейронов R2/R5, а затем пара фотонейронов R3/R4. В результате формируется так называемый предкластер, состоящий из пяти клеток. Окружающие предкластер недифференцированные клетки проходят еще одну волну митозов. В дальнейшем к предкластеру последовательно присоединяются пара фотонейронов R1/R6, фотонейрон R7, передние и задние конусные клетки, затем экваториальные и полюсные конусные клетки (Tomlinson & Ready, 1987; Wolff & Ready, 1993). Дифференцировка остальных клеток глаза происходит на кукольной стадии развития дрозофилы. Вначале этого периода к омматидию присоединяются две первичные ПГК. Затем вокруг каждого омматидия формируется сетка из вторичных ПГК, третичных ПГК и щетинок, каждая из которых состоит из четырех клеток (Wolff & Ready, 1993). Избыток предшественников вторичных и третичных пигментных клеток удаляется с помощью апоптоза (Cagan & Ready, 1989).

1.4.3. Дифференцировка клеток омматидия

В настоящее время известно, что дифференцировка каждого типа клеток омматидия контролируется строго определенной комбинацией сигналов, передаваемых посредством сигнальных путей, а также специфичных для каждого типа клеток генов предподготовки (Voas & Rebay, 2004). Основными сигнальными путями, необходимыми для дифференцировки большинства клеток омматидия, являются Notch и RTK/Ras1. Предполагается, что сигнальные пути RTK/Ras1 и Notch обеспечивают общую информацию, требующуюся для дифференцировки большинства клеток омматидия. Дальнейшая более специализированная дифференцировка уже в разные типы клеток обеспечивается экспрессией генов предподготовки в недифференцированных клетках. К этим генам относятся гены *atonal (ato)*, *rough (ro)*, *lozenge (lz)* и *ttk* и другие, продукты которых обеспечивают дальнейшую экспрессию клеточно-специфичных генов (Voas & Rebay, 2004).

Было установлено, что дифференцировка всех клеток омматидия, за исключением клетки R8, зависит напрямую или опосредованно от активности DER-RTK/Ras1 сигнального пути, активация которого обеспечивается связыванием рецептора Epidermal growth factor receptor (Egfr или DER) с белком Spitz (Spi), который является его лигандом. Белок Spi первоначально секретируется

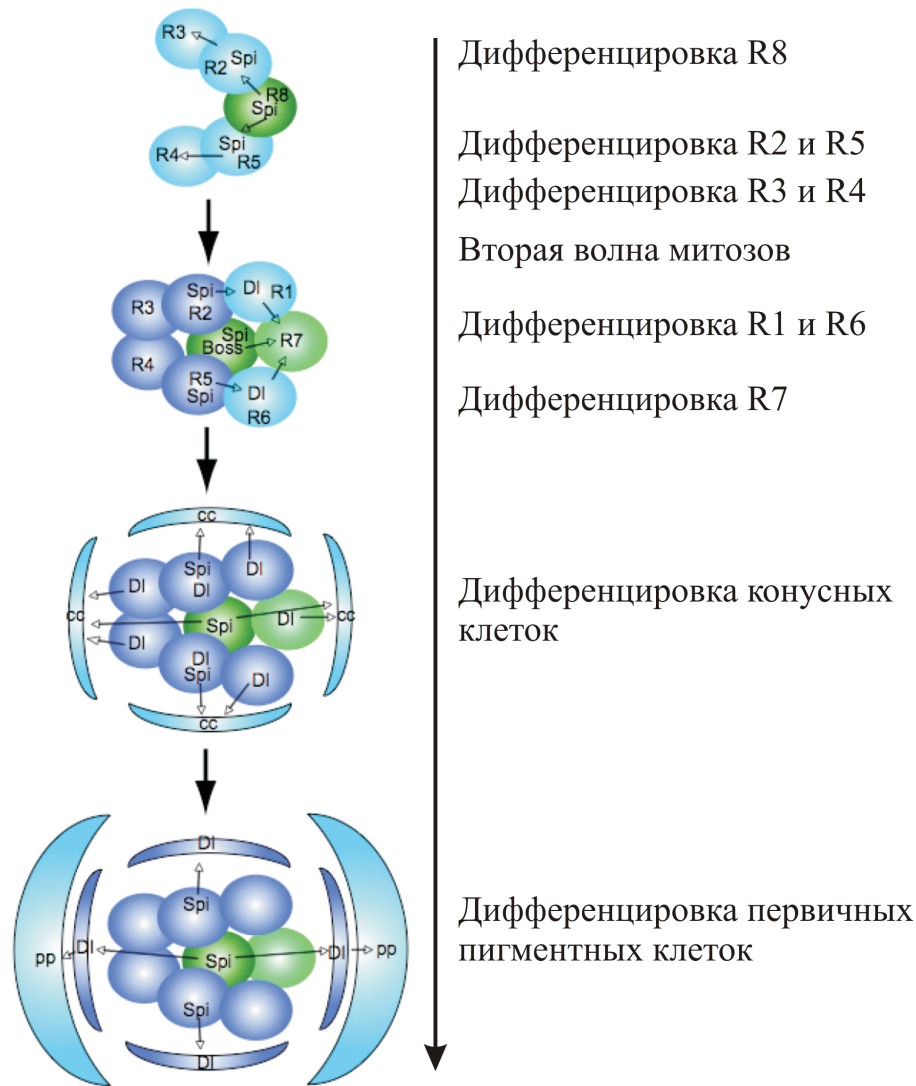


Рис. 20. Последовательность дифференцировки клеток омматидия. Основной контроль осуществляется сигналами Spi и DI. Первоначально белок Spi обеспечивает дифференцировку фотонейронов R2/5, R3/4 и R1/6. В дальнейшем белок Spi индуцирует наработку белка DI, который требуется для дифференцировки первичных пигментных клеток. Совместно с белками Spi и Boss он необходим для дифференцировки R7. DI совместно с белком Spi требуется для дифференцировки конусных клеток. Зеленым цветом выделены фоторецепторы R8 и R7, голубым — клетки претерпевающие дифференцировку, синим — дифференцированные клетки (с модификациями из Roignant & Treisman, 2009).

клеткой R8 (рис. 20). Spi индуцирует дифференцировку клеток, непосредственно прилегающих к фотонейрону R8, в результате происходит дифференцировка фотонейронов R2/R5. При анализе расположенных в глазном диске мозаичных клонов клеток, несущих нуль-аллели гена *spi*, было установлено, что районы диска, не содержащие Spi, состоят из фотонейронов только одного типа — клеток R8 (Freeman, 1994b; Tio *et al.*, 1994; Dominguez *et al.*, 1998). Это свидетельствует о

важности данного гена и кодируемого им белка для дальнейшей дифференцировки клеток глаза. В сформировавшихся клетках R2/R5 под контролем ТФ Rough экспрессируется ген *rho* (Freeman *et al.*, 1992) и ген, кодирующий белок-шаперон Star (Heberlein *et al.*, 1993). Совместное действие этих белков приводит к образованию секретлируемой формы белка Spi в клетках R2/R5, который и будет индуцировать дифференцировку соседних недефференцированных клеток в фотонейроны R3/R4 и R1/R6 (Wolff & Ready, 1991; Freeman, 1997). Было установлено, что белок Spi секретруется только клетками R8 и R2/R5 (Freeman, 1994b; Wasserman *et al.*, 2000), остальные клетки будущего омматидия, по-видимому, могут получить Spi только от этих клеток (Roignant & Treisman, 2009). Следует отметить, что тогда как для дифференцировки клеток R2/R5, R3/R4 и R1/R6 необходима активация сигнального пути DER-RTK/Ras1 лигандом Spi, для дифференцировки фотонейрона R7 необходима дополнительная активация другого RTK-рецептора Sevenless (Sev) его лигандом Bride of sevenless (Boss), запускающего тот же Ras1-каскад (Voas & Rebay, 2004).

Было получено много данных, свидетельствующих о том, что для дифференцировки всех типов клеток омматидия не достаточно активации DER-RTK/Ras1 сигнального пути (Freeman, 1996; Hayashi & Saigo, 2001). Другим сигнальным путем, который требуется для правильной дифференцировки клеток омматидия, является сигнальный путь Notch, активируемый белком Delta (Dl) (рис. 20). В развивающемся глазу дрозофилы сигнальный путь Notch контролирует дифференцировку фотонейрона R7, конусных клеток и первичных пигментных клеток (Flores *et al.*, 2000; Tomlinson & Struhl, 2001; Tsuda *et al.*, 2002; Nagaraj & Banerjee, 2007). Нарботка белка Dl зависит от DER-RTK/Ras1-сигнального пути, который стимулирует транскрипцию гена *delta*, обеспечивая удаление из ядра и деградацию репрессора, связанного с транскрипционным фактором Su(H) (Tsuda *et al.*, 2002). Белок Dl является трансмембранным белком, поэтому сигнал может передаваться только клеткам, непосредственно контактирующим с клеткой, на мембране которой находится этот белок (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

Таким образом, в обеспечении формирования неизменного количества фотонейронов в каждом омматидии глаза ключевую роль играет сигнальный путь DER/Ras1 (Freeman, 1997; Iwanami *et al.*, 2005). Негативными регуляторами этого сигнального пути являются белки SPROUTY (STY или SPRY) и ARGOS (AOS). Белок SPRY блокирует передачу сигнала, связываясь с внутриклеточными компонентами Ras1/MAPK-каскада. Белок AOS связывается с белком

Sp1, в результате чего блокируется связывание этого лиганда с рецептором DER (Schweitzer *et al.*, 1995; Casci *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2000; Yusoff *et al.*, 2002; Hanafusa *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2004). Нарушение функции генов *aos* или *spry* приводит к появлению в омматидах мутантов дополнительных фотонейронов. Формирование таких дополнительных фотонейронов происходит из предшественников конусных клеток и так называемых таинственных клеток (mystery cells), обладающих пока еще неопределенными функциями (Wolff & Ready, 1993). У мутантов с нарушенной экспрессией гена *spry* наблюдается в некоторых омматидах как избыток фотонейронов, так и их недостаток. Так у мутантов, гомозиготных по нуль-аллелю *spry*⁴⁵, примерно треть омматидиев содержит больше 6 внешних фотонейронов, тогда как примерно в 20 % омматидиев насчитывается меньшее количество фотонейронов чем в норме (Kramer *et al.*, 1999; Iwanami *et al.*, 2005). Увеличение экспрессии гена *aos* приводит также к формированию меньшего количества фотонейронов в некоторых омматидах (Freeman, 1994a; Sawamoto *et al.*, 1994). Формирование меньшего количества фотонейронов у *spry*-мутантов объясняют увеличением экспрессии гена *aos* в фотонейронах R2/R5. В результате происходит увеличение количества белка Aos, связывающего белок Sp1, который является лигандом рецептора DER. В результате происходит блокировка запуска каскада DER/Ras1 в соседних клетках и отмена их дифференцировки и в результате фотонейронов в омматидах получается меньше (Iwanami *et al.*, 2005).

1.4.4. Генетический контроль дифференцировки клеток омматидия

Важнейшую роль в обеспечении специфичности ответа клеток на поступающие сигналы играет специфическая экспрессия так называемых генов предподготовки в недифференцированных клетках. Продукты генов предподготовки могут совместно с сигнальными путями обеспечивать активацию или репрессию клеточно-специфичных генов и определяют характер дифференцировки клеток.

Геном предподготовки, необходимым для дифференцировки фоторецептора R8, с которого начинается процесс дифференцировки клеток омматидия, является клеточно-специфичный ген *ato* (Jarman *et al.*, 1995). Этот ген первоначально экспрессируется в широкой полосе клеток, расположенных перед морфогенетической бороздкой. При вступлении клеток в морфогенетическую

бороздку экспрессия гена *ato* постепенно пространственно ограничивается и в конце он экспрессируется только в кластере, состоящем приблизительно из 12 клеток. Этот кластер называется пронейронным кластером. В дальнейшем в пределах каждого пронейронного кластера экспрессия гена *ato* продолжает сужаться, пока не ограничится только одной клеткой — фотонейроном R8. Этот процесс зависит от сигнальных путей Notch (Baker, 2000) и Hedgehog (Hh). Белок Hh активирует три негативных регулятора экспрессии гена *ato*: гены *ro*, *Bar* и *daughterless (da)* в клетках, прилегающих к фотонейрону R8 (Dokucu *et al.*, 1996; Dominguez, 1999; Lim & Choi, 2003, 2004; Lim *et al.*, 2008).

Геном подготовки дифференцировки фоторецепторов R1/R6 считается ген *lz*. Ген *lz* изначально экспрессируется в ядрах многих недифференцированных клеток, включая 5-клеточные прекластеры из фотонейронов и окружающие их клетки. После второй волны митозов, во вновь дифференцированных клетках также наблюдается экспрессия гена *lz*, что важно для установления и поддержания программ клеточно-специфической транскрипции (Flores *et al.*, 1998, 2000). Было показано, что в клетках-предшественниках фотонейронов R1/R6, транскрипционный фактор Lz необходим для активации экспрессии гена *BarH1* (Daga *et al.*, 1996). Ген *BarH1* совместно с геном *BarH2* входит в состав локуса *Bar*. Эти гены являются эволюционно консервативными и кодируют схожие по размеру и структуре белки (Kojima *et al.*, 1991; Higashijima *et al.*, 1992). Гены *BarH1* и *BarH2* совместно экспрессируются во многих типах клеток и, по-видимому, имеют одинаковые функции. В глазо-антенальном иммагинальном диске гены *BarH1* и *BarH2* экспрессируются в недифференцированных клетках, располагающихся за морфогенетической бороздкой, а также в дифференцированных клетках, таких как фотонейроны R1/R6, первичные пигментные клетки и в некоторые клетки формирующие щетинку (Higashijima *et al.*, 1992). Анализ мозаичных клонов, состоящих из клеток несущих в гомозиготе делецию локуса *Bar* (*Bar⁻/Bar⁻*), показал необходимость генов *BarH1* и *BarH2* для дифференцировки фотонейронов R1/R6 (Higashijima *et al.*, 1992).

Геном подготовки для дифференцировки фоторецепторов R2/R5 является ген *ro*. Отмечено, что высокий уровень экспрессии гена *ro* наблюдается только в этих клетках (Kimmel *et al.*, 1990). У мутантов по гену *ro* в фоторецепторах R2 и R5 отсутствует белок Ro, однако присутствуют маркеры, в норме наблюдаемые в фоторецепторах R1/R6, R3/R4 и R7 (Heberlein *et al.*, 1991). Поэтому

считается что Ro является ключевым регулятором при определении судьбы клеток R2/R5 (Dokucu *et al.*, 1996).

Ген предподготовки фотонейронов R3/R4 в настоящее время не известен. Однако установлено, что для их дифференцировки требуется белок Seven-up (Svp) (Mlodzik *et al.*, 1990). Экспрессия гена *seven-up* наблюдается на высоком уровне в клетках R3/R4. Однако поскольку он не экспрессируется в недифференцированных клетках, то маловероятно, что он является основным детерминатором судьбы фотонейронов R3/R4.

Геном предподготовки для фотонейрона R7 является ген *lz* (Voas & Rebay, 2004). Белок Lz совместно с белком Pointed — эффектором сигнального пути RTK/Ras1 и белком Su(H) — эффектором сигнального пути Notch связывается с энхансером гена *prospero* (*pros*) и обеспечивает высокий уровень экспрессии данного гена (Kauffmann *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2000). Для поддержания такого высокого уровня экспрессии *pros* требуется отсутствие белка Tramtrak88 (Ttk88), который репрессирует его транскрипцию (Xiong & Montell, 1993). Обычно в фоторецепторах R7 белок Ttk88 подвергается деградации, однако в отсутствие белка Sev, белок Ttk88 стабилизируется и нейронная дифференцировка приостанавливается, что приводит к тому, что клетки, которые должны были стать фотонейронами R7, становятся конусными клетками. Известно, что для обеспечения процесса дифференцировки фотонейрона R7 требуется также белки Spalt major (Salm) и Spalt-related (Salr) (Domingos *et al.*, 2004).

Генами предподготовки при дифференцировке конусных клеток являются гены *lz* и *ttk*. В этих клетках белок Lz, совместно с белком Pointed, активирует экспрессию гена *pros* (Kauffmann *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2000). Такой же процесс наблюдается в фотонейронах R7. Однако для дифференцировки конусных клеток необходим более низкий уровень экспрессии гена *pros*, чем для дифференцировки фотонейронов R7. Это обеспечивается присутствием белка-репрессора Ttk88. Отсутствие нормального белка Ttk88 приводит к трансформации конусных клеток в фотонейроны R7 (Lai *et al.*, 1996).

Геном предподготовки дифференцировки первичных пигментных клеток также вероятно является ген *lz* (Voas & Rebay, 2004). Известно, что для формирования первичных пигментных клеток необходимы продукты генов *spa*, *BarH1* и *BarH2* (Higashijima *et al.*, 1992; Fu & Noll, 1997; Hayashi *et al.*, 1998). У мутантов по гену *spa* многие омматидии теряют одну или две первичные пигментные клетки. Было показано, что у этих мутантов нарушена экспрессия гена *BarH1*

(Fu & Noll, 1997). В то же время эктопическая экспрессия гена *BarH1* в конусных клетках приводит к их трансформации в первичные пигментные клетки (Hayashi *et al.*, 1998). Поскольку известно, что белок Lz участвует в регуляции экспрессии генов *spa* и *BarH1* в конусных клетках и фотонейронах R1/R6, можно предполагать, что и в первичных пигментных клетках белок Lz участвует в регуляции экспрессии этих генов (Voas & Rebay, 2004). Было показано, что белок Lz, совместно с белками Su(H) и Pointed, активирует экспрессию гена *DPax-2*. В свою очередь, белок DPAХ-2 необходим для экспрессии гена *BarH1*, который требуется для дифференцировки первичных ПГК (Higashijima *et al.*, 1992; Fu & Noll, 1997).

Процесс дифференцировки вторичных и третичных пигментных клеток слабо изучен и не выявлены гены предподготовки их дифференцировки. Однако установлено, что в этих клетках экспрессируется ген *lz*. К сожалению, функция его в данных клетках не установлена. Известно, что избыток предшественников вторичных и третичных пигментных клеток удаляется с помощью апоптоза (Cagan & Ready, 1989). В запуске апоптоза этих клеток участвует белок Lz.

Таким образом, ген *lz* является ключевым для дифференцировки многих типов клеток омматидия. Известно, что он участвует в дифференцировке фотонейронов R1, R6 и R7, а также в дифференцировке конусных и первичных пигментных клеток (Batterham *et al.*, 1996; Daga *et al.*, 1996). Ген *lz* экспрессируется в недифференцированных клетках-предшественниках данных клеточных типов, а также в предшественниках вторичных и третичных пигментных клеток. В дальнейшем процессе дифференцировки всех этих типов клеток экспрессия гена *lz* в них сохраняется. Однако в период 30–40 часов после окукливания ген *lz* экспрессируется уже только во вторичных и третичных пигментных клетках (Flores *et al.*, 1998).

В настоящее время данных о регуляции экспрессии гена *lz* не много. Известно, что в процессе регуляции его экспрессии в глазу дрозофилы, важное значение имеет глазоспецифичный энхансер, расположенный во втором интроне данного гена (Flores *et al.*, 1998). Были получены данные, свидетельствующие о том, что белки *Sine oculis* и *Glass* необходимы для обеспечивающими функционирование данного энхансера (Canon & Banerjee, 2003). Существуют также данные о том, что белок *Yan* репрессирует активность гена *lozenge* в глазу дрозофилы, взаимодействуя с регуляторными последовательностями расположенного в интроне энхансера (Behan *et al.*, 2002). Однако, было показано, что сайты

связывания белка Yan в гене *lozenge* находятся за пределами минимального глазо-специфического энхансера (Canon & Banerjee, 2003).

Заключение

Из представленного выше следует, что, несмотря на то, что до начала наших работ имелись некоторые сведения о влиянии ТФ GAGA на формирование половой системы самок и формирование глаза дрозофилы, эти данные были незначительны. Так полностью отсутствовала информация о причинах стерильности самок *Trl*-мутантов. Из данных, приведенных в работе Бхата и соавторов (Bhat *et al.*, 1996) можно было сделать вывод о том, что причиной гибели потомства самок, гомозиготных по мутации *Trl*^{l3c} являются нарушения митозов в ходе эмбриогенеза дрозофилы. Однако ненормальный фенотип яиц, отложенных самками, заставляет предполагать, что у этих самок есть проблемы и с оогенезом. Процесс оогенеза является сложным и многоэтапным, поэтому нам представляется важным отследить все этапы оогенеза *Trl*-мутантов, для того чтобы выделить те стадии, которые наибольшим образом зависят от ТФ GAGA. При рассмотрении влияния GAGA на формирование глаза дрозофилы Дос-Сантос с соавторами выделил несколько типов клеток, функционирование которых нарушено у *Trl*-мутантов. Однако не были выявлены причины этих нарушений, т. е. не было показано нарушение экспрессии каких генов может быть причиной тех или иных дефектов при формировании глаза мутантов. Поэтому было бы интересно провести более детальный анализ нарушений формирования глаза у мутантов, чтобы выяснить какие гены, ответственные за этот процесс, могут быть предполагаемыми генами-мишенями ТФ GAGA. И наконец, совершенно отсутствовали данные о влиянии ТФ GAGA на развитие половой системы самцов. Однако этот процесс имеет много общего с развитием половой системы самок, поэтому нам представляется целесообразным исследовать развитие половой системы самцов на фоне недостатка белка GAGA.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы, использованные в работе

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: α -[P³²] дезоксинуклеозидтрифосфаты (α -[³²P]-дАТФ) — «Изотоп» (Свердловск); рентгеновская пленка («AGFA», Бельгия); Трис-(гидроксиметил)-аминометан (Трис), диэтилпиروкарбонат (DEPC), бромистый этидий, акриламид 2х-кристаллизованный, NN-метиленабисакриламид, дитиотрейтол (DTT), EGTA, какодилат натрия («Sigma», США); MgCl₂, CaCl₂, ацетат калия, KCl, NaCl, фенол, NaOH, цитрат Na, глутаральдегид, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, K₄[Fe(CN)₆], K₃[Fe(CN)₆], борная кислота, изопропанол («Реахим», Россия); хлороформ («Мосреактив», Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), додецилсульфат натрия (SDS), сахароза, Ficoll 400 («Pharmacia», США); агароза, гепарин («Chemapol», Чехословакия); ДЕАЕ-81 бумага — «Wahntman» (Англия); бромфеноловый синий, ДНК спермы лосося, Tween 20 (Serva, Германия); (NH₄)₂SO₄, 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид (X-gal) («Fluka», Швейцария); «Gel Purification kit», реактив «TRIzol» («Invitrogen», Швейцария); дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ) («СибЭнзим», Россия); «DNA labeling Kit Version 2.0» (ICN, США); DAPI («Molecular Probes»/«Invitrogen», Швейцария); фаллоидин, меченый Alexa-488 или Alexa-568 («Molecular Probes»/«Invitrogen», Швейцария); BigDye Terminator Ready Mix v.3 («Applied Biosystems», США).

Ферменты: Taq ДНК-полимераза («БиоСан», Россия); Proteinase K, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E.coli*, эндонуклеазы рестрикции («СибЭнзим», Россия), ДНКаза I, без РНКаз, обратные транскриптазы «RevertAid Premium» и «RevertAid H Minus» («Thermo Fisher Scientific», США).

Антитела:

- 1) anti-lozenge («Developmental Studies Hybridoma Bank» (DSHB));
- 2) anti-Bar;
- 3) anti-VASA («Santa Cruz Biotechnology», США);
- 4) поликлональные anti-GAGA (любезно предоставлены проф. В. Пироттой, Женевский Университет, Швейцария);

2.2. Олигонуклеотиды используемые в работе

Олигонуклеотидные праймеры, использованные для ПЦР и секвенирования ДНК, были разработаны с использованием свободно-распространяемой программой PRIMER-MASTER 1.0 (Proutski & Holmes, 1996; <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/dos/Primer-master/>) и синтезированы В. Ф. Кобзевым (ИЦиГ СО РАН):

Праймеры к гену *Trl*:

3191down — ctccttctcctcaattctaaattcg; **2'7_1** — atgtgttttcatccgtgaagtcg;
ex2_1ev — caattgtgcgctgccatgg; **2088up** — caactggtctctcgcctctctcc;
2088down — gttcggtcgacagaaaagtg; **pr_1'6** — ttgagcgaagtttgctgtta;
3184up — ccgcattgggtcccggttcttttg; **3184down** — tctgcaagagtcgaaaagtacaag;
pr_1'8 — catccaacatttctcttggtctg; **4'3_1** — gtatcgagtgcgtgggtgtag;
ex5_2ev — ggcaagtagcaggtgttc; **ex6b_1** — gttcaatccctgcacactttacag;

Праймеры к концам *P*-элемента:

Pry4 — caatcatatcgctgtctcactca; **phsneo_b** — ttctctcaacaagcaaacgtgc.

Праймеры к последовательности гена *rpl19*:

rpl19_1 5'-aaggtctggttgatccca-3'; **rpl19_2** 5'-acaatatggagttcctcgactag-3'.

Праймеры, соответствующие последовательности гена *lozenge*:

lz-dir1 5'-acaataacaacgccg-3'; **lz-rev1** 5'-tactgatatgtctgatagccattc-3';
lz-dir3 5'-tattgtggatggagcgattgg-3'; **R7** 5'-aactcgaggatccatttgc-3'.

Праймеры к гену *dpp*:

dpp-F1 5'-actcggtaacatccccaag; **dpp-R1** 5'-gaagtgcagccgaaaccg

Праймеры к гену *jaguar*:

jar-F1 5'-gatcaagctgcgtaatcgaatca-3'; **jar-R1** 5'-cgattgtcttgagggtgttagt-3'.

Праймеры к гену *Delta*:

Delta-F1 5'-cctggcatgatacgaacaacag-3'; **Delta-R1** 5'-gacttgctcgtcttccattcgg-3'

Праймеры к гену *rpl32*:

RPL32-F1 5'-ctaagctgtcgcacaaatgg-3'; **RPL32-R1** 5'-aggaacttcttgaatccggtg-3'

Праймеры к гену *robl*:

robl-F1 5'-tagtgtctgccgtgttccaac-3'; **robl-R1** 5'-gtggatttgaccggaataccttc-3'

Праймеры к гену *FoxK*:

FoxK-F1 5'-ccagtcacatggataattcgcg-3'; **FoxK-R1** 5'-tggtgtgcattttgtgagttgta-3'

Праймеры к гену *Rap2l*:

Rap2l-F1 5'-tcttggaatattggacaccgc-3'; **Rap2l-R1** 5'-ttgttcgcgactagtaggatg-3'

2.3. Линии *Drosophila melanogaster*, использованные в работе

- 1) *Trl*^{R85} (*yw**; *Df(3L)Trl*^{R85}/*TM3*, *Sb Ser y*⁺) — нуль-аллель гена *Trl* (Farkas *et al.*, 1994), любезно предоставлена Ф. Каршем (Женевский Университет), получена в результате неточной эксцизии Р-транспозона из линии *Trl*^{l3C}.
- 2) *Trl*^{R67} (*yw**; *Df(3L)Trl*^{R67}/*TM3*, *Sb Ser y*⁺) — нуль-аллель гена *Trl* (Farkas *et al.*, 1994), любезно предоставлена Ф. Каршем (Женевский Университет), получена в результате неточной эксцизии Р-транспозона из линии *Trl*^{l3C}.
- 3) *EP(3)3184* (*w*^{l118}; *Trl*^{EP(3)3184}/*TM6B*, *Tb*^l) — гипоморфная мутация гена *Trl*, обусловленная встройкой транспозона во второй интрон гена, получена из Сегедского центра линий, Венгрия.
- 4) *l(3)s2325* (*w*^{l118}; *P{w⁺mC=lacW}* *Trl*^{s2325}/*TM3*, *Sb Ser y*⁺) — нуль-аллель гена *Trl*, получена из центра линий, Блумингтон (США).
- 5) *Trl*^{en82} (*w*^{l118}; *Trl*^{en82}/*TM3*, *Sb*¹*Ser y*⁺) — получена М. А. Волошиной, ИЦиГ СО РАН. Гипоморфная мутация, обусловленная встройкой *P*-элемента длиной 1,4 т. п. н. в 5'-область гена *Trl* (Огиенко *и др.*, 2008а). Несет делецию в 6 экзоне (6 нуклеотидов), которая не нарушает рамки считывания, удаляя два глутаминовых кодона.
- 6) *Trl*³⁶² (*w*^{l118}; *Trl*³⁶²/*TM3*, *Sb Ser y*⁺) — гипоморфная мутация, представляет собой встройку *P*-элемента *P{lacW}* (в позиции 2979) и прилегающую к нему делецию 97 п. н. (координаты 2979–3076). Получена А. А. Огиенко в лаборатории механизмов клеточной дифференцировки, ИЦиГ СО РАН (Огиенко *и др.*, 2006);
- 7) *Trl*^{362(ex)} (*w*^{l118}; *Trl*^{362(ex)}/*TM3*, *Sb Ser y*⁺) — гипоморфная мутация, получена путём удалением *P*-элемента из мутации *Trl*³⁶², и несет такую же делецию как и исходная линия. Получена А. А. Огиенко в лаборатории механизмов клеточной дифференцировки, ИЦиГ СО РАН (Огиенко *и др.*, 2008б);
- 8) *Trl*^{ex(15)} (*w*^{l118}; *Trl*^{ex(15)}/*TM3*, *Sb Ser y*⁺) — гипоморфная мутация, обусловлена делецией в 5'-некодирующую область гена *Trl* длиной примерно

- 1,5 т. п. н. Получена А. А. Огиенко в лаборатории механизмов клеточной дифференцировки, ИЦиГ СО РАН (Dorogova *et al.*, 2014);
- 9) Trl^{l-72} (w^{1118} ; $Trl^{l-72}/TM3$, $Sb Ser y^+$) — гипоморфная мутация, обусловлена делецией примерно 700 п. н. во втором интроне гена (Федорова *и др.*, 2006). Получена в лаборатории механизмов клеточной дифференцировки, ИЦиГ СО РАН.
 - 10) lz^{ts1} — гипоморфная мутация гена lz , любезно предоставлена проф. В. Родригес (Институт фундаментальных исследований, Индия).
 - 11) lz^K — гипоморфная мутация гена lz , получена из центра линий Блумингтон.
 - 12) Линия #8785 ($y^l w^*$; $sax^5/SM6a$) — мутация по гену sax , вызванная однонуклеотидной заменой, приводящей к замене аминокислоты (Twombly *et al.*, 2009). Получена из центра линий Блумингтон.
 - 13) Линия #5404 ($y^l w^*$; $P\{FRT(w^{hs})\}Gl3 sax^4/SM6a$) — мутация sax^4 представляет собой однонуклеотидную замену (Twombly *et al.*, 2009). Летальна в сочетании с аллелями sax^3 , sax^5 , sax^6 . Получена из центра линий Блумингтон.
 - 14) Линия #11921 (w^{67c23} $P\{lacW\}Act5C^{G0177}/FM7c$) — гипоморфная мутация по гену $Actin5C$. Получена из центра линий Блумингтон.
 - 15) Линия #8776 ($Df(3R)jar^{322}$) — гипоморфная мутация по гену $jaguar$. Получена из центра линий Блумингтон.
 - 16) Линия #7247 (w^* ; $P\{wA^R\}jar^{1646}/TM3$, $Sb Ser y^+$) — гипоморфная мутация по гену $jaguar$. Получена из центра линий Блумингтон.
 - 17) $\Delta 2-3$ ($\Delta 2-3/CyO$; $ru h th st$) синтезирована Е. И. Волковой ИМиКБ СО РАН.
 - 18) yw ($y^l Df(1)w^{67c23}$) получена из фонда лаборатории И. Ф. Жимулева, ИМиКБ СО РАН.
 - 19) $hsp83:GAGA-519-2$ и $hsp83:GAGA-581-12$ — транспозоны, экспрессирующие кДНК гена Trl , любезно предоставлены проф. П. Шедлом (Принстонский Университет, США; Greenberg & Schedl, 2001)
 - 20) $\Delta 2-3(99B)$ (yw ; $Ki P[ry^+ \Delta 2-3]99B$) (Robertson *et al.*, 1988), несет источник транспозазы в третьей хромосоме.
 - 21) *Oregon R* — дикий тип, из фонда лаборатории.

Полное описание генетических маркеров приведено во FlyBase (<http://flybase.org>).

Мух выращивали на стандартной среде (агар-агар 32 г, дрожжи сухие 120 г, крупа манная 180 г, сахар 180 г, 5 л воды; ампицилин 0,5 таблетки на литр среды; нипагин 4 мл на литр среды), при температуре 25 °С. Особые условия содержания оговариваются отдельно.

2.4. Анализ жизнеспособности дрозофил

Анализ жизнеспособности проводили при 25 и 29 °С. Для этого скрещивали гетерозиготных самок Trl^0/Bal с самцами M/Bal , где M — анализируемая мутация, Trl^0 — нуль-аллель, Bal — балансерная хромосома. Родителей скрещивали, помещая по 20 самок и 10 самцов в молочные бутылки со стандартной питательной средой. Через 8–14 ч родителей удаляли и подсчитывали общее количество отложенных яиц. Доля яиц с генотипом M/Trl^0 в соответствии с Менделевским расщеплением должна составлять 25 %. Сравнивали число вылетевших мух с рассчитанным числом отложенных яиц этого же генотипа. Каждый опыт повторялся по 2–3 раза. Ошибка выборочного среднего считалась по формуле $Sr = (pq/n)^{1/2}$, где n — численность выборочной совокупности, а p и q — выборочные статистические параметры.

2.5. Получение мутаций, затрагивающих 5'-область гена *Trl* с помощью неправильных эксцизий

На первом этапе получения мутаций, самок, несущих P -элементную вставку в 5'-области гена *Trl* ($M/Балансер$, где M мутация гена), скрещивали с самцами линии $uw; Ki P[ry^+ \Delta 2-3]99B$, содержащими источник транспозазы в третьей хромосоме (Robertson *et al.*, 1988). Эксцизия P -элемента проходила в зародышевых клетках самцов генотипа: $uw; M/Ki P \Delta 2-3$.

На втором этапе самцов генотипа $uw; M/Ki P \Delta 2-3$ скрещивали с самками исходной линии. Потомки этого скрещивания составляли регулярное и нерегулярное потомство. Регулярное потомство генотипа $uw; M/TM3, Sb Ser y^+$ несет вставку P -элемента, которая обеспечивает цвет глаз мух (оранжевые глаза). У нерегулярного потомства генотипа $uw; M^{(ex)}/TM3, Sb Ser y^+$ P -элемент отсутствует полностью или частично, в результате глаза этих мух белые. Далее проводили индивидуальное скрещивание белоглазых самцов с самками исходной линии для выведения в чистую линию.

2.6. Введение трансгенов, экспрессирующих кДНК гена *Trl*, в геном мутантных мух

Для введения трансгенов *hsp83:GAGA-519* и *hsp83:GAGA-581* (вторая хромосома) в геном *Trl*-мутантов (третья хромосома) виргинных самок генотипа *uw; M/TM3, Sb Ser y⁺*, где *M* — анализируемая мутация по гену *Trl*, скрещивали с самцами 4-х балансерной линии генотипа *uw; CyO/If; MKRS/TM6B, Tb*. Параллельно виргинных самок 4-х балансерной линии скрещивали с самцами генотипа *w; hsp83:GAGA*. В дальнейшем потомков этих двух скрещиваний генотипов *+ / CyO; M / MKRS* и *hsp83:GAGA / CyO; + / TM6B, Tb* скрещивали между собой и отбирали потомков генотипа *hsp83:GAGA / CyO; M / TM6B, Tb*. Мух выводили в линию и использовали в экспериментах по спасению мутантного фенотипа *Trl*-мутантов для того, чтобы доказать, что данное нарушение обусловлено именно недостатком белка GAGA.

2.7. Выделение ДНК

Выделение геномной ДНК осуществляли по методике (Bender *et al.*, 1983), с небольшими модификациями. Дрозофил (1–3 особи) гомогенизировали в лизирующем буфере (0,1 М NaCl, 0,2 М сахароза, 0,1 М Трис, 0,05 М ЭДТА, 0,5 % SDS, 0,2 % DEPC). Полученную смесь инкубировали в течение 30 минут при температуре 65 °С. Далее добавляли 300 мкл 5 М ацетата калия и выдерживали на льду в течение 30 мин. После этого центрифугировали на центрифуге Eppendorf-5415C при 10 тыс. об/мин в течение 5 мин, супернатант переносили в новую пробирку и осаждали ДНК с помощью равного объема 95 % этанола в течение 5 мин. Осадок ДНК промывали 70 % охлажденным этанолом, подсушивали на воздухе и растворяли в воде.

2.8. Секвенирование ДНК с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator Ready Mix

Метод основан на использовании в качестве терминаторов репликации дидезоксинуклеотидов, меченных флуоресцентными красителями BigDye. В 10 мкл реакционной смеси содержащей 50–100 нг ДНК, 1 мкл 5× готового реакционного буфера, 2–4 пмоль праймера и 2 мкл готовой смеси реагентов BigDye Terminator

Ready Mix v.3. **Условия реакции:** 30 с — 94 °С (денатурация), 20 с — 55 °С (отжиг праймера и элонгация), 2 мин при 60 °С. Всего 25 циклов. По окончании реакции проводили очистку полученных продуктов от не включившихся меченых дидезоксинуклеотидов осаждением изопропанолом (к 10 мкл смеси добавляли 30 мкл 100 %-изопропанола и 10 мкл воды). Инкубировали в течение 15 мин, а затем центрифугировали 15 мин при 14 тыс. об/мин на центрифуге Eppendorf-5415C. Супернатант удаляли, а осадок сушили 1 мин при 95 °С. Последующий анализ образцов осуществлялся на автоматическом секвенаторе ABI-PRISM310A сотрудниками межинститутского центра секвенирования.

2.9. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили в 20 мкл смеси, содержащей 1×ПЦР буфер (16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 65 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 0,05 % Tween 20), 0,2 мМ дНТФ; 1,5 мМ MgCl_2 , праймеры 0,5 пмоль/мкл, Taq-полимераза 1 е. а. (БиоСан, Россия), ДНК-матрица 0,05–0,1 мкг. Условия ПЦР включали исходную денатурацию ДНК при 94 °С в течение 3 мин, с последующей амплификацией (25–35 циклов): денатурация при 94 °С — 30 с, отжиг праймеров при требуемой для каждого из праймеров температуре в течении 40 с, элонгация при 72 °С в течении требуемого для каждого конкретного случая времени. После амплификации следовала финальная элонгация при 72 °С в течение 10 мин.

2.10. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 0,8–2 % агарозном геле, приготовленном на 0,3×TBE буфере (1×TBE: 8,9 мМ Tris-HCl, 8,9 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА). Образцы ДНК перед нанесением смешивали с 1/5 объема буфера для нанесения пробы (0,25 % бромфенолового синего, 15 % фикола). Гель окрашивали в растворе бромистого этидия в воде (0,5 мкг/мл). Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли в ультрафиолетовом свете (254 нм).

2.11. Выделение РНК

Выделение РНК из целых особей или из органов дрозофилы проводили с использованием реагента TRIzol согласно рекомендациям изготовителя. Материал гомогенизировали в 150 мкл TRIzol и выдерживали 5 мин при комнатной температуре (КТ). После этого в раствор добавляли хлороформ, тщательно перемешивали и оставляли на 2 мин при КТ. Смесь центрифугировали (10^4 g) в течение 15 мин при 4 °С. Верхнюю, водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли равный объём изопропанола и 10 мин выдерживали на льду. Образец снова центрифугировали при той же скорости в течении 10 мин при 4 °С. Осадок промывали 75 % этанолом, подсушивали и растворяли в воде. Образцы РНК хранили при –80 °С.

2.12. Получение ^{32}P -меченых ДНК-зондов

^{32}P -меченые ДНК-зонды получали с помощью набора для мечения ДНК версии 2.0 фирмы «ICN» в соответствии с рекомендациями изготовителя. ДНК смешивали с реакционным буфером, случайным декануклеотидным праймером и деионизированной водой. Денатурацию ДНК проводили в кипящей водяной бане в течение 5–10 мин, а затем охлаждали на льду. В эту же пробирку добавляли меченный трифосфат α - ^{32}P -дАТФ, смесь остальных немеченых нуклеотидов, и фрагмент Кленова, инкубировали в течение 5 мин на 37 °С. Затем добавляли немеченые дНТФ (4 мкл) и инкубировали смесь еще 5 мин при 37 °С. Останавливали реакцию добавлением 2 мкл 0,5 М ЭДТА (рН 8,0).

2.13. Гибридизация *in situ* на гистологических срезах

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

Кратко: материал фиксировали в 96 % спирте, охлажденном до –70 °С в течение 4 суток. Затем материал проводили через несколько смен 96 % этанола, постепенно повышая температуру спирта до КТ. Затем материал проводили через серию смесей этилового спирта и бутанола с последующей заливкой в парафин. Материал нарезался и прикреплялся к стеклу. В таком виде материал может храниться при КТ в течение длительного времени. Перед приготовлением материала к гибридизации парафин удаляется с помощью смесей ксилола и этанола. Гибридизация велась в течение 12–14 ч при 37 °С. В гибридизационную

смесь (формаид, декстран сульфат, NaCl, Трис-HCl, ЭДТА) добавляли меченый изотопом ^{33}P зонд и тотальную дрозофилиную РНК для подавления неспецифической гибридизации. После процедур отмывок наносилась фотоэмульсия. Препараты экспонировались в течение 4–30 дней. Анализ вели с помощью светового микроскопа.

2.14. Нозерн-блот гибридизация

Нозерн-блот-гибридизацию проводили по методике, предложенной Бурнетом (Burnett, 1997) с модификациями (Karagodin *et al.*, 2013). 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). Пробы, использованные в работе представлены на рис. 21.

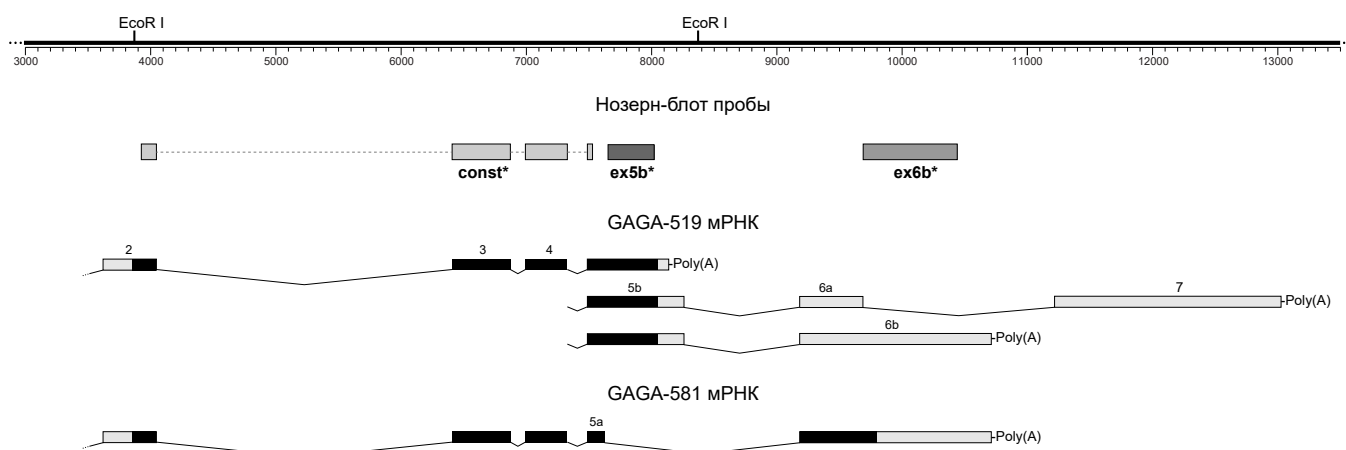


Рис. 21. Пробы, использованные для Нозерн-блот гибридизации. Пробы показаны под координатной линейкой тремя оттенками серого цвета. Ниже представлены варианты мРНК гена *Trl*, кодирующие изоформы белка GAGA-519 и GAGA-581. Кодирующие участки экзонов показаны черным цветом, некодирующие — светло-серым. Проба общая для всех форм мРНК (const*) содержит часть 2, 3, 4 и часть 5 экзона гена. Экзон-специфичные пробы ex5b* и ex6b* выявляют мРНК, содержащие в своем составе варианты экзонов 5b и 6b соответственно.

2.15. Обработка РНК ДНКазой I

Реакционную смесь объемом 100 мкл, содержащую 50–100 мкг суммарной РНК, 1× реакционный буфер (10 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 2,5 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ CaCl_2) и 5 е. а. ДНКазы I, свободной от РНКаз инкубировали 30 мин при 37 °С. Далее добавляли 10 мкл 50 мМ ЭДТА и инактивировали фермент 10 мин

при 65 °С. РНК очищали с помощью набора реагентов CleanRNA Standard («Евроген», Россия), согласно рекомендациям изготовителя. Оптическую плотность полученного раствора РНК на длинах волн 260 и 280 нм определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop («Thermo Fisher Scientific», США). Полученные данные использовались для расчета концентрации РНК, а также для оценки чистоты РНК в образцах ($D_{260}/D_{280} > 2,1$ при отсутствии ДНК).

2.16. Обратная транскрипция (ОТ)

Для синтеза кДНК брали 5 мкг суммарной РНК и 150 пкмоль oligo(dT)_{15-18} праймера и нагревали смесь в течении 5 мин при 65 °С. Смесь затем охлаждали во льду и добавляли 5× реакционный буфер (250 мМ Трис-НСl рН 8,3), 375 мМ КСl, 15 мМ MgCl_2 , 50 мМ DTT) до 1× концентрации. В смесь добавляли дНТФ до концентрации 0,5 мМ каждого и 200 е. а. «RevertAid Premium» обратной транскриптазы. Финальный объем реакционной смеси 20 мкл. Смесь инкубировали при 50 °С в течение 30 мин.

2.17. Полногеномный анализ экспрессии с использованием микрочипов

Подготовка проб

Для проведения обратной транскрипции реакционную смесь объемом 18 мкл, содержащую 10–20 мкг суммарной РНК, выделенной из яичников дрозофилы, и 200 пмоль праймера oligo(dT)_{20} VN и нагревали 2 мин при 65 °С, охлаждали на льду и добавляли 5× реакционный буфер (250 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 250 мМ КСl, 20 мМ MgCl_2 , 50 мМ DTT) до 1× концентрации, смесь дНТФ (дАТФ, дГТФ, дСТФ) до концентрации 0,5 мМ каждого, аминоаллил-дУТФ до концентрации 0,2 мМ, дТТФ до концентрации 0,15 мМ и 200 е. а. «Revert-Aid H Minus» обратной транскриптазы, суммарный объем смеси составлял 40 мкл. Полученную смесь инкубировали 2 ч при 42 °С. К смеси добавляли 2 мкл H_2O , 8 мкл 1 N NaOH и нагревали 10 мин при 65 °С для гидролиза РНК. Реакцию останавливали добавлением 8 мкл 1 N HCl и 4 мкл 1 M Трис-НСl (рН 7,6). Полученную кДНК очищали с помощью набора «QIAquick PCR Purification Kit» («Qiagen», США), используя вместо фирменного раствора при промывке колонок 75 % этанол. Осаждали кДНК, добавляя к раствору $\frac{1}{10}$ объема 3 M ацетата натрия (рН 5,5), $\frac{1}{20}$ объема 200 мкг/мл линейного полиакриламида

и 1 объем изопропанола. Выдерживали 2 ч при -20°C и центрифугировали при 4°C на 14 тыс. g 10 мин, супернатант удаляли, промывали осадок 200 мкл 75 % этанола и подсушивали на воздухе. Высушенную кДНК растворяли в 5 мкл воды.

Введение метки в пробы для гибридизации

Пробы, содержащие аминокислоты были помечены флюоресцентными красителями, причем для контроля и для мутантов были использованы красители, имеющие разные спектральные характеристики. В работе были использованы сукцинимидные активированные эфиры красителей Alexa-555 и Alexa-647 (#A32755, «Thermo Fisher Scientific», США). Для введения метки к 5 мкл раствора кДНК добавляли 3 мкл 0,3 М раствора NaHCO_3 и 2 мкл раствора активированного эфира красителя в DMSO, приготовленного согласно рекомендациям изготовителя. Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали 1 ч при КТ в темноте. Добавляли к смеси 90 мкл H_2O и очищали пробы с помощью набора «QIAquick PCR Purification Kit» («Qiagen», США). Пробы концентрировали осаждением изопропанолом как описано выше. Подсушенный осадок растворяли в 2 мкл H_2O .

Гибридизация

Для гибридизации использовались олигонуклеотидные микрочипы «14K (v. 2)» («Canadian Drosophila Microarray Centre», Канада). Смешивали 60 мкл раствора для гибридизации ($5\times\text{SSC}^1$, 0,5 % SDS, 50 % формамид, $5\times$ раствор Денхардта², 150 мкг/мл ДНК из спермы лосося, 150 мкг/мл дрожжевой tРНК) с обоими пробами и денатурировали пробы нагреванием 2 мин при 65°C , охлаждали до 37°C и наносили на чип. Покрывали чип кусочком парафильма и гибридизовали 18 ч при 37°C . После гибридизации отмывали чип в 50 мл пробирке 40–45 мл отмывочного раствора по следующей схеме:

- 1) $2\times\text{SSC}$, 0,1 SDS — 37°C , 5 мин;
- 2) 2 раза $2\times\text{SSC}$, 0,1 SDS — КТ, 5 мин;
- 3) 2 раза $1\times\text{SSC}$, 0,1 SDS — КТ, 2 мин;
- 4) $0,1\times\text{SSC}$ — КТ, 1 мин.

Чип высушивали центрифугированием при 300 g в течении 5 мин на центрифуге с бакет-ротором.

1 Состав $20\times\text{SSC}$: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0.

2 Состав раствора Денхардта ($50\times$): 1 % фикоил, 1 % поливинилпирролидон, 1 % BSA.

Сканирование чипов и обработка результатов

Чипы после гибридизации сканировали на конфокальном сканере микрочипов «ScanArray Lite» («PerkinElmer», США, ЦКП функциональной геномики ИЦиГ СО РАН) на двух длинах волн (543 и 633 нм). Для сканирования и первичной обработки использовалось программное обеспечение «ScanArray Express» v. 2.0 («PerkinElmer», США). Было выполнено три независимых эксперимента по гибридизации. Полученные результаты обрабатывались с использованием пакета limma из пакета программ Bioconductor (<https://bioconductor.org>).

2.18. ПЦР в «реальном времени»

Количество транскриптов определяли с помощью ПЦР с использованием системы CFX96 Touch™ Real-Time PCR (Bio-Rad, США) и набора реагентов БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия), согласно рекомендациям изготовителя. Было сделано 2 независимых эксперимента. В качестве внутриннего контроля были использованы гены *rpl32*, *robl*, *FoxK*, *Rap2l*. Первичные данные анализировались в программе CFX Manager™ Software (Bio-Rad, США), математическая обработка выполнялась в Microsoft Excel.

2.19. Вестерн-блот-анализ

Анализируемый материал гомогенизировали в буфере (1 % SDS, 2 % β-меркаптаэтанол, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА) и нагревали 5 мин при 98 °С, охлаждали до КТ и добавляли 1/5 объема буфера для нанесения (1 % SDS, 2 % β-меркаптаэтанол, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА, 0,25 % бромфеноловый синий, 60% глицерин). Разделение белков проводили с помощью электрофореза в 7 % полиакриламидном геле (акриламид к бисакриламиду 1:40) в 1×TGSB (50 мМ Трис, 384 мМ глицин, 0,1 % SDS). Перенос белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану LKB производили с использованием блоттера TransBlot (BioRad, USA) в 0,5×TGSB с добавлением 20 % метанола. Полученный блот инкубировали в течение 30 мин в 2 % растворе сухого молока в 1×PBS. Далее проводили трехкратную отмывку (по 5 мин каждая) в 1×PBS. После этой обработки мембрану 1 ч инкубировали в присутствии первичных антител против анализируемого белка, разведенных до требуемой концентрации в растворе PBST (1×PBS, 0,1 % Tween-20, 0,5 % сухого молока). После трехкратной отмывки (по 5 мин каждая) в буфере PBST мембрану инкубировали 1 ч в растворе вторичных антител. Затем

блот отмывали PBST три раза по 5 мин. Детекцию белков проводили как описано в работе Якунина и Хэлленбэка (Yakunin & Hallenbeck, 2002). Блот заливали раствором, содержащим: 50 мМ глицин-NaOH (pH 9,6), 0,2 мМ люминол, 4 мМ п-йодфенол, 18 мМ H₂O₂. После смачивания мембраны хемилюминесцентный сигнал снимали с помощью прибора Chemi Doc XR+ (BioRad, USA). Обработку полученных данных проводили в программе Gel Pro 4.0. В качестве маркеров молекулярного веса использовались белки РНКазы А (15 кДа), овальбумин (45 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа). Детекцию маркеров проводили с помощью раствора красителя Ponceau S (Sigma, USA) в 10 % уксусной кислоте.

2.20. Иммунохимическое окрашивание тканей дрозофилы

Окрашивание проводили по методу, описанному в статье (Bonaccorsi *et al.*, 2000). Материал выделяли в растворе EBR (Ephrussi Beadle Ringer) (130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES, pH 6,9) при 0 °C и затем фиксировали в 3,7 % растворе формальдегида в 1×PBS 15 мин при комнатной температуре. Далее органы промывали 3 раза (по 15 мин) раствором 1×PBS. После чего блокировали в растворе 5 % сухого молока в PBT (1×PBS, 0,3 % Triton X-100, 0,5 % бычьего сывороточного альбумина) в течение 2 ч при комнатной температуре. После этого органы отмывали PBT и инкубировали с первыми антителами, разведенными в PBT, в течение ночи при +4 °C. Далее органы промывали раствором PBT три раза и отмывали им же 4 раза по 15 мин. После отмывки инкубировали с вторичными антителами, разведенными в PBT, в течение 2 часов в темноте при комнатной температуре. Отмывку проводили в PBT в течение ночи при +4 °C.

2.21. Окрашивание яичников дрозофилы с помощью фаллоидина

Изолированные в 1×PBS яичники фиксировали в течение 20 мин при КТ в свежеприготовленном 4 % растворе формальдегида в 1×PBS, а затем еще 20 мин в этом же растворе, содержащем 0,1 % Triton X-100. Затем яичники окрашивали в течение 20 мин в растворе, содержащем: 4 % формальдегид, 0,1 % Triton X-100, 1 мкМ фаллоидин, меченый Alexa-488 (Molecular Probes) в 1×PBS (Guild *et al.*, 1997). После этого яичники отмывали в растворе 1×PBS и раскладывали на стекла в 50 % глицерин, разведенный 1×PBS с добавлением DAPI.

2.22. Приготовление препаратов для электронной микроскопии

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

2.23. Приготовление полутонких срезов глаз дрозофилы

Головы мух разрезали сагиттально, фиксировали в растворе 1 % глютаральдегида и 1 % формальдегида в 1×PBS в течение одного часа. После промывки в 1×PBS в течение 5 мин проводили постфиксацию в 1 % растворе OsO₄ в 1×PBS в течение 1 ч. После фиксации образцы промывали дистиллированной водой три раза по 5 мин и контрастировали в 1 % растворе уранилацетата в дистиллированной воде при температуре 4 °С в течении 8 ч. Далее проводили дегидратацию образцов в серии спиртов возрастающей концентрации с последующей пропиткой образцов смолой Agar 100 по стандартному протоколу (Batterham *et al.*, 1996). Полимеризацию проводили в течение двух суток при 60 °С. Срезы толщиной 0,5 мкм получали с помощью ультрамикротомы «Ultracut» фирмы Reichert-Jung (Австрия). Срезы переносили в каплю воды на предметном стекле и высушивали. Для окраски срезов использовали 1 % раствор толудинового синего в 1 % тетраборате натрия. Анализ срезов глаз проводили на микроскопах «Axioscope 2 plus» в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН. Анализ поверхности глаз проводили на сканирующем электронном микроскопе «TM-1000 Tabletop» (Hitachi) в центре коллективного пользования ЦСБС СО РАН.

2.24. Приготовление препаратов хромосом слюнных желез дрозофилы для световой микроскопии

Слюнные железы извлекали из личинок 3-го возраста в физиологическом растворе Эфрусси-Бидла (7,5 г NaCl, 0,35 г KCl, 0,21 г CaCl₂ в 1 л дистиллированной воды). Затем железы фиксировали в капле 45 % уксусной кислоты в течение 3–5 мин, и раздавливали под покровным стеклом. Препараты анализировали под микроскопом с фазовоконтрастным устройством. Идентификацию районов хромосом проводили с помощью фотографических карт Лефевра и рисованных карт Бриджеса (Lefevre, 1976).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Впервые картина экспрессии гена *Trl* была исследована в работе Соллера и соавторов в 1993 году (Soeller *et al.*, 1993). Методом Нозерн-блот гибридизации с использованием РНК, выделенной из целых особей, авторы показали, что данный ген экспрессируется на всех стадиях эмбриогенеза, в личинках, предкуколках и имаго дрозофилы. Однако такой подход не позволяет определить экспрессию в отдельных органах и тканях. Поэтому в нашей работе, опубликованной в том же 1993 году, мы применили другие подходы — а именно гибридизацию *in situ* и Нозерн-блот гибридизацию, где на блоты наносилась РНК, выделенная из отдельных органов. Это дало нам возможность впервые продемонстрировать тканеспецифичность экспрессии гена *Trl* (Перелыгина *и др.*, 1993). Специфичность экспрессии гена *Trl* была первоначально продемонстрирована нами с помощью гибридизации *in situ* на гистологических срезах (рис. 22). Во-первых, мы установили, что на ранних стадиях эмбриогенеза данный ген активно экспрессируется во всем эмбрионе, а на более поздних стадиях его экспрессия сосредоточена в основном в формирующейся нервной трубке. Во-вторых, мы показали, что у личинок первого и третьего возрастов сильная экспрессия происходит в комплексе мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему имагинальных дисках. Кроме того, активная экспрессия гена зафиксирована на этой стадии развития в формирующихся гонадах (данные не представлены). И, наконец, сильная экспрессия была выявлена в мозге взрослых мух (рис. 22).

Эти результаты были подтверждены в независимых экспериментах, проведенных с использованием антител к белку GAGA. С помощью иммунохимического окрашивания нами было установлено, что заметные количества GAGA-фактора наблюдаются в вентрально-мозговых ганглиях и прилегающих имагинальных дисках личинок третьего возраста. Кроме того, с помощью этого метода мы обнаружили присутствие данного белка в слюнных железах (рис. 23; Карагодин *и др.*, 2016). Из сравнения рисунков 22 и 23 видно, что уровень транскрипции гена в слюнных железах значительно ниже, чем в мозге и вентральных

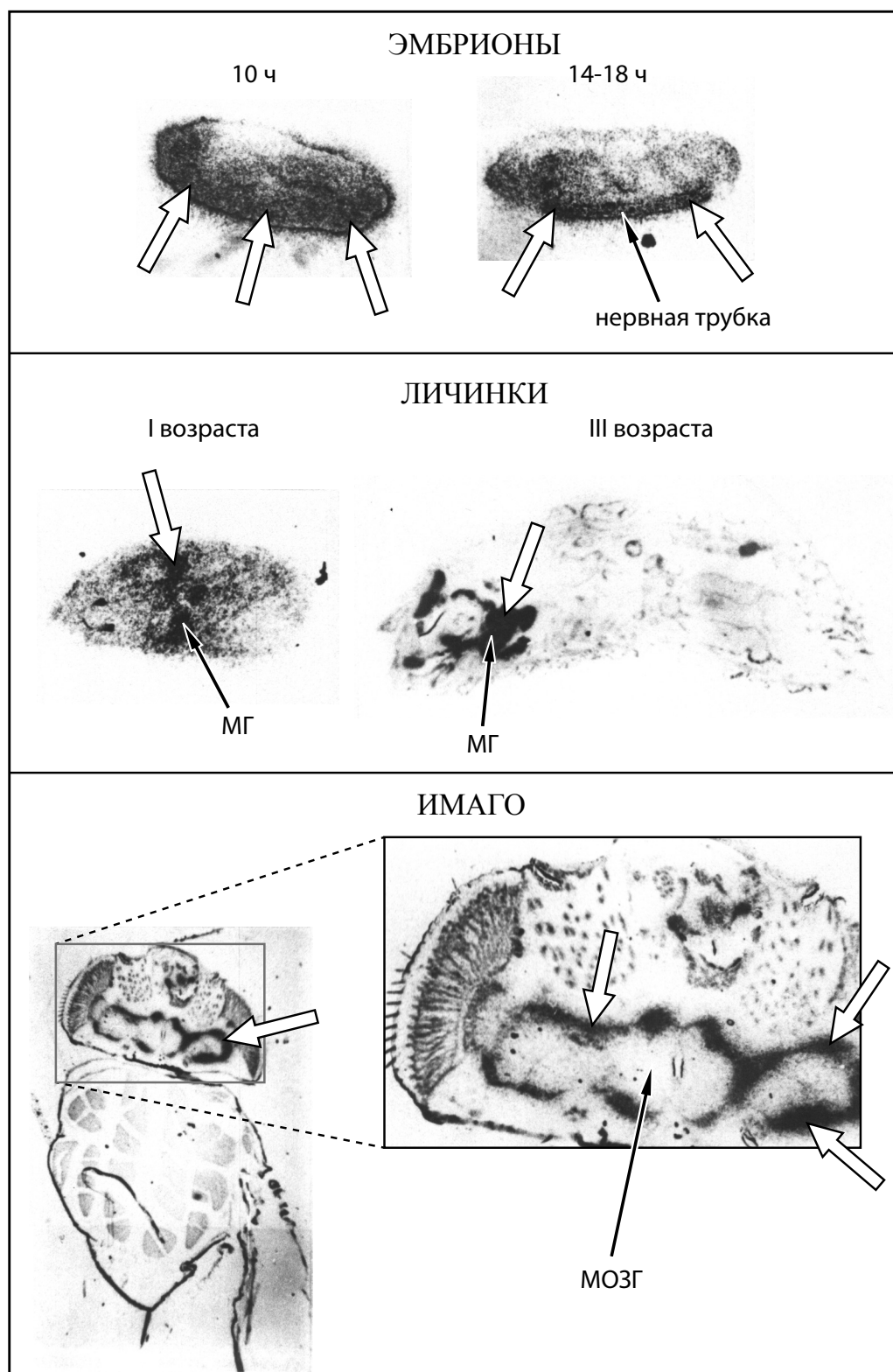


Рис. 22. Гибридизация *in situ* ^{33}P -меченного фрагмента кДНК гена *Trl* (2, 3, 4 экзоны) с гистологическими срезами эмбрионов, личинок 1-го и 3-го возраста, голов имаго дрозофилы (Перельгина и др., 1993). Белыми стрелками указаны области наибольшего сигнала мечения. Черными стрелками указаны органы, в которых зарегистрирована наиболее сильная экспрессия гена. МГ — комплекс мозг-вентральный ганглий.

ганглиях и не выявляется с помощью гибридизации *in situ* на гистологических срезах, однако в слюнных железах обнаруживаются достаточные для визуализации количества белка GAGA с помощью антител. Вероятно, относительно большие количества белка GAGA в слюнных железах удастся обнаружить благодаря значительной стабильности белка (Bhat *et al.*, 1996), в результате этого он накапливается в этих органах.

Большие количества белка GAGA нарабатываются также в клетках яйцевой камеры дрозофилы (рис. 24; Огиенко *и др.*, 2006). Белок обнаружен в соматических (фолликулярных клетках), а также в питающих клетках и ооците (данные не приводятся). Следует отметить, что белок в больших количествах присутствует в клетках яйцевой камеры на всем протяжении ее развития. Как видно из рис. 24, белок присутствует в клетках яйцевых камер, находящихся еще в гермариуме, затем он выявляется в клетках камер на средних стадиях развития и в камерах (рис. 24 А), находящихся на 10–11 стадиях развития (рис. 24 Б).



Рис. 23. Локализация белка GAGA в изолированных органах личинок третьего возраста дикой линии *Oregon R*, выявленная с помощью иммунохимического окрашивания антителами к данному белку.

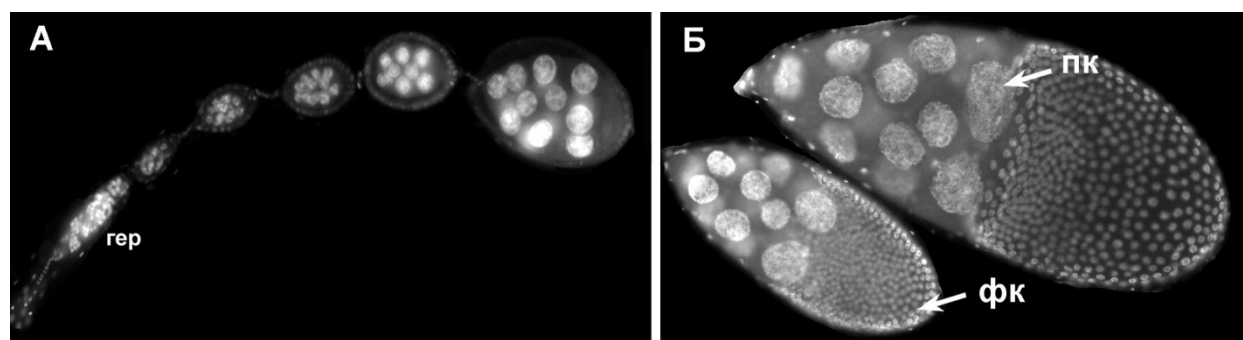


Рис. 24. Иммунолокализация белка GAGA в клетках яйцевой камеры дрозофилы. Стрелками обозначены ФК — фолликулярные клетки, ПК — питающие клетки. Гер — гермариум.

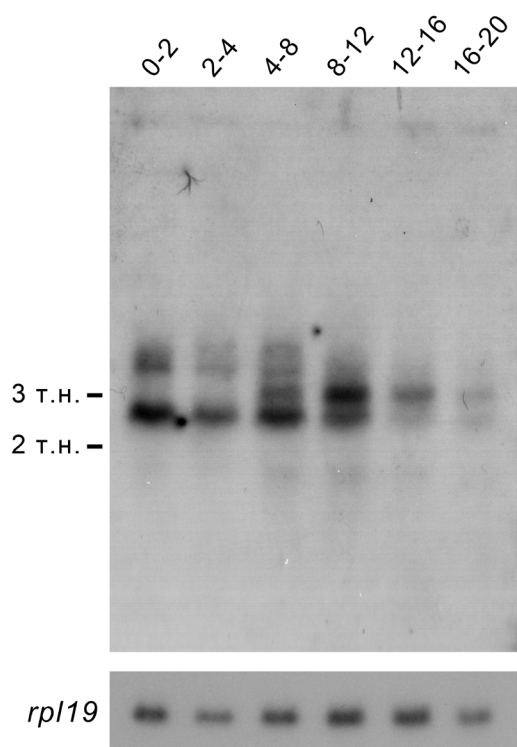


Рис. 25. Транскрипция гена *Trl* в эмбрионах дрозофилы. Нозерн-блот содержит тотальную РНК, выделенную из эмбрионов дикого типа (*Oregon R*). В качестве зонда для гибридизации использовали ^{32}P -меченный фрагмент кДНК гена *Trl* (2,3,4 экзоны). Внизу гибридизация того же блота с зондом *rpl19* в качестве контроля нанесения. Сверху блота приведено время развития эмбрионов с момента откладки в часах. Слева приведены маркеры длины РНК.

Важным результатом, полученным еще в наших первых работах по изучению экспрессии гена *Trl*, является наблюдение о том, что основными транскриптами, выявляемыми на протяжении развития дрозофилы, являются транскрипты длиной 2,5 и около 3 т. н., однако могут синтезироваться и транскрипты другой длины (Перелыгина и др., 1992). Позднее Соллер, Бхат и их коллеги подтвердили этот факт в своих работах (Soeller *et al.*, 1993; Bhat *et al.*, 1996). Проведенное нами подробное изучение динамики представленности основных транскриптов в ходе эмбриогенеза показало, что на первых стадиях эмбриогенеза (0–4 часа) доминирующим является транскрипт длиной 2,5 т. н., тогда как у 4–8 часовых эмбрионов начинает увеличиваться количество транскриптов в 3 т. н. (рис. 25). Позднее, после 12 часов развития эмбриона, они становятся доминирующими. Транскрипт длиной 2,5 т. н. дает начало изоформе белка GAGA — GAGA-519, транскрипт в 3 т. н. — изоформе GAGA-581 (Bhat *et al.*, 1996; Karagodin *et al.*, 2013).

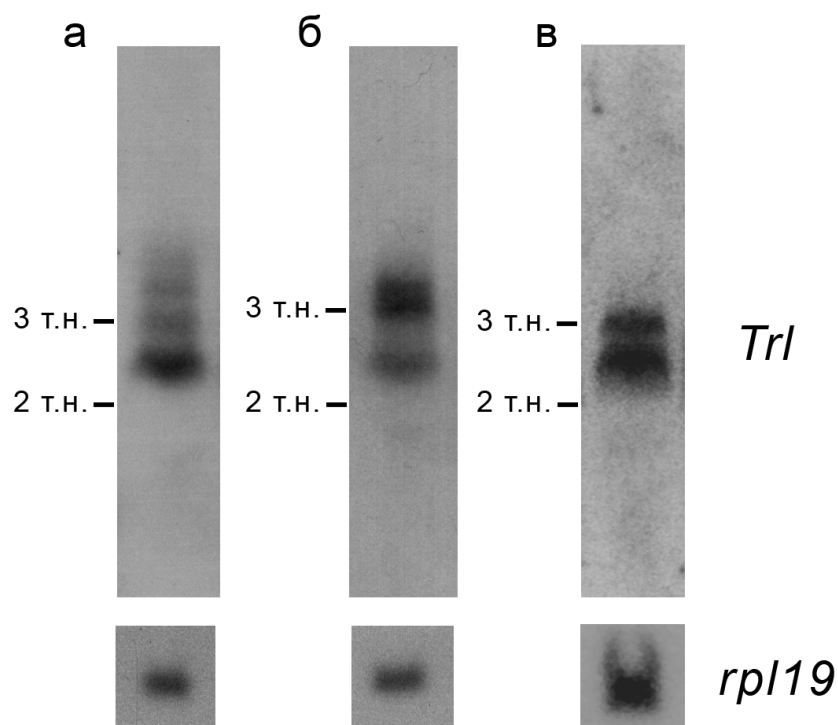


Рис. 26. Транскрипция гена *Trl* в разных органах дрозофилы. Нозерн-блот содержит тотальную РНК, выделенную из яичников (а), комплекса мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему имагинальных дисков личинок (б) и семенников (в) мух дикого типа (*Oregon R*). В качестве зонда для гибридизации использовали ^{32}P -меченный фрагмент кДНК гена *Trl* (2, 3, 4 экзоны). Внизу гибридизация того же блота с зондом *rpl19* в качестве контроля нанесения.

Мы исследовали также представленность транскриптов разной длины в разных органах дрозофилы (рис. 26). В яичниках взрослых самок, выращенных при 25 °С, мажорным является транскрипт длиной 2,5 т.н, а транскрипты большей длины выявляются в меньших количествах. (рис. 26 а; [Огиенко и др., 2006](#)), тогда как в РНК, выделенной из комплекса мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему имагинальных дисков личинок, выращенных при 25°С, количественно доминируют транскрипты длиной в 3 т. н. (рис. 26 б). В семенниках мух дикого типа транскрипты длиной 2,5 и 3 т. н. представлены примерно в равных количествах (рис. 26 в).

Заключение

В результате проведения данного цикла исследований нами установлено, что картина экспрессии гена *Trl* строго специфична для каждой отдельной стадии развития и для разных органов и тканей дрозофилы. Она может различаться как по уровню экспрессии гена, так и по составу транскриптов. Установлено,

что основными транскриптами, выявляемыми в разных тканях дрозофилы и на разных стадиях онтогенеза, являются транскрипты длиной 2,5 т. н., соответствующие GAGA-519 и 3 т. н., соответствующие GAGA-581. Однако, количество каждого из этих транскриптов сильно варьирует в зависимости от стадии развития или типа ткани. Кроме того, на Нозерн-блотах могут выявляться также транскрипты другой длины. 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.

3.2. Анализ 5'-некодирующей области гена *Trl*

В работе Косого и соавторов, посвященной доказательству факта регуляции экспрессии гена *Trl* его же продуктом — ТФ GAGA, был слегка затронут и вопрос о значении некоторых участков 5'-фланкирующей области гена *Trl* для обеспечения нормального уровня экспрессии репортерного гена в культуре клеток S2 (Kosoy *et al.*, 2002). Однако особый интерес представляет изучение регуляторного потенциала тех или иных последовательностей в контексте целого организма. Это определяется прежде всего тем, что экспрессия анализируемого гена в культуре клеток может значительно отличаться от таковой в органах и тканях целого организма. Кроме того, в настоящее время имеется не так много хорошо охарактеризованных клеточных культур разных типов. Использование векторных конструкций у трансгенных животных также не всегда отражает реальную ситуацию, поскольку известно, что экспрессия репортерного гена зависит от положения конструкции в геноме, в частности на неё сильно влияют регуляторные элементы расположенных рядом с местом встройки генов. Поэтому именно использование мутаций, затрагивающих анализируемый район, обеспечивает наиболее достоверные результаты при изучении его регуляторного потенциала. Анализ мутантов с использованием современных цитогенетических и молекулярных методов позволяет установить реальное влияние регуляторных элементов на экспрессию гена. Поэтому в данной работе была поставлена задача исследовать, насколько значимы для обеспечения транскрипции гена *Trl* в условиях *in vivo* разные фрагменты 5'-области гена, включая те фрагменты, важность которых была продемонстрирована на культуре клеток. Для решения

поставленной задачи нам было необходимо получить набор подходящих мутаций, затрагивающих 5'-область гена.

3.2.1. Получение и картирование мутаций, затрагивающих 5'-некодирующую область гена *Trl*

К началу наших исследований имелось несколько охарактеризованных мутаций, затрагивающих 5'-область гена *Trl*. Однако большинство из них не очень подходило для анализа регуляторного потенциала данной области, поскольку они являлись или рецессивными летелями или практически не влияли на жизнеспособность мутантов (Катохин и др., 2001). Поэтому нам было необходимо получить набор затрагивающих 5'-область гена мутаций (предпочтительно гипоморфных, включая делеции), влияющих на онтогенез дрозофилы и экспрессию гена *Trl*. Для получения таких мутаций мы использовали метод неточных эксцизий *P*-элементов, локализованных в этой области. В экспериментах были использованы мутации *Trl*³⁶⁰⁹ и *Trl*³⁶², затрагивающие 5'-область гена *Trl* (рис. 27). Мутация *Trl*³⁶⁰⁹ была получена из мировых коллекций, а мутация *Trl*³⁶² получена в Лаборатории механизмов клеточной дифференцировки ИЦиГ СО РАН А. А. Огиенко. Гипоморфная мутация *Trl*³⁶² обусловлена инсерцией транспозона *p{lacW}* и прилегающей к нему делецией размером 97 п. н. (Огиенко и др., 2006; рис. 27), а рецессивная мутация *Trl*³⁶⁰⁹ обусловлена встройкой транспозона *p{EP}*. Транспозоны, присутствующие у этих мутантов, содержат ген *mini-white (mw)*, который определяет желтый цвет глаз у взрослых мутантов.

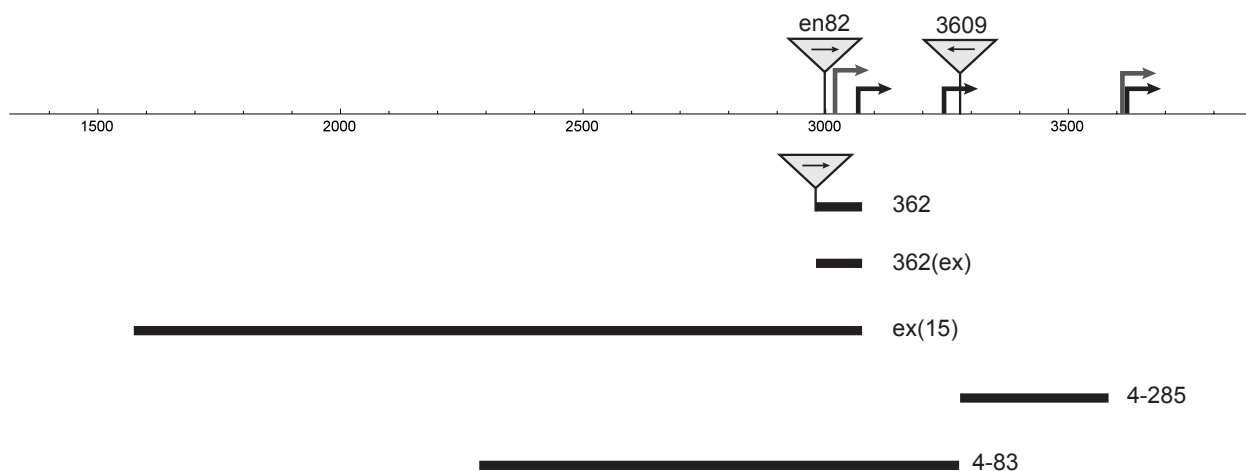


Рис. 27. Схема мутаций, затрагивающих 5'-регуляторную область гена *Trl*. Стрелками указаны сайты инициации транскрипции, картированные в культуре клеток S2 (Kosoy et al., 2002). Сверху указаны координаты в соответствии с последовательностью GenBank #AJ225042.

Для индукции эксцизий желтоглазые самки, несущие *P*-элементную мутацию (*M*), были скрещены с самцами линии *uw; Ki P[ry⁺ Δ2-3]99B* (Robertson *et al.*, 1988), используемой в качестве источника транспозазы. Эксцизии происходили в зародышевых клетках самцов генотипа *uw; M/Ki P[ry⁺ Δ2-3]99B*. В потомстве, полученном в результате скрещивания таких самцов с желтоглазыми самками исходной линии, большинство сыновей будут иметь желтые глаза (регулярное потомство) и только немногие будут белоглазыми (нерегулярное потомство). Белый цвет глаз сыновей свидетельствует о том, что у них был удален транспозон или его часть, содержащая ген *mw*. В отдельных случаях удаление транспозона сопровождается и удалением расположенных рядом частей гена. Каждый из белоглазых самцов был выведен в линию и проанализирован. В результате эксперимента с использованием мутации *Trl³⁶⁰⁹* нами было отобрано около 400 белоглазых самцов, а в эксперименте с использованием мутации *Trl³⁶²* было отобрано около 30 белоглазых самцов. Все они были выведены в линии и проверены на наличие мутаций, затрагивающих регуляторную область гена с помощью ПЦР и дальнейшего секвенирования.

Для анализа регуляторного потенциала 5'-регуляторной области гена *Trl* были отобраны только наиболее интересные из вновь полученных нами мутаций, которые отображены на рис. 27, а также мутации *Trl³⁶⁰⁹* и *Trl³⁶²*, поскольку они тоже нарушают структуру этой области. Мутация *Trl³⁶⁰⁹* приводит к гибели мутантов на ранних стадиях онтогенеза (Катохин *и др.*, 2001), а мутация *Trl³⁶²* является гипоморфной (Огиенко *и др.*, 2006). Все используемые в работе мутации не затрагивают кодирующую область гена, однако удаляют или изменяют районы 5'-некодирующей области гена *Trl*, где в экспериментах, проведенных на культуре клеток, было найдено 5 стартов транскрипции (рис. 27). Остановимся подробнее на описании мутаций, полученных в данной работе. Делеция *Trl^{362(ex)}* получена в результате точной эксцизии *P*-элемента из аллеля *Trl³⁶²*. В результате мутанты *Trl^{362(ex)}* содержат точно такую же делецию, как и мутанты *Trl³⁶²* (97 п. н.), но у них отсутствует *P*-элемент, прилегающий к делеции.

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 *Trl⁴⁻⁸³* является делецией величиной около 1000 п. н., частично перекрывающейся с делецией *Trl^{ex(15)}*. Она удаляет три первых сайта инициации транскрипции и фрагмент, расположенный выше них. Делеция *Trl⁴⁻²⁸⁵* удаляет фрагмент, расположенный

между третьим и четвертым стартами транскрипции. Мы провели анализ жизнеспособности и фертильности мутантов, затрагивающих 5'-область гена *Trl*, а также анализ экспрессии у них гена *Trl*.

3.2.2. Жизнеспособность мутантов с нарушением структуры 5'-области гена *Trl*

Нами было установлено, что мутанты *Trl*⁴⁻⁸³ и *Trl*³⁶⁰⁹ не доживают до стадии имаго. Однако и другие анализируемые нами мутации, связанные с изменением 5'-области гена *Trl* приводят в той или иной степени к снижению жизнеспособности мутантов. Данные по жизнеспособности мутантов с удаленными фрагментами этой области представлены в табл. 1. Относительную жизнеспособность оценивали как соотношение количества реально вылетевших имаго мутантов генотипа *M/Trl*^{R85}, где *M* — анализируемая мутация, а *Trl*^{R85} — нуль-аллель, к теоретически ожидаемому в соответствие с менделевским расщеплением их количеству в процентном выражении.

Из таблицы следует, что среди анализируемых нами гипоморфных мутантов наименьшее снижение жизнеспособности при нормальной температуре зафиксировано у мутантов *Trl*^{362(ex)} и *Trl*³⁶², несущих маленькую делецию, удаляющую первые два старта транскрипции. При повышенной температуре мутанты *Trl*³⁶² живут значительно хуже, чем мутанты *Trl*^{362(ex)}. Только половина особей, несущих делецию *Trl*⁴⁻²⁸⁵, которая удаляет фрагмент между третьим и четвертым

Табл. 1. Относительная жизнеспособность особей генотипа *M/Trl*^{R85} при температуре 25 и 29 °C, выраженная в процентах от теоретически ожидаемого значения.

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

M — аллель 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.

стартами транскрипции, доживает до стадии имаго при нормальной температуре и немногим более 20 % при повышенной температуре. Наибольшее снижение жизнеспособности зафиксировано у $Trl^{ex(15)}$ мутантов, характеризующихся удалением первых двух стартов транскрипции и большого фрагмента, расположенного выше стартов. У этих мутантов до стадии имаго при нормальных условиях доживает только около 14 % мух генотипа $Trl^{ex(15)}/Trl^{R85}$ и около 8 % в условиях слабого температурного шока. Поскольку удаление двух первых стартов у мутантов Trl^{362} и $Trl^{362(ex)}$ не приводит к значительному снижению жизнеспособности, то очевидно, что причиной резкого снижения жизнеспособности мутантов $Trl^{ex(15)}$ является отсутствие района, расположенного выше стартов транскрипции.

Таким образом, нами впервые продемонстрировано, что любые изменения структуры 5'-области гена Trl приводят к снижению жизнеспособности мух, в частности:

- 1) удаление двух первых стартов транскрипции незначительно сказывается на жизнеспособности мутантов Trl^{362} и $Trl^{362(ex)}$;
- 2) удаление района, расположенного выше стартов, приводит к значительному снижению количества мутантов, доживающих до стадии имаго, как это продемонстрировано для мутантов $Trl^{ex(15)}$;
- 3) удаление района, расположенного выше стартов транскрипции в сочетании с третьим стартом, приводит к гибели мутантов на ранних стадиях онтогенеза, в результате мухи генотипа Trl^{4-83}/Trl^{R85} не доживают до стадии имаго;
- 4) удаление фрагмента, расположенного между третьим и четвертым сайтами инициации транскрипции, приводит к снижению жизнеспособности мутантов Trl^{4-285} на половину при обычных условиях выращивания.

3.2.3. Анализ фертильности мутантов с нарушением структуры 5'-области гена Trl

В работе было проверено влияние мутаций, затрагивающих 5'-область гена Trl , на фертильность самок и самцов мутантов. Для анализа фертильности проводили скрещивание самок, несущих анализируемые мутации в гомозиготе или в сочетании с нуль-аллелем, с самцами дикой линии *Oregon R*, и наоборот, самцов аналогичного генотипа с самками *Oregon R*. Результаты анализа представлены в ТАБЛ. 2.

Табл. 2. Результаты анализа фертильности мутантов.

генотип	самки	самцы
$Trl^{ex(15)}/Trl^{ex(15)}$	стерильны	стерильны
$Trl^{ex(15)}/Trl^{R85}$	стерильны	стерильны
$Trl^{362(ex)}/Trl^{362(ex)}$	стерильны	фертильны
$Trl^{362(ex)}/Trl^{R85}$	стерильны	фертильны
Trl^{4-285}/Trl^{R85}	фертильны	фертильны
Trl^{362}/Trl^{R85}	стерильны	полустерильны

Как следует из данных, представленных в таблице, фертильными оказались только самки и самцы, несущие делецию Trl^{4-285} в сочетании с нуль-аллелем. Мутация $Trl^{362(ex)}$ как в гомозиготе, так и в сочетании на нуль-аллель приводит к стерильности самок, однако не приводит к стерильности самцов. Мутанты Trl^{362} характеризуются стерильностью самок и полустерильностью самцов (Огиенко и др., 2006; Dorogova et al., 2014). И, наконец, и самки, и самцы мутантов $Trl^{ex(15)}$ оказались стерильны.

Таким образом, полученные данные показывают, что нарушения в структуре 5'-области гена Trl приводят к уменьшению фертильности или даже стерильности не только самок, но и самцов дрозофилы, в частности:

- 1) удаление фрагмента размером 99 п. н., в котором локализованы два первых сайта инициации транскрипции, у мух, несущих мутации $Trl^{ex(15)}$ и $Trl^{362(ex)}$, приводит к стерильности самок, но не самцов мутантов;
- 2) область гена, которая расположена выше стартов транскрипции и удаляемая делецией $Trl^{ex(15)}$, но не затрагиваемая делецией $Trl^{362(ex)}$ играет важную роль в функционировании половой системы не только самок, но и самцов дрозофилы;
- 3) район, расположенный между третьим и последними стартами транскрипции, не имеет большого значения для функционирования половой системы самок и самцов дрозофилы.

Поскольку ранее было установлено, что недостаток белка GAGA сказывается на эмбриогенезе Trl -мутантов (Bhat et al., 1996), то можно было предположить, что именно гибель эмбрионов, а не нарушения оогенеза, является причиной отсутствия потомства у самок Trl -мутантов. Поэтому мы проследили, сколько яиц откладывает одна самка каждого из мутантов, с целью выяснения того, как недостаток продукта гена влияет именно на процесс оогенеза самок.

Для подсчета откладываемых яиц использовались разъемные стаканы, в каждый из которых помещали по 10–20 взрослых (3–4 дневных) мутантных самок и самцов дикого типа. Через сутки родителей переносились в новые стаканы и подсчитывали количество отложенных самками в течение суток яиц. Общее число яиц делилось на общее число самок, что позволяло определить количество яиц, откладываемых одной мутантной самкой в течение суток. Скрещивания проводились при температуре 25 °С в течение 5 дней. Среднее количество откладываемых яиц для каждого типа мутантов приведено в ТАБЛ. 3.

Табл. 3. Анализ количества яиц, откладываемого самками *Trl*-мутантов.

генотип	среднее количество, откладываемых самкой яиц, шт/сутки
<i>Oregon R/Oregon R</i>	50,20±2,09
<i>Trl^{ex(15)}/Trl^{ex(15)}</i>	2,76±0,17
<i>Trl^{ex(15)}/Trl^{R85}</i>	1,50±0,03
<i>Trl^{362(ex)}/Trl^{362(ex)}</i>	7,96±0,47
<i>Trl^{362(ex)}/Trl^{R85}</i>	7,46±0,94
<i>Trl⁴⁻²⁸⁵/Trl^{R85}</i>	13,2±0,46

Ошибка выборочного среднего считалась по формуле $Sp=(pq/n)^{1/2}$, где n — численность выборочной совокупности, а p и q — выборочные статистические параметры.

Как видно из таблицы, все мутантные самки откладывают значительно меньшее число яиц по сравнению с самками дикой линии *Oregon R*, что доказывает влияние мутаций, затрагивающих 5'-область гена *Trl*, именно на репродуктивную функцию самок. Таким образом, очевидно, что анализируемые мутации приводят к нарушениям в оогенезе *Trl*-мутантов. Следует отметить, что число откладываемых мутантными самками яиц не всегда коррелирует с их жизнеспособностью. Наименьшее число яиц откладывают мухи, несущие делецию *Trl^{ex(15)}*, характеризующиеся низкой жизнеспособностью. А наибольшее число яиц среди всех анализируемых мутантов откладывают самки *Trl⁴⁻²⁸⁵*, характеризующиеся относительно высокой жизнеспособностью. Однако оказалось, что и самки, несущие мутацию *Trl^{362(ex)}* в гомозиготе или в сочетании с нуль-аллелем, откладывают совсем небольшое число яиц по сравнению с нормой, несмотря на то, что их жизнеспособность практически не отличается от нормы.

Таким образом, нами впервые получены результаты, свидетельствующие о том, что различные нарушения структуры 5'-области гена *Trl* приводят к снижению фертильности самок, и причиной их стерильности являются проблемы

с оогенезом. Полученные результаты показывают, что фертильность самок, а также число откладываемых ими яиц, сильно зависит от фрагмента, удаленного у мутантов *Trl*³⁶² и *Trl*^{362(ex)}, в котором локализованы 2 первых сайта инициации транскрипции. Однако даже у самок *Trl*⁴⁻²⁸⁵, у которых этот район присутствует, число отложенных самками яиц снижено почти в 4 раза по сравнению с контролем. Кроме того, нами впервые получены данные о том, что нарушения в структуре 5'-области гена *Trl* могут быть причиной стерильности самцов.

3.2.4. Анализ экспрессии гена *Trl* у мутантов с нарушенной структурой 5'-области гена

Поскольку нами было продемонстрировано снижение жизнеспособности и фертильности мутантов с нарушенной структурой 5'-области гена *Trl*, мы предположили, что причиной этого может быть нарушение экспрессии гена в ходе онтогенеза. В работе был проведен анализ экспрессии гена *Trl* у мутантов, затрагивающих 5'-область гена в разных тканях и на разных стадиях развития дрозофилы.

3.2.4.1. Экспрессия гена *Trl* на стадии куколки

Поскольку многие мутанты с нарушенной структурой 5'-области гена *Trl* не доживают до стадии имаго, мы провели анализ экспрессии гена на ранних стадиях, в частности, на стадии куколки. В норме, в РНК, выделенной из куколок дикого типа (*Oregon R*), выявляются два мажорных транскрипта длиной 2,5 и 3 т. н., а также транскрипт большей длины. В РНК из куколок у большинства мутантов выявляются такие же транскрипты. Однако количество нарабатываемых транскриптов у отдельных мутантов много ниже, чем в норме (рис. 28).

По результатам Нозерн блот-гибридизации можно сделать заключение, что район, в котором располагаются первые два старта транскрипции, не особенно важен для обеспечения транскрипции гена *Trl* на стадии куколки. Так у *Trl*^{362(ex)} мутантов, несущих маленькую делецию длиной 97 п. н., в которой располагаются первые два старта, уровень экспрессии данного гена в куколках практически не отличается от нормы. В то же время, в куколках мутантов *Trl*^{ex(15)}, у которых удалены те же два первых сайта инициации транскрипции и протяженный участок регуляторной области выше первого старта, наблюдается очень сильное снижение экспрессии гена. Это свидетельствует о важности района,

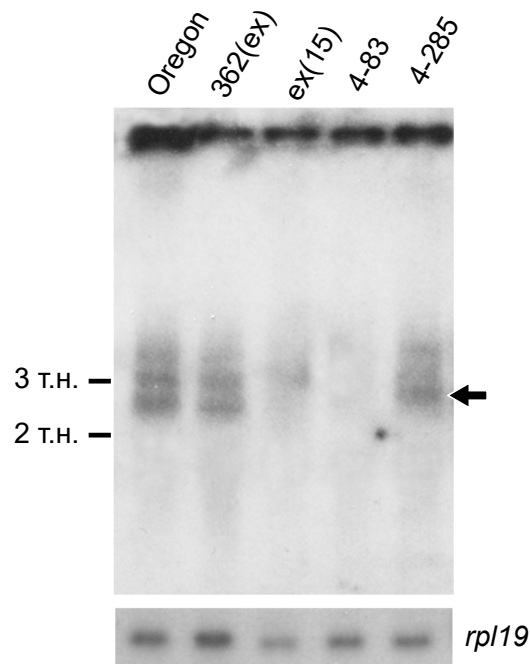


Рис. 28. Анализ экспрессии гена *Trl* в куколках. Стрелкой указан транскрипт у мутантов *Trl⁴⁻²⁸⁵*, отличающийся по размеру от транскрипта в куколках дикого типа. В качестве контроля нанесения использован транскрипт гена *rpl19*.

расположенного выше стартов транскрипции гена для обеспечения высокого уровня транскрипции гена в куколках. Следует отметить, что примерно такое же снижение транскрипции зарегистрировано в куколках мутантов *Trl⁴⁻⁸³*, несущих делецию, в значительной мере перекрывающуюся с делецией *Trl^{ex(15)}*, но удаляющую и третий старт транскрипции. Как ранее отмечалось, эти два типа мутантов, несмотря на то, что транскрипция у них гена *Trl* на стадии куколки практически одинакова, сильно различаются по жизнеспособности: *Trl^{ex(15)}/Trl^{R85}* доживают до стадии имаго, а *Trl⁴⁻⁸³/Trl^{R85}* — нет. Таким образом, мы полагаем, что район, содержащий третий старт и удаляемый делецией *Trl⁴⁻⁸³*, играет определенную роль в обеспечении транскрипции гена. Некоторое снижение уровня экспрессии гена *Trl* в куколках было продемонстрировано и для мутантов, несущих делецию *Trl⁴⁻²⁸⁵*. Интересно, что в РНК, выделенной из куколок *Trl⁴⁻²⁸⁵* мутантов, отсутствует транскрипт длиной 2,4 т.н., однако появляется несколько более тяжелый транскрипт. Не исключено, что удаление фрагмента первого интрона у этих мутантов приводит к нарушениям процесса сплайсинга, в результате чего образуется аномальный транскрипт.

3.2.4.2. Экспрессия гена *Trl* в разных тканях дрозофилы

Мы также исследовали экспрессию гена *Trl* в разных тканях анализируемых мутантов. Поскольку, как было показано выше, самки мутантов с нарушенной структурой 5'-области гена *Trl* могут быть стерильны, мы провели анализ экспрессии гена в их половой системе. Оказалось, что в яичниках большинства стерильных самок *Trl*-мутантов экспрессия гена действительно снижена.

3.2.4.2.1. Экспрессия гена *Trl* в яичниках

С помощью Нозерн-блот гибридизации мы показали, что в яичниках взрослых мух дикого типа наблюдается высокий уровень транскрипции гена *Trl*. В норме в РНК яичников выявляется один мажорный транскрипт размером 2,4 т. н. и два минорных большего размера (рис. 29).

В РНК, выделенной из яичников мутантов с нарушенной 5'-областью, наблюдаются те же транскрипты, однако у многих их количество значительно ниже, чем в норме. Особенно сильные нарушения экспрессии гена выявлены у

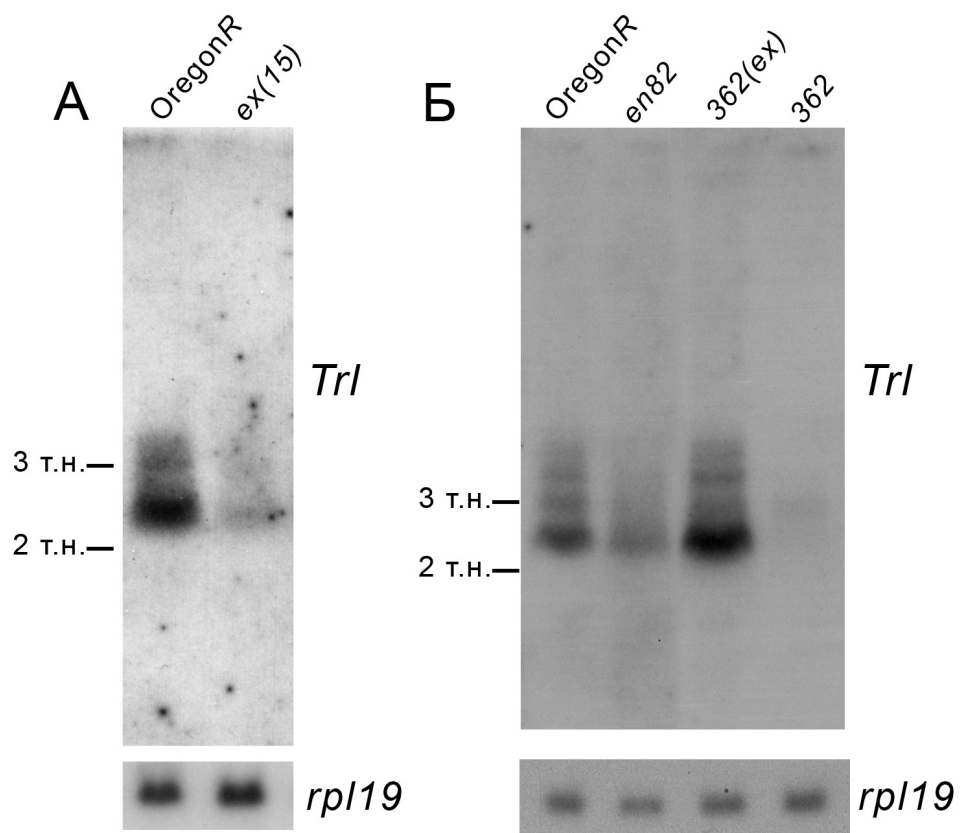


Рис. 29. Анализ экспрессии в яичниках мутантов *Trl^{ex(15)}* (А) и *Trl^{362(ex)}*, *Trl³⁶²*, *Trl^{en82}* (Б). В качестве контроля нанесения использован ген *rpl19*. Анализируемые мутации обозначены над блотами сверху. В качестве контроля использована линия *OregonR*.

мутантов, у которых наблюдается изменение структуры района, расположенного выше стартов транскрипции. Так у мутантов *Trl^{ex(15)}*, несущих делецию большого фрагмента, расположенного выше стартов транскрипции, транскрипция гена *Trl* снижена практически в десять раз. Такое же снижение наблюдается и у мутантов *Trl³⁶²*, у которых в район, расположенный выше стартов транскрипции, происходит встраивание транспозона величиной около 13 т. п. н. Очевидно, что в результате инсерции такого большого куска ДНК произошло разобщение регуляторных последовательностей, расположенных в 5'-области гена. У мутантов *Trl^{en82}* величина встроенного примерно в то же место, что и у мутантов *Trl³⁶²*, транспозона значительно меньше (около 1,2 т. п. н.) и наблюдается меньшее снижение (только на 30 %) транскрипции в половой системе самок этих мутантов. Вероятно, что меньшее снижение транскрипции у *Trl^{en82}* связано с тем, что регуляторные элементы, требуемые для обеспечения нормального уровня транскрипции в яичниках, у этих мутантов не так сильно отдалены друг от друга.

Мы установили, что у стерильных *Trl^{362(ex)}* самок экспрессия гена в яичниках практически не отличалась от нормы (рис. 29 б). Напомним, что эти мутанты несут делецию длиной 97 п. н., удаляющую первые два старта транскрипции. Мы полагаем, что отсутствие изменения транскрипции в яичниках этих мутантов объясняется тем, что в РНК, выделенной из яичников, в основном представлены транскрипты, нарабатываемые в огромных полиплоидных питающих клетках. Таким образом, транскрипция гена в питающих клетках *Trl^{362(ex)}* мутантов не практически не нарушена. Однако, не исключено, что у них нарушена экспрессия гена *Trl* в соматических клетках, которые не вносят большой вклад в наработку РНК в яичниках. Если эта гипотеза верна, тогда у *Trl^{362(ex)}* мутантов должно нарушаться функционирование соматических клеток. Это действительно было обнаружено при анализе развития яйцевой камеры этих мутантов, и будет подробно описано ниже. Описанная выше стерильность самок мутантов *Trl^{362(ex)}* на фоне почти нормальной экспрессии гена *Trl* в яичниках взрослых мух дает основание предполагать, что половые и соматические клетки по-разному реагируют на удаление фрагмента, в котором расположены два первых сайта инициации транскрипции гена *Trl* в результате мутации *Trl^{362(ex)}*. Этот факт позволяет предположить использование разных сайтов инициации в клетках разного типа.

3.2.4.2.2. Экспрессия гена *Trl* в комплексе мозг-вентральный ганглий и прилегающих имагинальных дисках

Поскольку ранее было показано, что ген *Trl* активно экспрессируется в комплексе мозг-вентральный ганглий и прилегающих имагинальных дисках (Перелыгина *и др.*, 1993), мы исследовали как изменение структуры 5'-регуляторной области гена *Trl* сказывается на экспрессии гена в этих органах.

В норме в этих органах выявляются те же два основных транскрипта, что и в других тканях дрозофилы (рис. 30). При этом транскрипт в 3 т. н. представлен значительно сильнее, чем транскрипт длиной 2,4 т. н., в отличие от того, что мы наблюдали в яичниках самок. У мутантов *Trl*³⁶²/*Trl*^{R85} и *Trl*^{en82}/*Trl*^{R85} экспрессия гена в комплексе мозг-вентральный ганглий и прилегающих к нему дисках снижена по сравнению с нормой примерно в 2,5–3 раза, в то время как экспрессия в яичниках у *Trl*³⁶²/*Trl*^{R85} мутантов снижена в 10 раз.

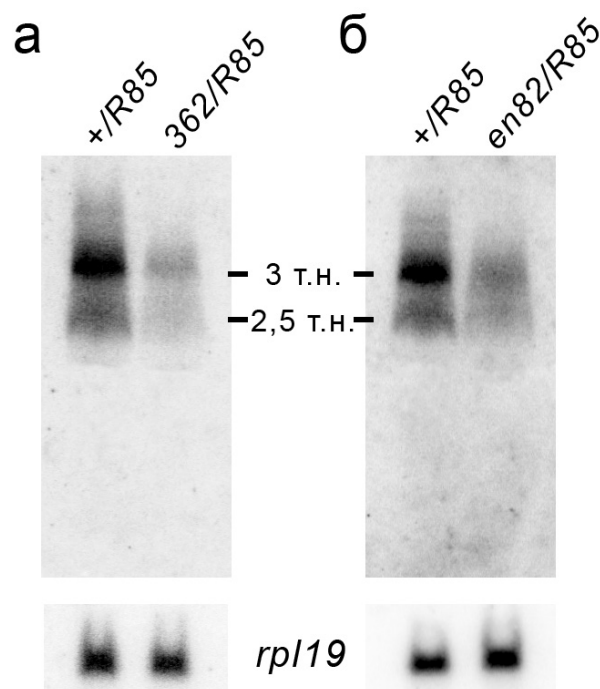


Рис. 30. Анализ экспрессии гена *Trl* в комплексе мозг-вентральный ганглий и прилегающих имагинальных дисках мутантов *Trl*³⁶² (А) и *Trl*^{en82} (Б). Линии мук обозначены на рисунке. В качестве контроля используется линия OregonR. Ген *rpl19* использован в качестве контроля нанесения.

3.2.5. Анализ мутантов *Trl*³⁶⁰⁹

В данной работе для анализа 5'-некодирующей области гена *Trl* была также использована мутация *Trl*³⁶⁰⁹, обусловленная внедрением *P{EP}* транспозона в непосредственной близости от третьего старта транскрипции (рис. 31). В гомозиготе и в сочетании с нуль-аллелем она приводит к гибели мутантов на ранних стадиях развития (Катохин и др., 2001). Причинами их гибели могут быть изменения в экспрессии гена, обусловленные: 1) aberrantным сплайсингом, приводящим к образованию химерной РНК и уменьшению количества нормальных транскриптов; 2) преждевременной терминацией транскрипции, обусловленной терминатором транскрипции гена *mini-white* (*mw*) транспозона;

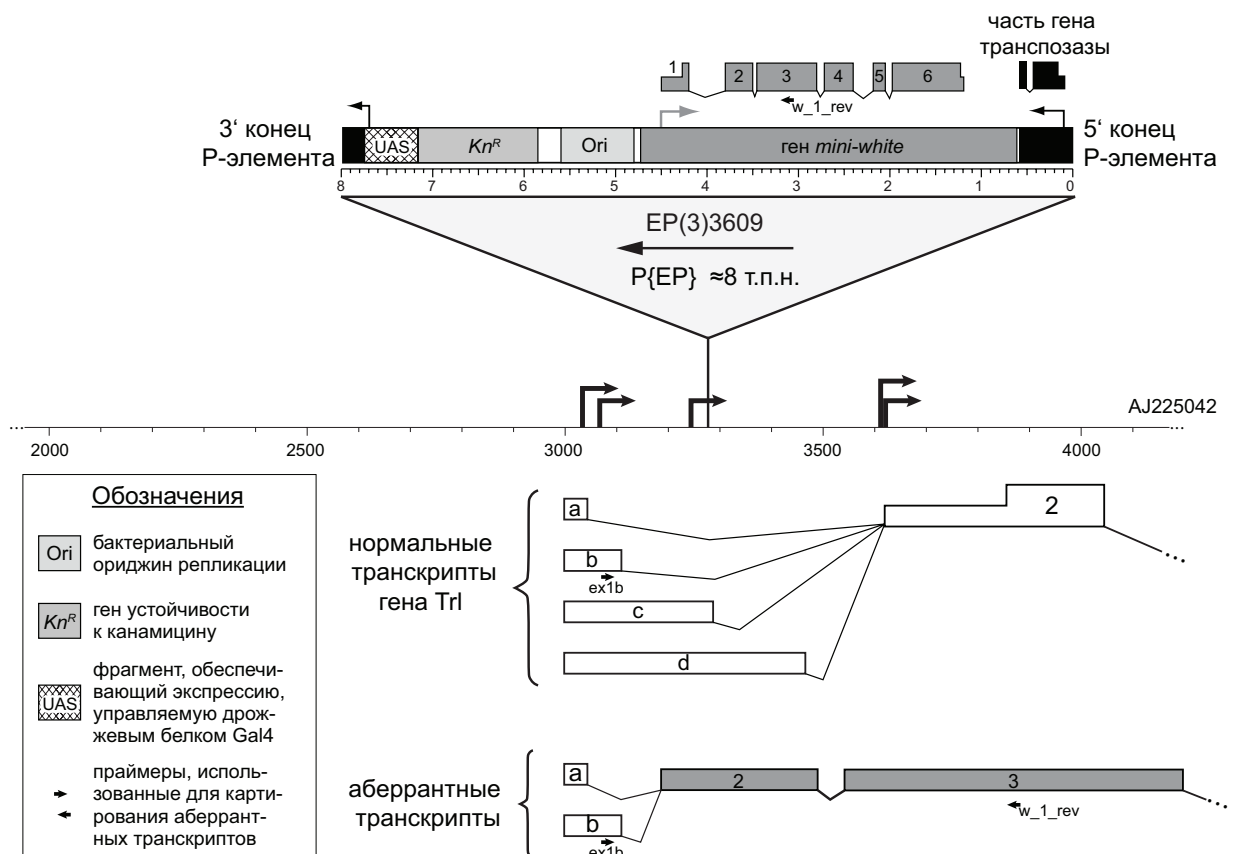


Рис. 31. Схема 5'-области гена *Trl* у мутации *Trl*³⁶⁰⁹. Встройку *P*-элемента обозначена треугольником. Сверху над ним приведена структура *P{EP}* транспозона (Rorth, 1996) и экзон-интронная структура его эукариотических генов. Изогнутыми стрелками обозначены старты и направление транскрипции эукариотических генов. Высокими прямоугольниками обозначены кодирующие области экзонов, низкими — некодирующие. Внизу приведен фрагмент 5'-области гена *Trl* и структура его транскриптов в норме и у мутантов. Координаты даны согласно последовательности AJ225042 (Катохин и др., 2001). Изогнутыми стрелками обозначены старты транскрипции в S2 клетках (Kosoy et al., 2002).

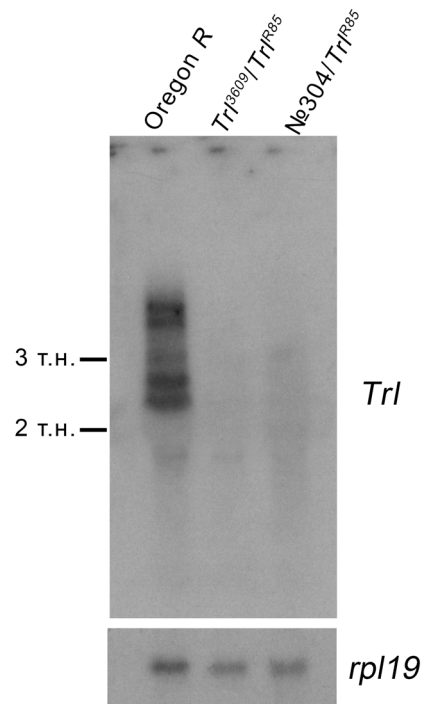


Рис. 32. Нозерн-блот анализ экспрессии гена *Trl* у мутантов *Trl*³⁶⁰⁹ и № 304. В качестве контроля нанесения использован ген *rpl19*.

3) нарушением целостности расположенных в области внедрения *P*-элемента функционально-значимых элементов или их разобщением.

Поскольку направление транскрипции гена *mw*, входящего в состав транспозона *P{EP}* у мутантов *Trl*³⁶⁰⁹, совпадает с направлением транскрипции гена *Trl*, у них возможно формирование аберрантных транскриптов, образованных за счет неправильного сплайсинга между экзонами генов *Trl* и *mw*. Действительно, результаты ОТ-ПЦР показали, что в РНК, выделенной из куколок мутантов *Trl*³⁶⁰⁹/*Trl*^{R85}, присутствуют аберрантные транскрипты, в которых первый экзон гена *Trl* соединяется со вторым экзоном гена *mw* (рис. 31). При этом количество нормальных транскриптов гена *Trl* у мутантов значительно снижено (рис. 32). Иммунохимическое окрашивание органов личинок также показало, что количество белка GAGA у мутантов также сильно снижено (рис. 33).

Таким образом, аберрантный сплайсинг является одной из причин, приводящих к нарушению экспрессии гена *Trl* у мутантов *Trl*³⁶⁰⁹. Для выяснения вклада других причин в нарушении экспрессии гена *Trl* у мутантов *Trl*³⁶⁰⁹ нами на основе этой мутации с помощью гибридного дисгенеза был получен набор мутантов, несущих неполные копии транспозона *P{EP}*, при отсутствии других нарушений структуры гена *Trl*. Структура наиболее интересных перестроек представлена на рис. 34.

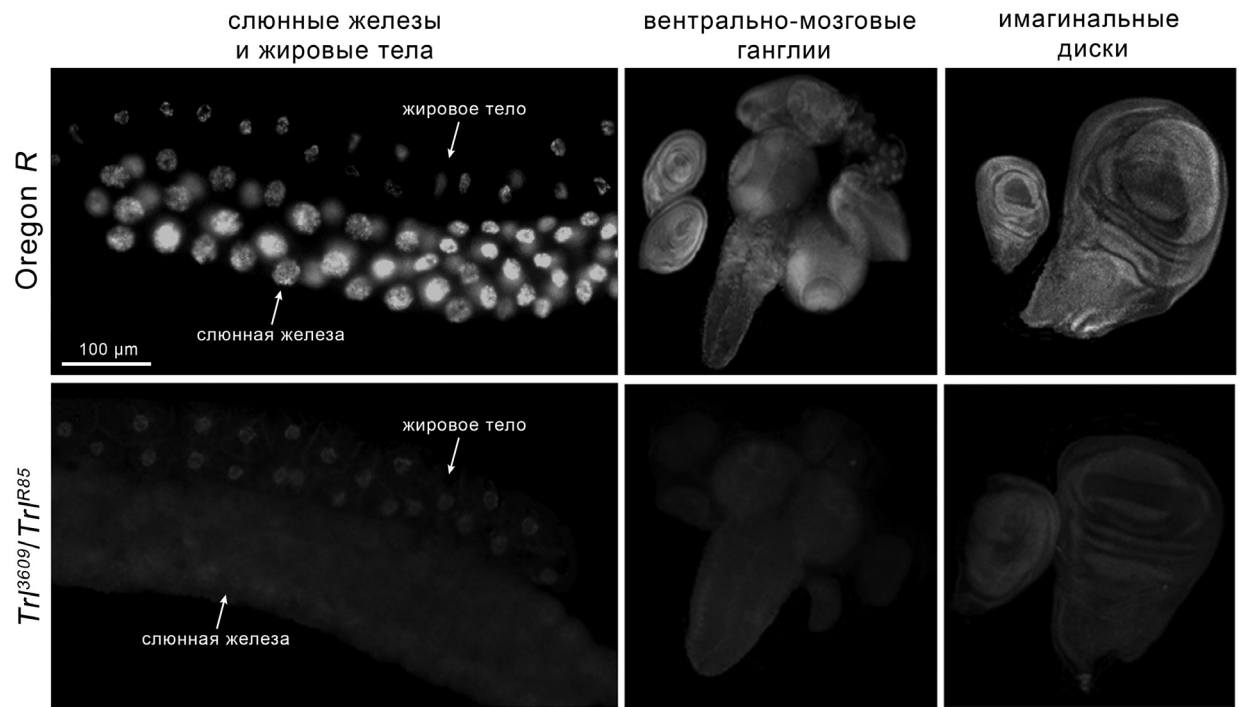


Рис. 33. Уменьшение количества белка GAGA у мутантов Trl^{3609} в различных органах личинок 3 возраста. Съемка в контроле и у мутантов выполнялась при одних и тех же условиях.

Исследование транскрипции гена Trl и жизнеспособности у мутантов с усеченным транспозоном продемонстрировало, что у мутантов № 10 и 151, содержащих сайты сплайсинга и терминатор гена mw , транскрипция резко снижена, а особи не доживают до стадии имаго, также как и Trl^{3609} мутанты (рис. 34). У мутантов № 304, у которых сохранилась только 3' концевая часть гена mw ,

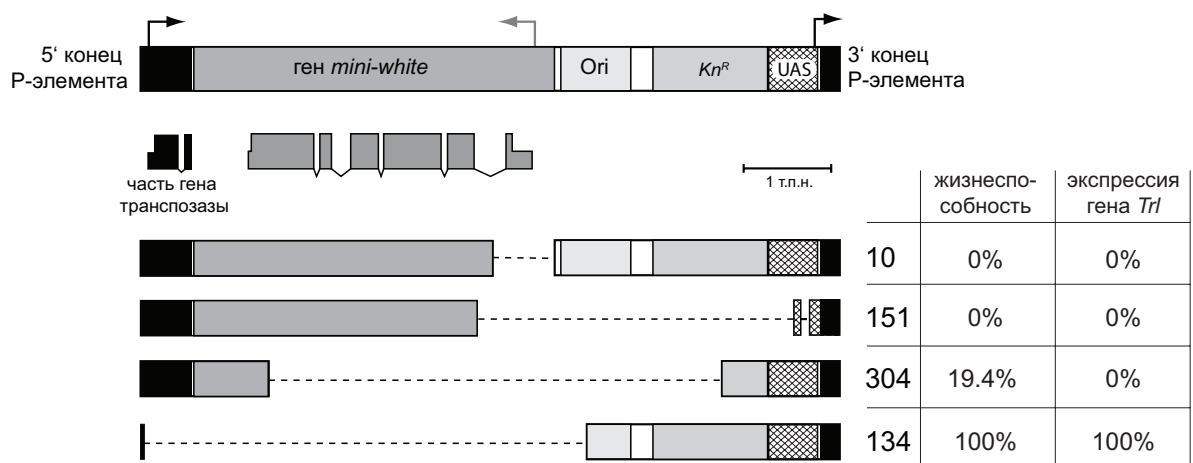


Рис. 34. Характеристика мутаций, полученных на основе Trl^{3609} . Сверху представлена структура $P\{EP\}$ транспозона. Обозначения см. на рис. 31. Фрагменты, отсутствующие у мутантов, обозначены пунктирной линией. Справа представлены данные по экспрессии гена Trl и жизнеспособности мутантов.

содержащая терминатор транскрипции, но не сайты сплайсинга, транскрипция гена *Trl* и жизнеспособность мутантов также сильно снижены по сравнению с нормой, хотя часть особей и доживают до стадии имаго. Таким образом, преждевременная терминация транскрипции вносит существенный вклад в нарушение функционирования генов, в которые встроились транспозоны. Необходимо отметить, что в настоящее время экспериментальные данные о роли преждевременной терминации в уменьшении экспрессии генов практически отсутствуют. Мутанты №134, у которых от транспозона остался 3'-конец *P*-элемента, в котором располагаются бактериальные гены, не показывают снижения жизнеспособности или нарушения транскрипции, хотя размер оставшегося фрагмента составляет 3 т. п. н., что больше чем у мутантов № 304. Поскольку уровень транскрипции у вновь полученных мутантов определяется структурой *P*-элемента, а не его размером, можно сделать вывод, что в месте встройки транспозона в аллеле *Trl*³⁶⁰⁹ отсутствуют какие-либо важные регуляторные элементы.

Внедрение транспозона в аллеле *Trl*³⁶⁰⁹ приводит к тому, что нормальные транскрипты гена с первых трех стартов не формируются, а вся экспрессия обеспечивается за счет двух последних стартов. Однако на стадиях личинки и куколки с них образуется очень мало *Trl* транскриптов. Поскольку все гомозиготы *Trl*³⁶⁰⁹ гибнут на эмбриональной стадии развития (Катохин и др., 2001), можно сделать вывод, что количество транскриптов, образующихся с последних двух стартов, явно не достаточно для нормального развития. Все это свидетельствует о том, что два последних старта транскрипции не вносят существенного вклада в обеспечение экспрессии гена *Trl* в условиях *in vivo*. Эти результаты кардинально отличаются от данных Косого и соавторов (Kosoy *et al.*, 2002) о том, что в культуре клеток S2 эти старты являются основными.

Суммируя описанные в данной главе результаты, можно сделать следующие обобщения:

- 1) Вероятно, район, содержащий два первые сайта инициации транскрипции, имеет особое значение для регуляции экспрессии гена в соматических клетках половой системы самок и не имеет большого значения для обеспечения экспрессии гена в других клетках 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 разобщение 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 вдвое. Вероятно, он играет важнейшую роль в обеспечении транскрипции гена на более ранних стадиях развития дрозофилы.
 - 5) Два последних старта транскрипции, по нашим данным, не вносят существенный вклад в производство транскриптов гена в живом организме в отличие от культуры клеток, где они обеспечивают наработку половины транскриптов гена.

Заключение

Проведенные ранее на культуре клеток S2 работы показали, что для обеспечения высокого уровня транскрипции репортерного гена имеет решающее значение фрагмент, расположенный выше стартов транскрипции Trl (Kosoy *et al.*, 2002). Наши исследования подтвердили, что и *in vivo* этот участок 5'-фланкирующей области гена Trl имеет большое значение для обеспечения высокого уровня транскрипции этого гена во всех проанализированных нами случаях. В противоположность этому проведенный нами анализ показал, что два последних старта транскрипции, с которых в культуре клеток S2 считывается половина транскриптов, в исследованных нами органах и тканях дрозофилы на разных стадиях её развития практически не используются. Кроме того, мы проанализировали значение других участков 5'-фланкирующей области гена,

которые не исследовались в экспериментах на культуре клеток, в обеспечении экспрессии *Trl in vivo*. Оказалось, что на ранних стадиях развития для транскрипции гена большое значение имеет фрагмент, в котором расположен третий старт транскрипции, поскольку его удаление ведет к гибели мутантов на этих стадиях. Удаление фрагмента, расположенного между третьим и последними стартами, также приводит к некоторому нарушению экспрессии гена. Район, в котором располагаются два первые старта транскрипции, по-видимому, играет важную роль в поддержании экспрессии гена только в отдельных типах клеток, например в соматических клетках яйцевой камеры дрозофилы.

Таким образом, мы впервые провели исследование влияния фрагментов 5'-области гена *Trl* на экспрессию гена в контексте целого организма. Это позволило значительно расширить имеющиеся представления о роли этой области в регуляции транскрипции гена. Были выявлены области, оказывающие решающее значение на экспрессию гена в ходе онтогенеза. Нами было установлено, что *in vivo* и в культуре клеток один и тот же фрагмент может иметь разное влияние на экспрессию гена.

3.3. Анализ регуляторного потенциала второго интрона гена *Trl* *Drosophila melanogaster*

3.3.1. Получение и картирование мутаций, затрагивающих второй интрон гена *Trl*

Как уже отмечалось выше, регуляторные элементы, необходимые для обеспечения правильной экспрессии генов, часто находятся в интронах (Fedorova & Fedorov, 2003; Rogozin *et al.*, 2012). Обычно они располагаются в больших интронах генов. В гене *Trl* самым большим интроном является второй, поэтому было принято решение получить мутации, нарушающие его структуру, и с их помощью исследовать регуляторный потенциал данной области гена в условиях *in vivo*. До начала нашей работы в мировых коллекциях почти не было мутаций, которые могли бы быть использованы для решения поставленной задачи. Было охарактеризовано только шесть мутаций, затрагивающих второй интрон гена *Trl*. Наиболее часто использовались мутации *Trl^{R85}* и *Trl^{R67}*, которые являются делециями, удаляющими не только второй интрон, но и части кодирующей области гена, что приводит к гибели мутантов на ранних стадиях развития (Farkas *et al.*, 1994; Катохин *и др.*, 2001). Оставшиеся четыре мутации — *Trl^{s2325}*, *Trl^{l3C}*,

$Trl^{EP(3)3184}$ и Trl^{P24} обусловлены инсерциями транспозонов во второй интрон гена. Мутации Trl^{s2325} и Trl^{I3C} являются рецессивными летальными (Катохин и др., 2001). Гипоморфная мутация Trl^{P24} , носители которой были жизнеспособны в гомозиготе (Sekelsky *et al.*, 1999), к сожалению, в настоящее время утрачена авторами. И только одна гипоморфная мутация $Trl^{EP(3)3184}$ пригодна для анализа второго интрона. Однако только одной мутации явно недостаточно, чтобы провести полноценный анализ регуляторного потенциала второго интрона гена. Поэтому для решения этой проблемы нами были получены новые делеции, удаляющие разные фрагменты данного района гена *Trl*.

Для получения мутаций во втором интроне гена *Trl* был использован метод *P*-элемент индуцированной самцовой рекомбинации. Этот метод, по утверждению авторов, имеет ряд преимуществ перед другими генетическими методами получения перестроек (Preston & Engels, 1996; Preston *et al.*, 1996). Прежде всего, он позволяет получать перестройки в районе, прилегающем к встроенному транспозону. К тому же авторы отмечают, что разработанный ими метод позволяет получить значительно большее количество перестроек, чем используемые ранее генетические методы, например метод неточных эксцизий, используемый нами при получении перестроек по 5'-некодирующей области гена *Trl*. Для получения требуемых перестроек мы использовали две *P*-элементные мутации — Trl^{s2325} и $Trl^{EP(3)3184}$, представляющие собой встройки транспозонов в начало второго интрона и ближе к его 3'-концу, соответственно.

Получение перестроек по гену *Trl* проводилось в соответствии со схемой, представленной на рис. 35. *P*-элемент индуцированная рекомбинация у самцов происходит в клетках зародышевого пути самцов генотипа *CyO* Δ 2-3/+; *P*-элемент/*ru h th st* (F1). Эти самцы скрещивались с самками, несущими маркеры в третьей хромосоме (рис. 35 б). В результате скрещивания получалось многочисленное регулярное потомство и небольшое количество рекомбинантных самцов.

Самцы из нерегулярного потомства выводились в линии. Рекомбинантные самки в дальнейших скрещиваниях не использовались, поскольку в их клетках зародышевого пути могла происходить мейотическая рекомбинация.

В результате проведенных экспериментов с использованием мутации $Trl^{EP(3)3184}$ было проанализировано 11268 мух и выявлено 183 рекомбинанта (самки и самцы). Из них 103 рекомбинанта имело генотип *ru h* + +, и 80 — генотип + + *th st*. В экспериментах с использованием мутации Trl^{s2325} было проанализировано

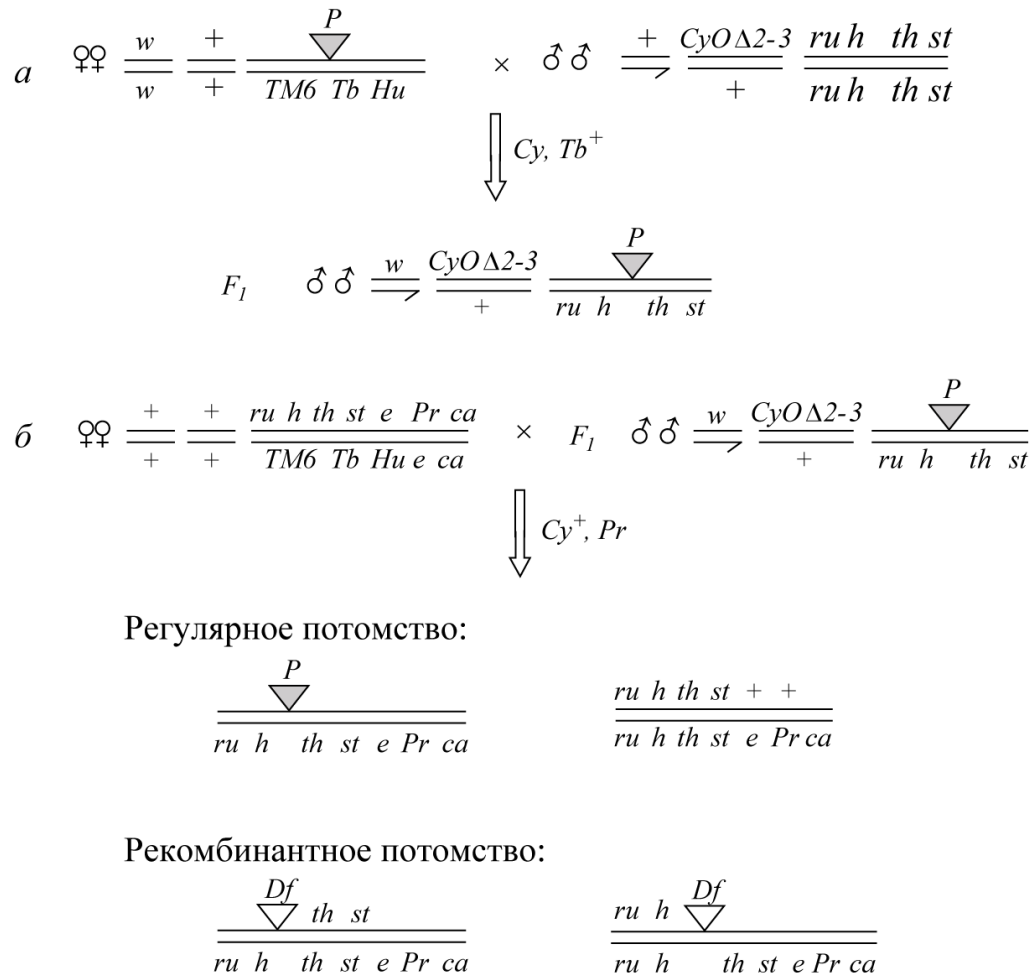


Рис. 35. Схема получения *P*-элемент-индуцированных мутаций по второму интрону гена *Trl*.

20745 мух и выявлено 220 рекомбинантов (самки и самцы). Из них 118 — генотипа *ru h + +* и 102 — генотипа *+ + th st*. Таким образом, частота рекомбинации составляла 1,6 % и 1 %, соответственно, в первом и во втором случае. Следует отметить, что в работе Престона с соавторами (Preston & Engels, 1996), частота рекомбинации была 1 %, а в сходном эксперименте Макунина с соавторами (Makunin *et al.*, 2002) доля рекомбинантов составляла всего 0,4 %.

В результате всех экспериментов нами было получено 192 рекомбинантных самца: 83 — в экспериментах с мутацией *Trl^{EP(3)3184}* и 109 — с мутацией *Trl^{s2325}*. Из них 34 самца оказались стерильными, а остальные 158 были выведены в линии. Все полученные линии были проверены на наличие перестроек, затрагивающих ген *Trl*, с помощью ПЦР-анализа. Известно, что обычно при получении перестроек с помощью метода *P*-элемент индуцированной рекомбинации одна из границ перестроек прилегает непосредственно к месту встройки транспозона (Preston & Engels, 1996). Поэтому отсутствие продукта амплификации с

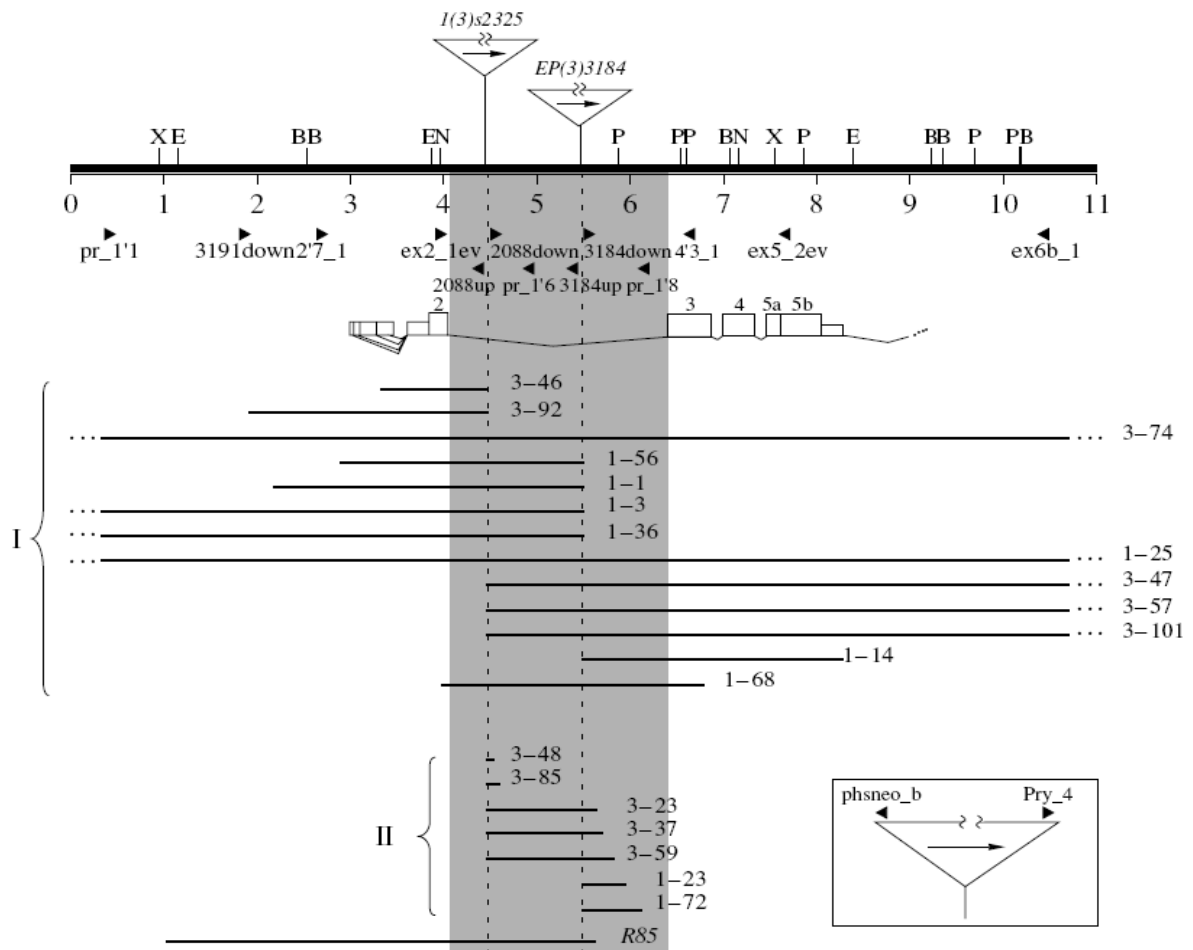


Рис. 36. Схема полученных делеций, затрагивающих второй интрон гена *Trl*. Вверху представлена геномная последовательность гена *Trl* с сайтами рестрикции BamHI (B), EcoRI (E), Nco I (N), Pst (P), Xho I (X). Под ней указано положение праймеров, использованных при анализе полученных в данной работе перестроек. 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 не кодирующим районам экзонов, а высокие — кодирующим. Серым прямоугольником выделен второй интрон гена *Trl*. Делеции представлены в виде горизонтальных линий.

праймеров, соответствующих месту встройки (смотри на рис. 36), свидетельствовало о наличии делеции в анализируемом районе. Предполагаемые перестройки были в дальнейшем точно картированы с помощью секвенирования, а большие делеции, выходящие за границу гена были картированы с помощью световой микроскопии. Все они представлены на рис. 36.

Таким образом, в результате проведенных нами экспериментов было получено 23 новых мутации, затрагивающих ген *Trl*. В экспериментах с использованием транспозона *Trl*^{EP(3)3184} — одиннадцать, а в экспериментах с использованием транспозона *Trl*^{s2325} — двенадцать перестроек. Среди проверенных

рекомбинантных самцов, полученных с использованием мутации $Trl^{EP(3)3184}$ процент особей, несущих перестройки по гену Trl , составляет 13 % и 11 % — в экспериментах с мутацией Trl^{s2325} . Таким образом, метод P -индуцированной самцовой рекомбинации действительно оказался достаточно эффективным для получения перестроек в заданном районе. Однако особенно хотелось бы отметить, что этот метод позволяет снизить затраты на трудоемкий анализ полученных в работе перестроек. В экспериментах по получению мутаций, затрагивающих второй интрон гена, нам пришлось анализировать около 150 линий для получения нужных нам перестроек. Тогда как в процессе получения мутаций по 5'-области гена Trl с помощью неправильных эксцизий нам необходимо было проанализировать более 430 линий. Характеристика полученных мутаций (длина делеций, размер оставшегося фрагмента транспозона и т.д.) приведена в табл. 4. Многоточие указывает на то, что границы делеций лежат за пределами гена.

Табл. 4. Характеристика полученных перестроек по гену Trl .

Номер линии	Границы делеции в соответствии с последовательностью AJ225042	Наличие концов P -элемента		Размер P -элемента (п. н.)	Длина делеции (п. н.)
		5'-конец	3'-конец		
3-48	4440–4485	—	—	26	45
3-85	4440–4586	—	—	26	146
1-23	5456–5895	+	—	995	439
1-72	5456–6094	—	—	12	638
3-46	3309–4439	—	+	146	1130
3-23	4440–5621	—	—	4	1181
3-37	4440–5686	—	—	*	1246
3-92	1929–4439	—	—	16	2510
3-59	4440–5815	+	+	Целый	1375
1-14	5456–8023	+	+	Целый	2567
1-56	2842–5448	—	—	29	2606
1-68	3951–6749	—	—	Нет	2798
1-1	2141–5448	+	+	Целый	3307
3-47	4440–...	+	—	*	Удалены диски 70F1-2 и 70E7
3-74		—	—	*	То же
1-25		—	—	Нет	Удалены диски 70F1-2, 70E7 и 70E4-5
3-57	4440–...	+	—	*	То же
3-101	4440–...	+	—	*	Удалены диски 70F1-2, 70E7, 70E4-5 и 70E1-2
1-3	...–5448	*	+	*	*
1-36	...–5448	*	+	*	*

* нет данных

Полученные в работе 23 перестройки, (20 делеций и три дупликации), затрагивающие последовательность второго интрона гена *Trl* могут быть разделены на две группы.

К первой группе были отнесены пять очень больших делеций, которые можно было прокартировать только с помощью световой микроскопии. К этим мутациям гена *Trl* относятся мутации 3-47, 3-57, 3-101, 1-3 и 1-36 (табл. 4).

Как показано на рисунке, в 70F районе, согласно карте Бриджеса 1941 года, находится 2 двойных диска (F1-2 и F5-6) и 3 одиночных диска (рис. 37 А). С помощью светового микроскопа в хромосомах линии дикого типа (*Oregon R*) в этом районе видны два плотных диска, соответствующих дискам 70F1-2 и 70F4 на карте Бриджеса (рис. 37 Б). В линиях 3-47 и 3-74 в результате делеций удаляются диски 70F1-2–70E7 (рис. 37 В, Г). В линиях 1-25 и 3-57 удаляются диски 70F1-2–70E4-5 (рис. 37 Д, Е), а в линии 3-101 в результате делеции удаляются диски 70F1-2–70E1-2 (рис. 37 Ж). Таким образом, во всех проанализированных с помощью светового микроскопа линиях удаляется диск 70F1-2, тогда как другая граница делеций может локализоваться в различных дисках. Это свидетельствуют о том, что ген *Trl D. melanogaster* локализуется именно в диске 70F1-2. До настоящего момента существовало несколько различных точек зрения о локализации гена *Trl* на цитологической карте. Все они были основаны на данных гибридизации *in situ*, что не позволяло провести с достаточно большой точностью картирование гена. По данным Соллера и соавт. (Soeller *et al.*, 1993), а также Дорна и соавт. (Dorn *et al.*, 1993) ген *Trl* располагается в районе 70EF, тогда как Секельски с соавт. (Sekelsky *et al.*, 1999) и Перелыгина с соавторами (Перелыгина *и др.*, 1992) полагали, что ген *Trl* локализован в районе 70F. В работе Спрадлинга и соавт. (Spradling *et al.*, 1999) данный ген был локализован в районе 70F1-4, а в работе Фаркас с соавт. (Farkas *et al.*, 1994) — в районе 70F1-2. Результаты проведенного нами картирования полученных нами перестроек позволили однозначно установить то, что ген *Trl* локализован в районе 70F1-2 и подтвердить правильность локализации гена в работе Фаркас с соавторами.

Во вторую группу входят более мелкие делеции, которые удалось прокартировать с помощью молекулярно-биологических методов (табл. 4). Эти делеции были разделены на две подгруппы.

Первую подгруппу составляют протяженные делеции, удаляющие не только область второго интрона, но и кодирующие районы гена. Это делеции:

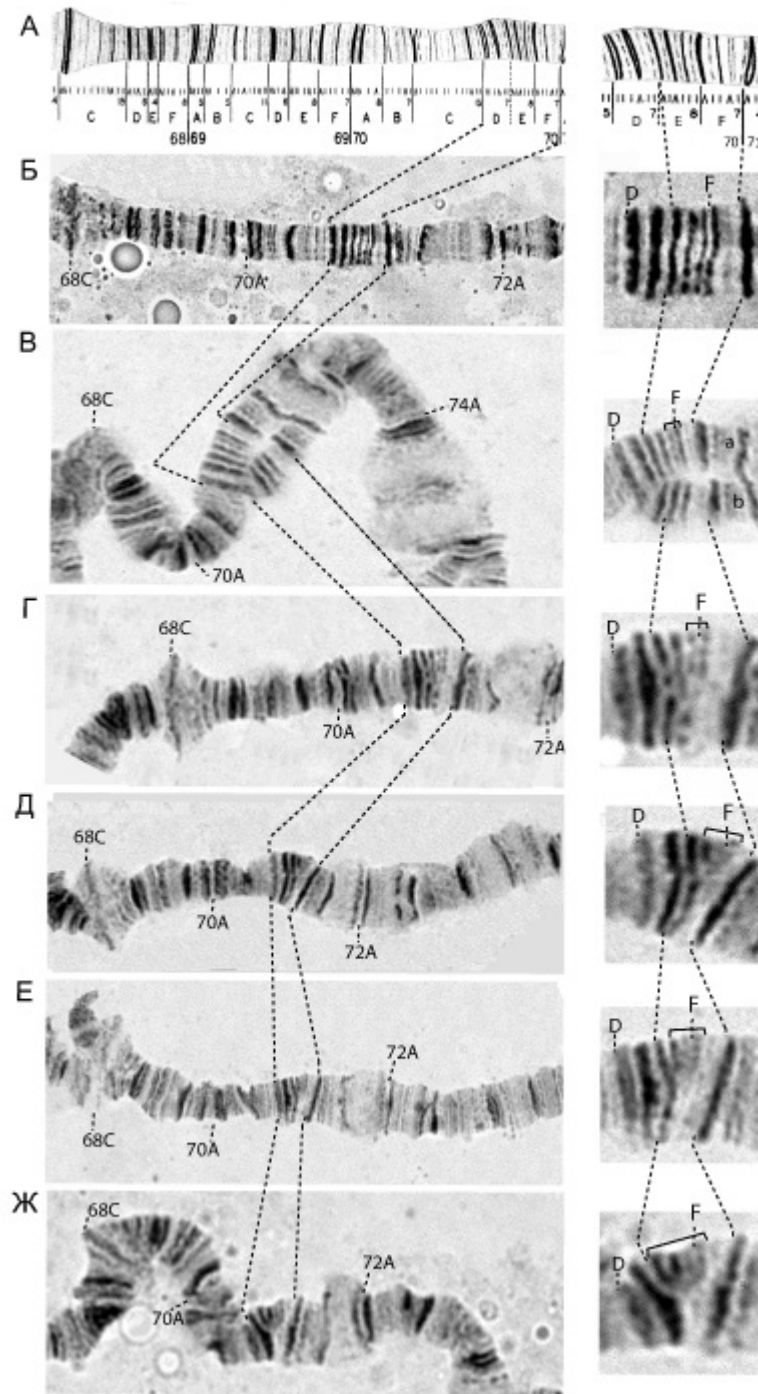


Рис. 37. Картирование делеций, затрагивающих второй интрон гена *Trl*, с помощью световой микроскопии: А — фрагмент карты Бриджеса; Б — фрагмент 3L-хромосомы в линии *Oregon R*, сделанной с помощью светового микроскопа; В-Ж — фрагменты 3L-хромосомы в гетерозиготах *M/Oregon R*, сделанные с помощью светового микроскопа, М — анализируемая делеция: В — делеция *Trl³⁻⁷⁴*; Г — делеция *Trl³⁻⁴⁷*, Д — делеция *Trl¹⁻²⁵*, Е — делеция *Trl³⁻⁵⁷*; Ж — делеция *Trl³⁻¹⁰¹*. Справа представлен увеличенный район 70D-71A в соответствующих линиях. Скобками указаны удаленные в результате делеций диски.

- Trl^{l-1}* — длиной 3307 п. н., удаляет часть второго интрона, а также экзоны 1, 2 и часть 5'-области гена;
- Trl^{l-14}* — длиной 2567 п. н., удаляет конец второго интрона, а также экзоны 3, 4, 5a и большую часть экзона 5b;
- Trl^{l-56}* — длиной 2606 п. н., удаляет часть второго интрона, а также экзоны 1, 2 и часть 5'-области гена;
- Trl^{l-68}* — длиной 2798 п. н., удаляет 2 экзон, весь второй интрон, а также большую часть 3 экзона;
- Trl³⁻⁴⁶* — длиной 1130 п. н., удаляет часть второго интрона, а также экзон 1d;
- Trl³⁻⁹²* — длиной 2510 п. н., удаляет часть второго интрона, а также экзоны 1, 2 и часть 5'-области гена.

Все мутации, входящие в данную подгруппу, сохраняют фрагменты *P*-элемента или даже его целиком. Исключением является мутация *Trl^{l-68}*, в которой транспозон оказался удален полностью (ТАБЛ. 4).

Вторую подгруппу составляют небольшие делеции, не выходящие за пределы второго интрона гена. Это делеции:

- Trl^{l-23}* — удаляет участок длиной 439 п. н. во второй половине второго интрона (5456–5895). От транспозона сохранилось 995 п. н. с 5'-конца.
- Trl^{l-72}* — удаляет участок во второй половине второго интрона длиной 638 п. н. (5456–6094), сохранилось 12 п. н. транспозона.
- Trl³⁻²³* — удаляет участок длиной 1181 п. н. в середине второго интрона (4440–5621), сохранилось 4 п. н. транспозона.
- Trl³⁻³⁷* — удаляет участок второго интрона длиной 1246 п. н. (4440–5686), транспозон удален полностью.
- Trl³⁻⁴⁸* — удаляет участок в 48 п. н. в начале второго интрона (4440–4485), сохранился фрагмент в 26 п. н. транспозона.
- Trl³⁻⁵⁹* — удаляет фрагмент второго интрона гена длиной 1375 п. н. (4440–5815) с сохранением полноразмерного транспозона.
- Trl³⁻⁸⁵* — удаляет фрагмент длиной 146 п. н. (4440–4586). От транспозона осталось 26 п. н.

Именно делеции, входящие в состав этой группы, были подробно исследованы для выяснения регуляторного потенциала второго интрона гена *Trl*.

3.3.2. Жизнеспособность мутантов с нарушением структуры второго интрона гена *Trl*

В ходе работы нами было установлено, что удаление тех или иных участков второго интрона гена *Trl* влияет на жизнеспособность мутантов (Федорова и др., 2006). Это может свидетельствовать в пользу того, что в удаленном участке могут располагаться функционально-значимые сайты. В работе анализировалась жизнеспособность гетерозигот, несущих мутации по второму интрону гена *Trl* в сочетании с нуль-аллелями гена *Trl* — делециями *Trl^{R85}* и *Trl^{R67}*. В линии 3-59, которая изначально содержала *P*-элемент, последний был впоследствии удален, поскольку он мог негативно влиять на выживаемость мух.

В ТАБЛ. 5 представлены результаты анализа выживаемости мутантов, имеющих структурные нарушения второго интрона гена *Trl*. Из представленных данных следует, что при температуре 25°C выживаемость мутантов *Trl^{l-23}* и *Trl^{l-72}* снижена незначительно по сравнению с контролем, тогда как выживаемость мутантов *Trl³⁻⁸⁵*, *Trl³⁻²³* и *Trl³⁻⁵⁹* снижена уже достаточно заметно. В условиях же слабого теплового шока (29°C): выживаемость компаундов *Trl^{l-23}/Trl^{R85}* и *Trl^{l-72}/Trl^{R85}* снижена весьма сильно и составляет соответственно 7 % и 12 %, что существенно ниже, чем в контроле. Выживаемость же мутантов *Trl³⁻²³* и *Trl³⁻⁵⁹* в условиях теплового шока снижается совсем незначительно по сравнению с контролем. Аналогичные результаты были получены и при анализе гетерозигот,

Табл. 5. 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>Trl³⁻⁸⁵/Trl^{R85}</i>	786	0,63±0,017***	217	0,51±0,034 _{ндр}
<i>Trl³⁻²³/Trl^{R85}</i>	1046	0,57±0,015***	1690	0,40±0,012***
<i>Trl^{3-59(ex)}/Trl^{R85}</i>	1569	0,53±0,013***	1120	0,35±0,014***
<i>Trl^{l-23}/Trl^{R85}</i>	310	0,84±0,021 _{ндр}	261	0,07±0,016***
<i>Trl^{l-72}/Trl^{R85}</i>	843	0,76±0,015***	1165	0,12±0,009***
<i>Trl^{EP(3)3184}/Trl^{R85}</i>	215	0,61±0,034 _{ндр}	877	0,51±0,017***
<i>Oregon R/Trl^{R85}</i>	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

где анализируемые мутации сочетались с другим нуль-аллелем — *Trl*^{R67} (данные здесь не приводятся).

Таким образом, с помощью генетических методов было выявлено влияние двух районов второго интрона гена *Trl* на выживаемость дрозофил при различных температурах, что может свидетельствовать о нахождении в этих районах регуляторных последовательностей, важных для обеспечения нормального уровня экспрессии гена *Trl*.

3.3.3. Анализ экспрессии гена *Trl* у мутантов с нарушенной структурой второго интрона гена

Мутанты *Trl*^{l-23} и *Trl*^{l-72} продемонстрировали самое значительное снижение жизнеспособности при повышении температуры, что позволяет сделать заключение о том, что район второго интрона, удаляющийся этими делециями, содержит какой-то функционально-значимый элемент, имеющий отношение к температурной чувствительности дрозофилы, а удаление данного района может привести к изменению экспрессии гена.

Для анализа экспрессии мы выбрали мутантов *Trl*^{l-72}, поскольку у мутантов *Trl*^{l-23} сохранился кусок транспозона, что может исказить полученные результаты. Используя Нозерн-блот гибридизацию, мы обнаружили, что у *Trl*^{l-72} мутантов действительно изменен характер экспрессии гена. Как показано на рис. 38 при температуре 25 °С в норме в ходе эмбриогенеза наблюдаются два транскрипта, длиной 2,5 и 3 т. н. Транскрипт длиной 2,5 т. н. является основным в течение первых стадий эмбриогенеза, а на 12–16 стадиях эмбриогенеза его количество снижается. Однако на этих стадиях начинает увеличиваться количество транскрипта длиной 3 т. н., который на последних стадиях эмбриогенеза становится доминирующим. Нами были получены данные о том, что картина экспрессии гена *Trl* у *Trl*^{l-72} мутантов при температуре 29 °С точно такая же как и при нормальной температуре (данные не приводятся). В то же время следует напомнить, что значительное уменьшение жизнеспособности у этих мутантов наблюдается именно в условиях слабого теплового шока, тогда как изменение транскрипции, проявляющееся в изменении соотношения транскриптов, обнаружено нами не только при нормальной температуре, но также и при повышенной температуре. Гибридизация с экзон-специфичными зондами (рис. 38 С) показала, что транскрипт длиной 2,5 п. н. соответствует изоформе GAGA-519, а транскрипт длиной

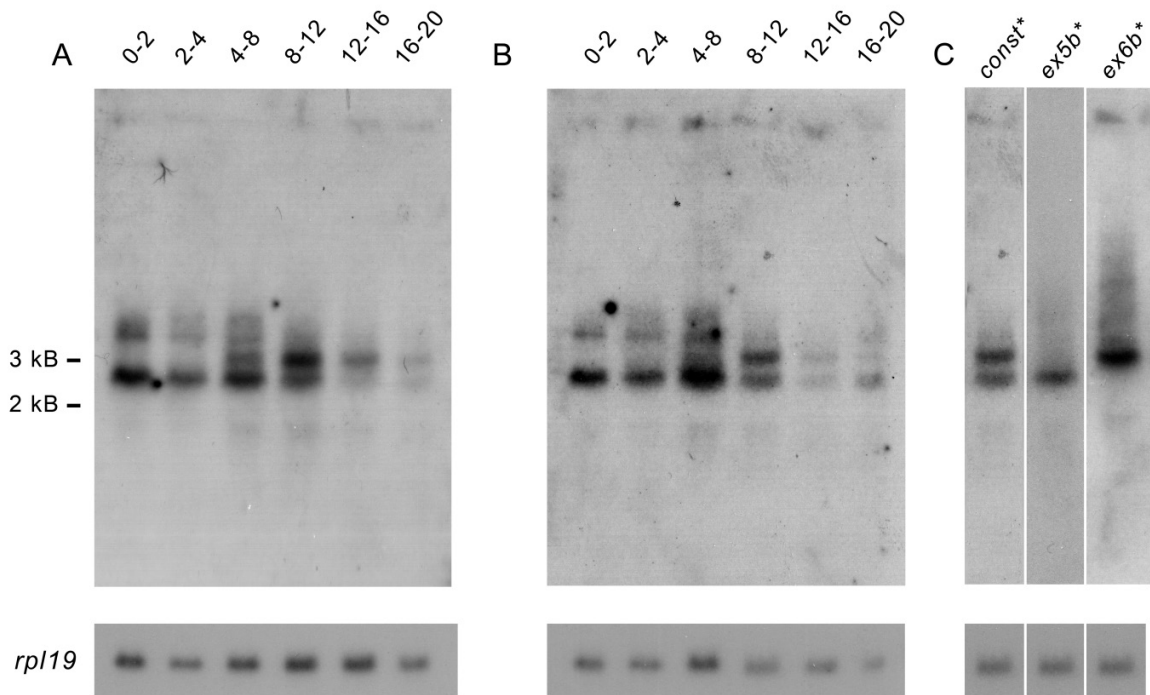


Рис. 38. Нозерн-блот анализ экспрессии гена *Trl*. (А, В) Анализ РНК, выделенной из эмбрионов дикого типа (А), и гомозиготных по мутации *Trl*¹⁻⁷² (В). Блоты А и В гибридизованы с пробой к константной области гена *Trl* (экзоны 2, 3, 4). РНК гена, кодирующего рибосомальный белок L19 (*rpl19*), была использована в качестве контроля нанесения. Выше блотов показаны стадии развития эмбрионов в часах. (С) Нозерн-блоты, содержащие суммарную РНК из эмбрионов, гомозиготных по мутации *Trl*¹⁻⁷², на стадии 8–12 часов развития, гибридизованные с пробами: const* — к константной части гена, ex5b* и ex6b* специфичными к транскриптам 2,5 и 3 т. н. соответственно.

3 т. н. — изоформе GAGA-581. Несоответствие в жизнеспособности и изменении транскрипции гена *Trl* у мутантов может объясняться тем, что при повышенной температуре доминирующая у мутантов изоформа GAGA-519, соответствующая транскрипту 2,5 т. н., меняет конформацию и не может эффективно исполнять свои функции, как она это делает при нормальной температуре.

3.3.4. Анализ молекулярной структуры второго интрона гена *Trl*

Поскольку нами было установлено, что определенные нарушения структуры второго интрона сказываются на онтогенезе мутантов, а также на экспрессии у них гена *Trl*, было высказано предположение о том, что в данном месте локализуются функционально-значимые последовательности, необходимые для

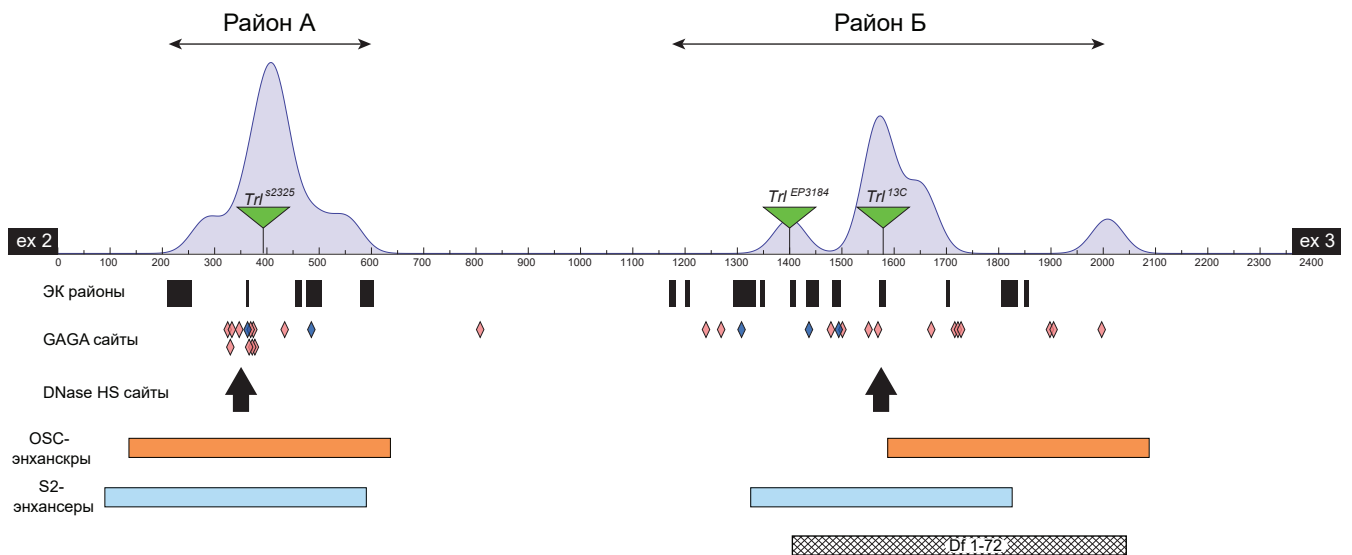


Рис. 39. Структура второго интрона гена *Trl*. Длина интрона 2,3 т. п. н. Треугольникам отмечены инсерции *P*-элементов у мутантов *Trl*^{l(3)52325}, *Trl*^{EP(3)3184} и *Trl*^{13C}. Сверху представлена гистограмма по распределению частоты инсерций *P*-элементов в данном интроне. Под линией показаны 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*^{l-72} изображена внизу в виде прямоугольника (*Df* 1-72).

обеспечения нормальной экспрессии гена. Для того, чтобы подтвердить данное предположение мы провели ряд исследований.

Во-первых, мы осуществили поиск в данном районе участков, чувствительных к действию ДНКазы I, поскольку их присутствие считается показателем функциональной значимости последовательностей. Нами было установлено, что действительно во втором интроне гена *Trl* располагаются районы, чувствительные к действию ДНКазы I (Karagodin *et al.*, 2013). Один из этих районов локализуется во фрагменте, удаляемом делецией *Trl*^{l-72}. Второй район, гиперчувствительный к действию ДНКазы I, располагается в начале второго интрона (рис. 39). Чувствительность к действию этой нуклеазы отражает открытую конформацию хроматина. О том, что эти два района характеризуются открытой конформацией хроматина говорит также тот факт, что именно в них наблюдается и преимущественное встраивание транспозонов.

Во-вторых, поскольку известно, что белок GAGA играет ключевую роль в поддержании открытой конформации хроматина в местах связывания (Farkas *et al.*, 2000), мы исследовали наличие сайтов связывания данного белка во втором интроне гена *Trl*. Используя разработанные и экспериментально верифицированные

методы компьютерного поиска GAGA сайтов типов GAGnGAG и GAGnnnGAG, которые позволяют выявлять большинство сайтов связывания этого фактора (Omelina *et al.*, 2011), мы нашли в этом интроне 29 потенциальных GAGA сайтов (рис. 39). 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 рис. 39, предсказанные GAGA сайты в основном локализируются в двух районах (А и В), где наблюдается наибольшая встречаемость инсерций транспозонов и сайты гиперчувствительности к действию ДНКазы. 12 GAGA сайтов расположены в первом районе (А) и 17 во втором районе (Б) второго интрона гена *Trl*. В центральной части интрона был найден только один потенциальный сайт связывания белка GAGA. С помощью гель-ретардации был установлен высокий уровень связывания предсказанных с помощью компьютерных методов GAGA сайтов с рекомбинантным белком His-GAGA (Omelina *et al.*, 2011). Было продемонстрировано, что белок GAGA связывается с 72 % предсказанных сайтов типа GAGnGAG и 94,5 % сайтов типа GAGnnnGAG. Поэтому мы проверили связывание не всех выявленных во втором интроне сайтов, а только шести из них. Они расположены в позициях 50, 330, 358, 439, 1495, 1903 п. н. относительно начала интрона (рис. 39). Было установлено, что пять из шести проанализированных сайтов связываются с белком GAGA и только один сайт в позиции 50 п. н. с ним не связывается.

В-третьих, мы осуществили поиск эволюционно-консервативных последовательностей во втором интроне гена *Trl*. Известно, что высокий уровень гомологии той или иной последовательности у разных видов *Drosophila* может свидетельствовать о ее функциональной значимости (Gumucio *et al.*, 1993; Hartl & Lozovskaya, 1994; Shelton *et al.*, 1997). В интронах генов часто локализируются эволюционно-консервативные последовательности, в которых могут располагаться регуляторные элементы. Например, интрон мышинного гена Ноха-7, характеризующийся консервативностью, содержит энхансерный элемент, который функционирует и у *Drosophila* (Haerry & Gehring, 1997). Мы установили, что во втором интроне гена *Trl* присутствует много эволюционно-консервативных последовательностей. У близко родственных видов *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba* и *D. erecta* более чем 63 % последовательности второго интрона имеет 100 % гомологии с аналогичными последовательностями *D. melanogaster*, а 15–30 % последовательностей имеют только точковые замены. Наибольшая степень гомологии выявлена в кластерах А и В (рис. 39). В средней части

эволюционно-консервативных фрагментов часто располагаются GAGA сайты. Важно, что даже у сильно удаленных видов, таких как *D. persimilis*, *D. virilis*, *D. mojavensis* и *D. grimshawi*, 15–22 % последовательностей были полностью гомологичны последовательностям *D. melanogaster*, а 4–7 % последовательностей имели только единичные замены. При этом наиболее часто эволюционно-консервативные последовательности наблюдаются именно в пределах кластеров А и В. Считается, что *D. melanogaster* и *D. virilis* разошлись не менее 40 млн. лет (Russo *et al.*, 1995), поэтому наличие во втором интроне гена *Trl* таких консервативных последовательностей может свидетельствовать об их функциональной значимости.

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 транскрипционных факторов, включая Zn finger homeodomain 1, disconnected, Ultrabithorax, Kruppel, huckebein, knot, groucho, scribbler, Dichaete, jumeau, knirps, nejire, even skipped и другие. Следует отметить, что частота встречаемости сайтов транскрипционных факторов 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). Сегодня районы некодирующей ДНК, которые находятся под эволюционным давлением, а также содержат кластеры связывания многих транскрипционных факторов, рассматриваются как cis-regulatory modules (CRMs), которые описаны для многих организмов (Hardison & Taylor, 2012; Kim *et al.*, 2009). Поэтому районы А и Б во втором интроне гена *Trl*, которые, как показано на рис. 39, содержат гиперчувствительные районы, большое число сайтов связывания транскрипционных факторов, а также эволюционно-консервативные районы, могут рассматриваться как CRMs.

Заключение

Таким образом, проведенные нами исследования впервые позволили продемонстрировать нахождение во втором интроне гена *Trl* функционально значимых для его активности последовательностей. Мы установили, что во втором интроне гена *Trl* располагаются сайты, гиперчувствительные к действию ДНКазы I, эволюционно-консервативные последовательности и многочисленные сайты связывания белка GAGA и других ТФ. Эти последовательности локализуются

в основном в кластерах А и Б, куда предпочитают встраиваться и транспозоны (рис. 39). Удаление Б района в результате делеции *Trl^{l-72}* приводит к уменьшению жизнеспособности мутантов и изменению у них транскрипции гена *Trl*. 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 (Arnold *et al.*, 2013). В своей работе авторы использовали разработанный ими STARR-seq метод, который позволил провести сравнительный анализ работы репортерного гена под контролем промотора и одного из множества фрагментов геномной ДНК (совокупно фрагменты перекрывали практически весь геном дрозофилы). Это дало возможность количественно оценить активность подавляющего большинства присутствующих в геноме дрозофилы энхансеров. Оказалось, что более 55 % всех энхансеров локализуется именно в интронах генов дрозофилы.

Характерной особенностью второго интрона гена *Trl* является наличие в нем множественных сайтов связывания транскрипционного фактора GAGA. Как уже упоминалось выше, их число во втором интроне в 16–17 раз превышает среднюю плотность таких сайтов в геноме *D. melanogaster* и намного выше, чем в интронах других генов (Omelina *et al.*, 2011). Следует отметить, что 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. Можно предложить несколько гипотез объясняющих высокую плотность GAGA сайтов во втором интроне гена *Trl*. Возможно, это связано с участием GAGA в элонгации транскрипции гена. Об участии GAGA в элонгации транскрипции генов говорит ряд данных (O'Brien *et al.*, 1995; Orphanides *et al.*, 1998; van Steensel *et al.*, 2003). Во-первых, известно о взаимодействии GAGA и белкового комплекса dFACT, участвующего в процессе элонгации (Shimojima *et al.*, 2003). Во-вторых, участием GAGA в элонгации транскрипции генов можно объяснить высокую частоту GAGA сайтов в интронах многих генов дрозофилы (Omelina *et al.*, 2011; van Steensel *et al.*, 2003). Однако следует отметить, что высокая концентрация GAGA сайтов характерна для 5'-района гена *Trl*, а также для второго интрона гена, но не характерна для ниже расположенных районов. Поэтому более вероятными представляются другие гипотезы, объясняющие множественность сайтов связывания GAGA во втором интроне гена *Trl*. Возможно,

что GAGA требуются для создания и поддержания открытой структуры хроматина в районах второго интрона гена, 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 (Kosoy *et al.*, 2002). Как было показано ранее, сайты связывания белка GAGA, расположенные в его 5'-регуляторной области имеют большое значение для авторегуляции. Нами было показано, что удаление фрагмента второго интрона (район Б) гена, в котором расположены сайты связывания GAGA белка также имеют значение для регуляции экспрессии *Trl* гена. Их 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 представленность по разному меняется при удалении 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. GAGA сайты, расположенные во втором интроне и в промоторной области гена *Trl* могут обеспечивать необходимый контакт между регуляторными элементами, расположенными в 5'-регуляторной области *Trl* и его втором интроне.

3.4. Ген *Trl* и оогенез *Drosophila melanogaster*

Поскольку выше было продемонстрировано, что большинство гипоморфных мутаций по гену *Trl* вызывает резкое снижение яйценоскости, мы провели анализ оогенеза у этих мутантов. В анализе использовались яичники самок генотипа M/Trl^{R85} , где *M* — анализируемая мутация гена *Trl*, а *Trl^{R85}* — нуль-аллель гена. Использование гетерозигот позволяет исключить побочные эффекты в оогенезе, не связанные с мутациями по гену *Trl*. В анализе влияния гена *Trl* на оогенез дрозофилы мы использовали полученные нами мутации, затрагивающие 5'-область гена, поскольку они, вызывают особые проблемы с фертильностью самок. В результате нами были обнаружены многочисленные

нарушения в развитии яйцевой камеры на протяжении всего процесса оогенеза у всех исследованных *Trl*-мутантов.

На рис. 40 показана овариола мутантов *Trl⁴⁻²⁸⁵*. Как отмечалось выше, из всех полученных нами гипоморфных мутантов самки только этих мутантов с нарушенной структурой 5'-области фертильны в гомозиготе или в сочетании с нуль-аллелем. Но даже у этих мутантов овариолы сильно отличаются от нормы. Так, яйцевые камеры мутантов кажутся слитными, поскольку в овариолах не удастся увидеть интерфолликулярные клетки, в норме разъединяющие камеры между собой. Кроме того, у *Trl*-мутантов выявлен целый ряд дефектов, которые затрагивают все типы клеток яйцевых камер мутантов.

В целом у *Trl*-мутантов в яйцевых камерах были обнаружены нарушения:

1. в структуре и количестве питающих клеток;
2. в форме и расположении ооцита;
3. в функционировании разных типов фолликулярных клеток.

Эти нарушения встречаются во всех анализируемых линиях мутантов *Trl*, но частота их встречаемости различна у разных мутантов. Ниже мы подробно

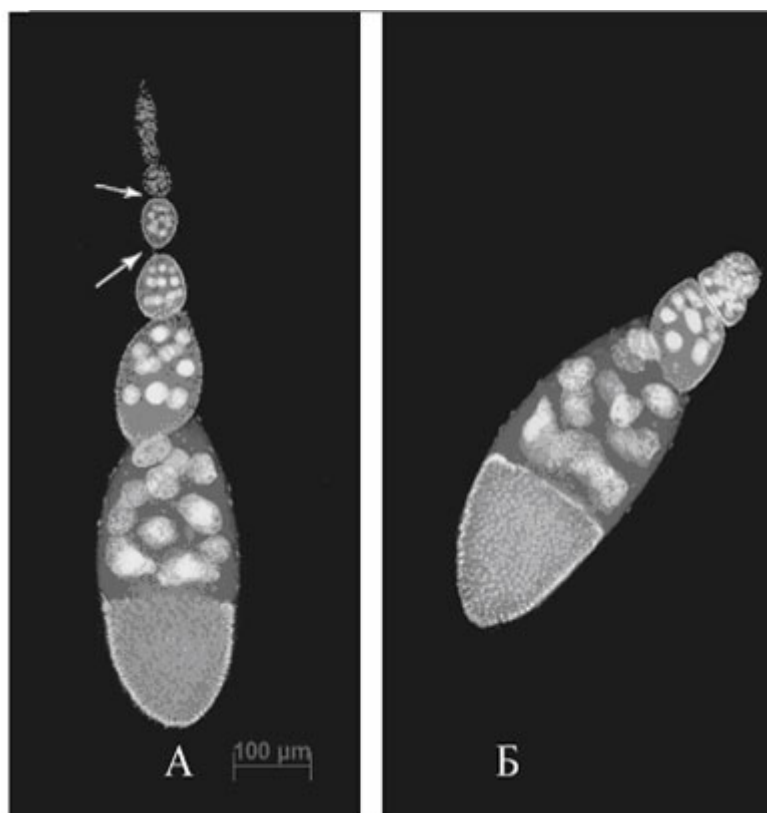


Рис. 40. Яичники дрозофилы. (А) Овариола самок дикого типа. Интерфолликулярные клетки, разделяющие яйцевые камеры указаны стрелками. (Б) Овариола самок *Trl*-мутанта (*Trl⁴⁻²⁸⁵*). Интерфолликулярные клетки, разделяющие яйцевые камеры не прослеживаются. Ядра клеток окрашены DAPI. Увеличение x20.

остановимся на описании всех основных нарушений, наблюдаемых в клетках яйцевой камеры *Trl*-мутантов.

3.4.1. Морфологические нарушения, наблюдаемые в питающих клетках *Trl*-мутантов

3.4.1.1. Нарушение числа питающих клеток *Trl*-мутантов

В норме в ходе оогенеза яйцевая камера, покидающая гермарий, содержит один ооцит и 15 питающих клеток (рис. 41 В). Нами установлено, что у *Trl*-мутантов наблюдается много камер с отличным от нормы числом питающих клеток (рис. 41 А, Б; [Огиенко и др., 2006](#); ТАБЛ. 6).

Из представленных в таблице данных следует, что все проанализированные мутации приводят к увеличению количества камер с нарушением числа питающих клеток, хотя и в различной степени. Максимальной долей камер с нарушениями характеризуются мухи, несущие делецию *Trl^{ex(15)}*, удаляющую первые два старта транскрипции и большой район, расположенный выше, а также *Trl³⁶²* мутанты. У последних мутантов также удалены первые два старта,

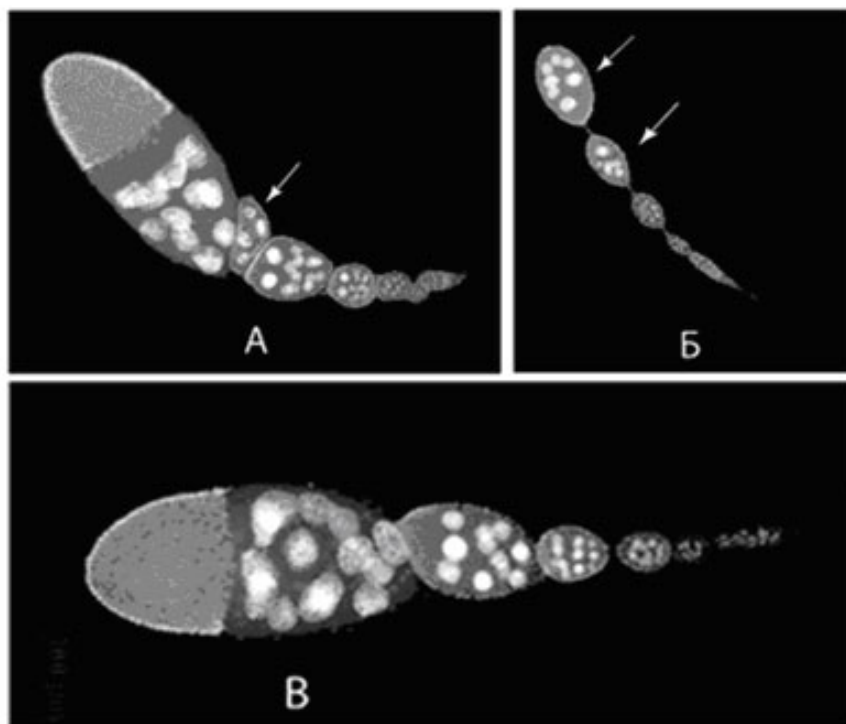


Рис. 41. Овариолы самок дрозофилы. (А, Б) Овариола *Trl*-мутантов (*Trl⁴⁻²⁸⁵*). Стрелками показаны камеры с нарушенным числом питающих клеток. (В) Овариола самок дикого типа. Каждая яйцевая камера содержит 15 питающих клеток и 1 ооцит. Окрашивание ядер проводилось с помощью DAPI. Увеличение x20.

Табл. 6. Анализ нарушений числа питающих клеток в яйцевых камерах мутантов.

Генотип	Общее кол-во просчитанных камер, шт.	Общее кол-во камер с нарушениями, шт.	Доля камер с нарушениями от общего числа просчитанных камер, %.
<i>Oregon R/Trl^{R85}</i>	415	13	3,13
<i>Trl^{ex(15)}/Trl^{R85}</i>	258	59	22,87
<i>Trl^{362(ex)}/Trl^{R85}</i>	361	70	19,39
<i>Trl⁴⁻²⁸⁵/Trl^{R85}</i>	675	37	5,48
<i>Trl³⁶²/Trl^{R85}</i>	364	134	36,81
<i>Trl^{en82}/Trl^{R85}</i>	402	17	4,22

а встройка транспозона разобщает оставшиеся старты от выше расположенных регуляторных районов. Как показывалось выше, обе мутации снижают уровень транскрипции гена *Trl* в яичниках практически до нуля. Следует однако отметить, что количество камер с нарушенным числом питающих клеток не прямо коррелирует с уровнем снижения количества белка GAGA в яйцевых камерах. Так в линиях *Trl⁴⁻²⁸⁵* и *Trl^{en82}* транскрипция гена *Trl* в яичниках снижена примерно на треть, а у мутантов *Trl^{362(ex)}* в целых яичниках мы не нашли снижения экспрессии. Однако, у мутантов *Trl⁴⁻²⁸⁵* и *Trl^{en82}* число камер с нарушенным числом питающих клеток незначительно и составляет 5,48 % и 4,22 %, соответственно, тогда как у *Trl^{362(ex)}* мутантов оно много выше и равно 19,39 %. Таким образом, нами продемонстрировано, что серьезные проблемы с числом питающих клеток выявлены у мутантов, с нехваткой именно первых двух стартов транскрипции, как это наблюдается у мутантов *Trl^{ex(15)}*, *Trl³⁶²* и *Trl^{362(ex)}*. В то же время другие нарушения 5'-области гена (мутации *Trl⁴⁻²⁸⁵* *Trl^{en82}*) не приводят к таким серьезным проблемам с числом питающих клеток.

Изменение числа питающих клеток в яйцевых камерах *Trl*-мутантов может быть обусловлено:

- 1) Отличным от нормы числом делений цистобласта. Цистобласты, находящиеся в гермариум, в норме претерпевают 4 деления в результате чего образуется циста, состоящая из 16 клеток, одна из которых в дальнейшем станет ооцитом, а остальные 15 — питающими клетками.

Если число делений отличается от 4, тогда будет формироваться циста с неправильным числом питающих клеток. Однако в таком случае их число всегда будет соответствовать формуле $2^n - 1$.

- 2) Неправильным обволакиванием цисты фолликулярными клетками, в результате чего в формирующуюся яйцевую камеру могут попадать клетки соседней цисты. Обволакивание цисты фолликулярными клетками происходит в германии. Если этот процесс нарушен, то клетки зародышевого пути из соседних цист могут перемешаться. Таким образом, две соседние цисты будут нести необычное число питающих клеток.

Именно такой вариант наблюдается в яйцевых камерах *Trl*-мутантов. Характерной особенностью проанализированных нами *Trl*-мутантов является наличие яйцевых камер с нарушенным числом питающих клеток, расположенных в овариоле последовательно друг за другом, причем сумма питающих клеток в двух последовательно расположенных яйцевых камерах с нарушенным числом трофоцитов равна или кратна 15, как это показано на рис. 42. Кроме того нами было установлено, что ооциты во всех яйцевых камерах с нарушениями числа питающих клеток обладают четырьмя кольцевыми канальцами (Огиенко и др., 2006). Следовательно, стволовая половая клетка, дающая начало ооциту и трофоцитам, проходит, как и положено, четыре цикла деления. Таким образом,

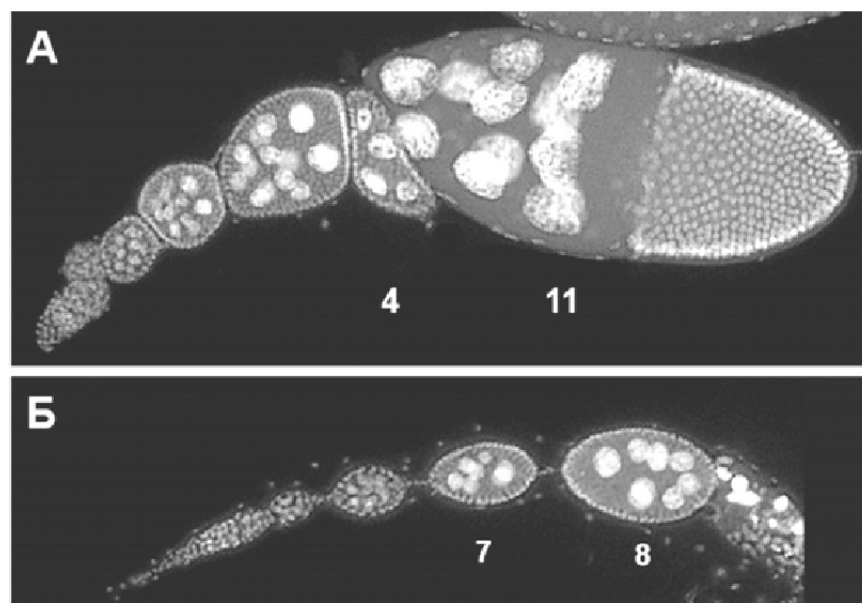


Рис. 42. Морфология яичников мутантов (А) *Trl*³⁶² и (Б) *Trl*^{362(ex)}, выявленная при окрашивании с помощью DAPI. А — в овариоле находятся две расположенные рядом камеры, в которых число питающих клеток составляет четыре и одиннадцать. Б — в овариоле присутствуют две камеры с числом питающих клеток семь и восемь.

изменения в числе питающих клеток у *Trl*-мутантов может быть объяснено не изменением в числе делений претерпеваемых стволовой половой клеткой, а скорее, нарушением процесса обволакивания цисты фолликулярными клетками на ранних стадиях оогенеза, т. е. в гермариин. Это свидетельствует о том, что у *Trl*-мутантов с удаленными двумя первыми стартами транскрипции нарушено функционирование соматических клеток в камерах уже на ранних стадиях оогенеза.

Таким образом, мы установили, что удаление двух первых сайтов инициации транскрипции у мух, несущих делеции *Trl^{ex(15)}*, *Trl³⁶²* и *Trl^{362(ex)}*, приводит к большому числу камер с нарушениями в числе питающих клеток. Этот дефект, скорее всего, обусловлен нарушением процесса обволакивания цисты фолликулярными клетками. Другие нарушения структуры гена не приводят к значительному увеличению числа камер с неправильным количеством питающих клеток. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что два первых сайта инициации транскрипции важны именно для правильного функционирования соматических клеток. Следует отметить, что у мутантов с сохраненными первыми стартами транскрипции (*Trl^{en82}/Trl^{R85}*, *Trl⁴⁻²⁸⁵/Trl^{R85}*) камеры с неправильным количеством питающих клеток встречаются намного реже.

3.4.1.2. Изменение структуры хроматина в питающих клетках *Trl*-мутантов

Питающие клетки всех проанализированных нами *Trl*-мутантов характеризуются еще одним нарушением — аномальной конденсацией хроматина, которая встречается у них в основном на стадиях 9–10 развития яйцевой камеры. (рис. 43 А, Б). Стадии развития яйцевых камер даны в соответствии с классификацией Кинга ([King, 1970](#)).

Морфологически камеры с конденсированным хроматином очень похожи на апоптирующие яйцевые камеры, что подтверждает окрашивание красителями, включая акридин оранжевый, выявляющими апоптирующие ядра. Следует отметить, что в норме деградация яйцевых камер вследствие апоптоза если и происходит, то на более ранней, восьмой стадии развития яйцевой камеры (рис. 43 В). Таким образом, нами отмечено, что недостаток белка GAGA приводит к усилению процесса конденсации хроматина в яйцевых камерах дрозофилы и смещению данного процесса во времени. Следует отметить, что при анализе

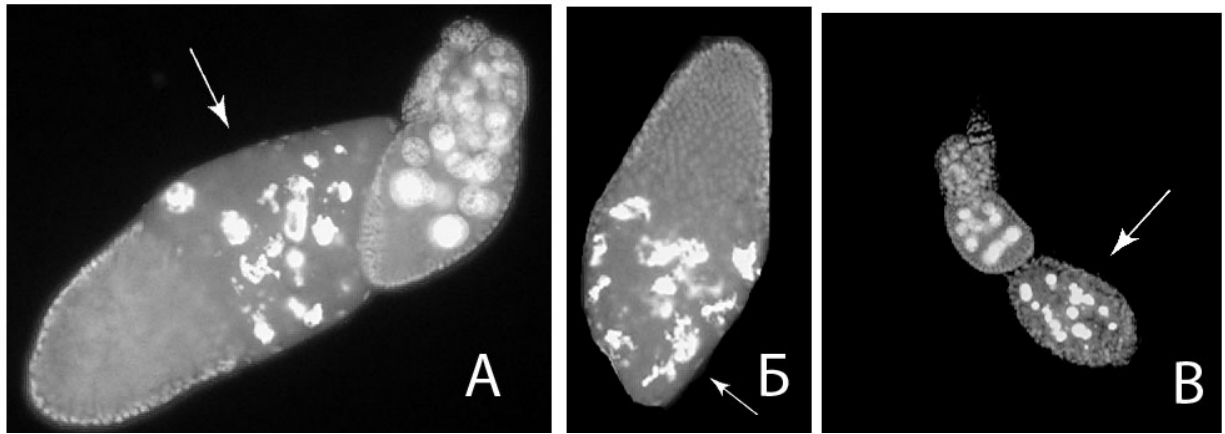


Рис. 43. Конденсация хроматина в питающих клетках *Trl*-мутантов. (А, Б) Мутант *Trl⁴⁻²⁸⁵*. Конденсация происходит на 9–10 стадии, о чем свидетельствует положение ооцита. (В) Камеры дикого типа. Конденсация, если и происходит, то на более ранней стадии развития камеры. Стрелками показаны камеры с конденсированным хроматином. Окрашивание DAPI. Увеличение $\times 20$.

развития глаза дрозофилы у мутантов по гену *Trl* Дос-Сантос с соавторами установили что в развивающемся глазу *Trl*-мутантов наблюдается избыток вторичных и третичных пигментных клеток (Dos-Santos *et al.*, 2008). Причиной этого, по мнению авторов, является уменьшение случаев апоптоза. Известно, что в норме с помощью апоптоза уничтожается излишек предшественников вторичных и третичных пигментных клеток в развивающемся глазу дрозофилы на стадии 25–35 часов после окукливания. Таким образом, уменьшение количества белка GAGA в яичниках мутантов *Trl* приводит к усилению апоптоза, тогда как при формировании глаза, наоборот, наблюдается ослабление апоптоза. Вероятно, это связано с двойственной природой данного транскрипционного фактора GAGA, который может выступать как активатором, так и репрессором экспрессии генов, регулирующих процесс апоптоза.

Мы исследовали, как зависит количество камер с конденсированным хроматином от характера мутации гена *Trl* (табл. 7). Наибольшая доля камер с конденсированным хроматином обнаружена у тех мутантов, у которых наиболее сильно снижена экспрессия гена *Trl*, т. е. у мутантов *Trl³⁶²* и *Trl^{en82}*. В то же время, удаление двух первых стартов транскрипции у мутантов *Trl^{362(ex)}*, не приводит к серьезному увеличению числа камер с конденсированным хроматином по сравнению с нормой.

Табл. 7. Анализ числа яйцевых камер с конденсированным хроматином у *Trl*-мутантов.

Генотип	Общее кол-во просчитанных камер, шт.	Общее кол-во камер с конденсированным хроматином, шт.	Доля камер с нарушениями от общего числа просчитанных камер, %.
<i>Oregon R/Trl^{R85}</i>	336	13	3,80
<i>Trl^{362(ex)}/Trl^{R85}</i>	666	33	4,95
<i>Trl³⁶²/Trl^{R85}</i>	1490	267	17,91
<i>Trl^{en82}/Trl^{R85}</i>	1281	168	13,10

3.4.1.3. Нарушения в формировании цитоплазматических актиновых филаментов питающих клеток *Trl*-мутантов

Одним из наиболее ярких дефектов, наблюдаемых в питающих клетках *Trl*-мутантов на фоне снижения количества белка GAGA, является нарушение формирования актиновых филаментов. Для анализа структуры актинового цитоскелета в яйцевых камерах дрозофилы мы использовали фаллоидин — реактив, добываемый из бледных поганок, который специфически окрашивает разные типы актиновых филаментов.

Известно, что до 10 стадии развития яйцевой камеры у самок дрозофилы в их питающих клетках присутствуют два типа актиновых филаментов — субкортикальный актиновый слой, прилегающий к мембране клеток, и актиновые филаменты, выстилающие кольцевые каналы. На стадии 10 развития яйцевой камеры в питающих клетках начинает формироваться третий стадио-специфический тип актиновых филаментов — цитоплазматические актиновые филаменты (ЦАФ). Пучки этих филаментов протягиваются радиально от поверхности ПК к их ядрам, образуя ореол вокруг ядер (Gutzeit, 1986; рис. 44 Б). ЦАФ играют важную роль в оогенезе дрозофилы, удерживая большие полиплоидные ядра питающих клеток вдали от кольцевых каналов в период быстрого транспорта, не позволяя им забивать последние во время стремительного тока цитоплазмы ПК в ооцит. Поэтому ЦАФ и формируются непосредственно перед фазой быстрого транспорта.

До стадии 10 развития яйцевой камеры актиновый цитоскелет питающих клеток *Trl*-мутантов по морфологии не отличается от нормы (данные не

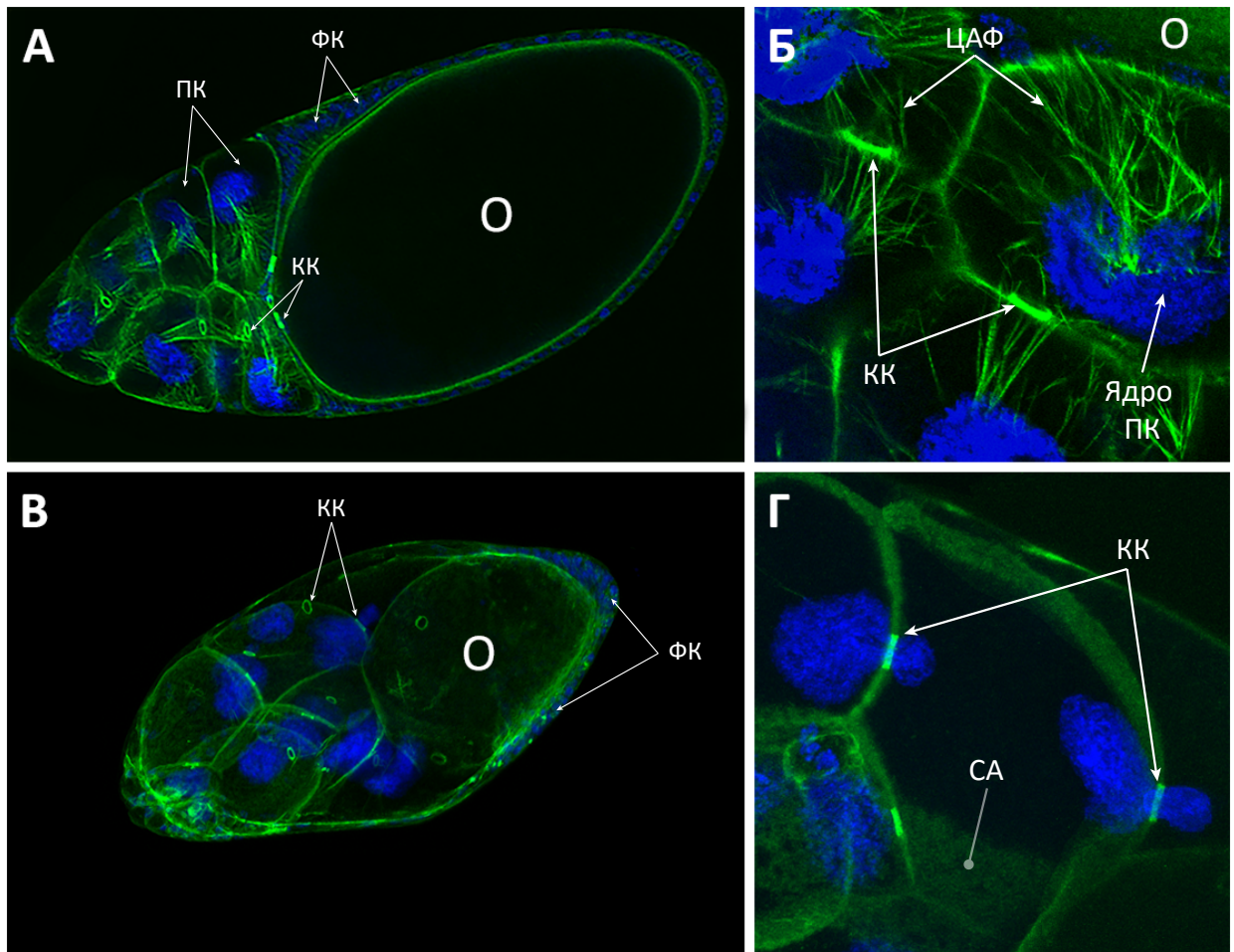


Рис. 44. Актиновые филаменты яйцевой камеры дрозифилы. (А, Б) камера дикого типа (*Oregon R*). (В, Г) камера *Trl*³⁶² мутантов. Окрашивание DAPI (синий) и фаллоидином (зеленый). Увеличение ×40.

приводятся). Значительные отклонения у *Trl*-мутантов были обнаружены нами именно в структуре ЦАФ. При этом у *Trl*^{362(ex)}-мутантов, у которых удалены только первые два старта транскрипции, камеры с неправильно сформированными ЦАФ встречаются редко (табл. 8). Самые сильные нарушения в формировании ЦАФ выявлены у мутантов *Trl*³⁶², *Trl*^{l3C} и *Trl*^{ex(15)}, у которых наиболее сильно снижена транскрипция гена *Trl* в ПК. У них число яйцевых камер с практически полностью отсутствующими ЦАФ достигает 90 %. Напомним, что у этих мутантов наблюдается практически нулевой уровень экспрессии гена *Trl* в яичниках и практически полностью отсутствуют ЦАФ (рис. 44 В). В результате большие полиплоидные ядра питающих клеток под давлением, вызванным сокращением нормально функционирующего у мутантов *Trl* кортикального актинового слоя питающих клеток, попадают в кольцевые каналы и блокируют дальнейший ток цитоплазмы из питающих клеток в ооцит (рис. 44 Г). Нарушения в формировании ЦАФ обычно приводят к формированию яйцевых камер так называемого

Табл. 8. Анализ числа яйцевых камер *Trl*-мутантов с полным отсутствием ЦАФ и забиванием кольцевых канальцев.

Генотип	Общее кол-во просчитанных камер, шт.	Число камер с полным отсутствием ЦАФ, шт.	Доля камер с нарушениями от общего числа просчитанных камер, %.
<i>Trl^{ex(15)}/Trl^{R85}</i>	653	600	91
<i>Trl^{362(ex)}/Trl^{R85}</i>	667	35	5,20
<i>Trl³⁶²/Trl^{R85}</i>	1450	1315	90,68
<i>Trl^{en82}/Trl^{R85}</i>	1281	120	9,36

«dumpless» фенотипа, характеризующегося сильно уменьшенным, по сравнению с нормой, ооцитом (Огиенко и др., 2007). Недоразвитость ооцита обусловлена тем, что он недополучает питающие вещества из ПК мутантов, в том числе и из-за проблем с быстрым транспортом.

При введении в геном *Trl*-мутантов трансгенов *hsp83:GAGA-519*, у которых, благодаря введению этой конструкции, происходит увеличение количества белка GAGA, происходит восстановление ЦАФ в питающих клетках мутантов (Огиенко и др., 2006; Огиенко и др., 2008а). Это свидетельствует о том, что дефекты в формировании ЦАФ у *Trl* обусловлены нехваткой именно ТФ GAGA.

Таким образом, при исследовании оогенеза *Trl*-мутантов нами впервые была продемонстрирована важная роль ТФ GAGA в организации актинового цитоскелета дрозофилы. При этом мы установили, что для правильного формирования ЦАФ в питающих клетках яйцевой камеры дрозофилы важна правильная экспрессия гена в яичниках. Чем ниже экспрессия гена, тем сильнее нарушения в формировании ЦАФ, как это показано для мутантов *Trl^{ex(15)}*, *Trl^{I3C}* и *Trl³⁶²*. Меньшие нарушения в экспрессии приводят и к менее значительным нарушениям в формировании ЦАФ, как это показано для мутантов *Trl^{362(ex)}* и *Trl⁴⁻²⁸⁵*.

3.4.2. Морфологические нарушения ооцита у *Trl*-мутантов

Мы установили, что около 95 % яйцевых камер гипоморфных *Trl*-мутантов, таких как *Trl³⁶²* и *Trl^{ex(15)}*, имеют так называемый «dumpless» фенотип, характеризующийся сильно уменьшенным, по сравнению с нормой, ооцитом. Это

происходит вследствие того, что содержимое питающих клеток не полностью переносится в растущий ооцит, который в результате не может нормально развиваться. Такой же фенотип был отмечен и для 95 % яйцевых камер *Trl^{l3C}*-мутантов (Bhat *et al.*, 1996). Однако мы выявили и другие нарушения в развитии ооцитов в яйцевых камерах *Trl*-мутантов. Так у них встречаются яйцевые камеры с двумя, а иногда и с тремя ооцитами (рис. 45). Отметим, что в яйцевых камерах самок дикого типа мы не нашли камер с необычным числом ооцитов. У *Trl*-мутантов иногда нами были также обнаружены яйцевые камеры с неправильным позиционированием ооцита, т. е. если в норме он всегда располагается на противоположном от питающих клеток крае, то у мутантов он может менять расположение (рис. 45).

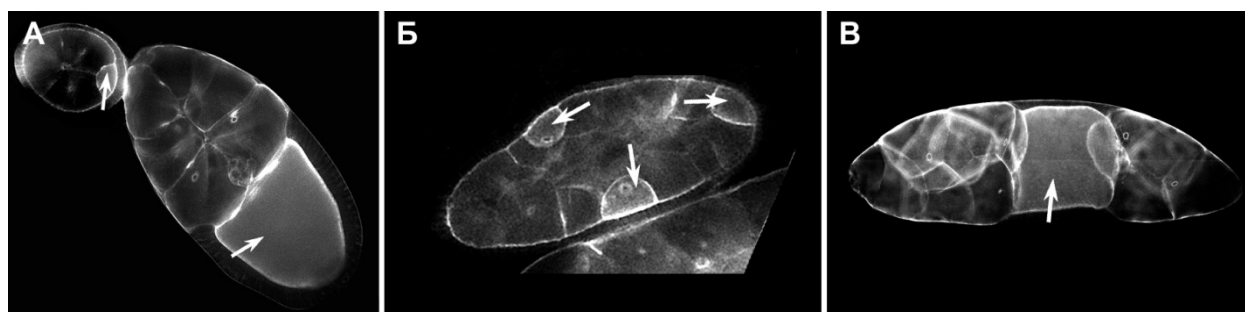


Рис. 45. Морфология яйцевой камеры (а) самок дикого типа и (б, в) самок гомозигот *Trl³⁶²*. Стрелками указаны ооциты. Видно наличие более чем одного ооцита в яйцевых камерах мутантов.

3.4.3. Нарушения в функционировании фолликулярных клеток *Trl*-мутантов

В яйцевой камере дрозофилы, помимо ооцита и 15 питающих клеток, присутствуют и несколько типов соматических или фолликулярных клеток. В норме яйцевая камера дрозофилы на первых стадиях развития (до стадии 6) окружена достаточно однородными по форме и размерам ФК, которые в ходе развития претерпевают значительные морфологические изменения в зависимости от их дальнейшей судьбы. Находящаяся на стадии 6–7 развития яйцевая камера окружена со всех сторон ФК, число которых по оценкам разных авторов колеблется от 650 до 1000. Во время стадии 7–8 большинство ФК начинают мигрировать назад, в сторону растущего ооцита, приобретая при этом цилиндрическую форму (Spradling, 1993; Horne-Badovinac & Bilder, 2005). В течение 9 стадии развития

яйцевой камеры 6–8 ФК (2 полярные и прилежащие к ним ФК) отсоединяются от клеток однослойного эпителия в передней части камеры и начинают мигрировать между питающими клетками по направлению к ооциту. Эти клетки получили название бордюрных клеток (border cells) (Montell *et al.*, 1992). К началу стадии 10 большинство эпителиальных ФК имеют цилиндрическую форму и покрывают ооцит, занимающий половину яйцевой камеры. В то же время над питающими клетками остаются только 50 ФК, которые уплощаются и формируют тонкий однослойный эпителий. К этому времени заканчивается миграция бордюрных клеток и они достигают переднего края ооцита. В дальнейшем эти клетки участвуют в формировании микропиле, которое необходимо для прохождения спермы (Montell *et al.*, 1992; Montell, 2003). На стадии 10В клетки цилиндрического эпителия, расположенные на границе между ооцитом и питающими клетками (центрипетальные клетки), уплощаются и начинают мигрировать между питающими клетками и ооцитом. Миграция центрипетальных клеток заканчивается, когда они достигают бордюрных клеток, в результате передняя часть ооцита полностью покрывается фолликулярным эпителием (Horne-Badovinac & Bilder, 2005). Две группы ФК, расположенных на переднем конце ооцита, (каждая содержит примерно 150 клеток) начинают координированную миграцию на стадии 10В, давая начало специализированным структурам — дорзальным выростам хориона (Spradling, 1993). На 13-й стадии развития яйцевой камеры клетки, формирующие ДВХ, прекращают свое движение, но при этом продолжают секрецию белков хориона, что приводит к утолщению выростов (Berg, 2005). Правильно сформированные ДВХ удерживают эмбрион на поверхности корма, тем самым обеспечивая его дыхание (Spradling, 1993).

В нашей работе получены данные, свидетельствующие о том, что даже незначительное снижение экспрессии гена *Trl* в яичниках ведет к серьезным нарушениям в функционировании разных типов соматических клеток яйцевой камеры дрозофилы.

Во-первых, мы установили, что у *Trl*-мутантов наблюдаются серьезные нарушения в миграции бордюрных клеток. Если в норме к 10-й стадии бордюрные клетки достигают переднего края ооцита, то во многих яйцевых камерах *Trl*-мутантов бордюрные клетки не успевают к 10-й стадии закончить миграцию, а задерживаются в передней части камеры, между питающими клетками (рис. 46 В-Ж). Так, в яйцевых камерах мутантов *Trl*³⁶² и *Trl*^{ex(15)} около 20 и 25 % яйцевых камер соответственно характеризуются отставанием в миграции БК.

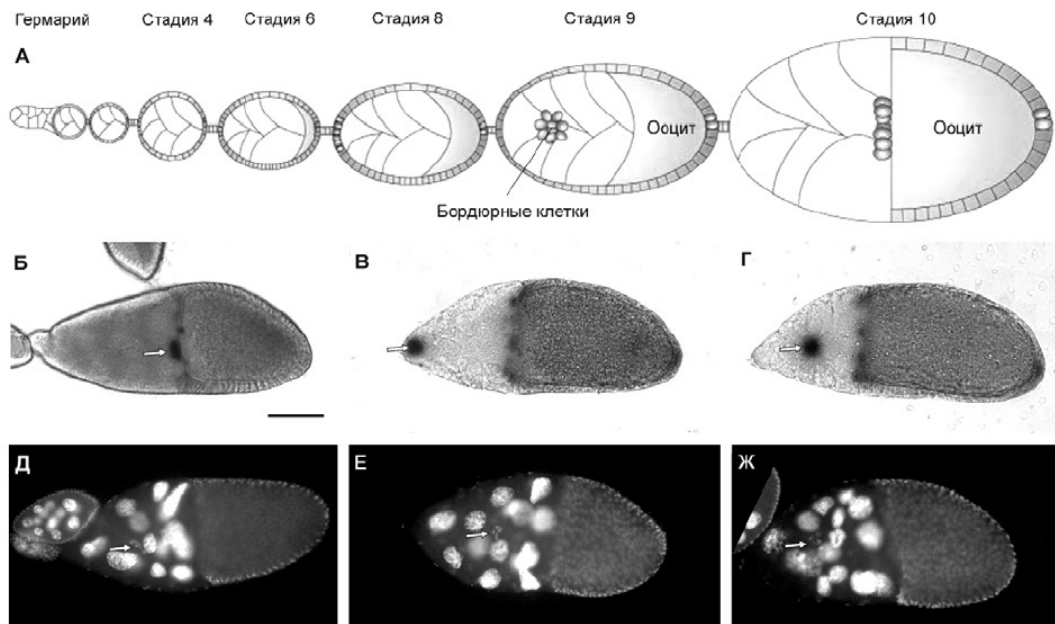


Рис. 46. Нарушение миграции бордюрных клеток у *Trl*-мутантов. А — схематическое изображение овариолы, показана миграция бордюрных клеток на 9-й стадии развития яйцевой камеры в норме (с модификациями из Montell, 2003). Б — яйцевая камера самок дикого типа на 10-й стадии, БК (указаны стрелкой) находятся на границе между питающими клетками и ооцитом. В, Г — яйцевые камеры *Trl*^{362(ex)} мутантов на 11-й стадии развития. Д, Е — яйцевая камера *Trl*³⁶² мутантов на 10-й стадии. Ж — яйцевая камера *Trl*^{en82}-мутантов на 10-й стадии. Б-Г — яйцевые камеры, окрашены с помощью X-Gal. Д-Ж — яйцевые камеры, окрашены с помощью DAPI. Масштаб 100 мкм.

Как показано на рис. 46 к началу 10-й стадии развития они не достигают ооцита и видны посреди питающих клеток. Следует отметить, что в норме такие случаи встречаются крайне редко.

Во-вторых, у *Trl*-мутантов нарушено движение центрипетальных клеток. В норме к началу 11 стадии развития яйцевой камеры центрипетальные клетки должны закончить миграцию и покрыть передний конец ооцита (рис. 47 А, Г, Ж). Однако у всех анализируемых *Trl*-мутантов было обнаружено нарушение в движении центрипетальных клеток (рис. 47), а фолликулярные клетки даже на последних стадиях развития яйцевой камеры располагаются зачастую только на заднем конце камеры, не покрывая передней поверхности ооцита (рис. 47 Д, Е, З, И). В результате ооцит внедряется в область, занимаемую питающими клетками (рис. 47 Б, Д, В, Е).

Косвенным указанием на то, что у *Trl*-мутантов нарушено движение центрипетальных клеток, служит тот факт, что у них нарушено формирование оперкулула. В формировании оперкулула — тонкого слоя хориона, расположенного

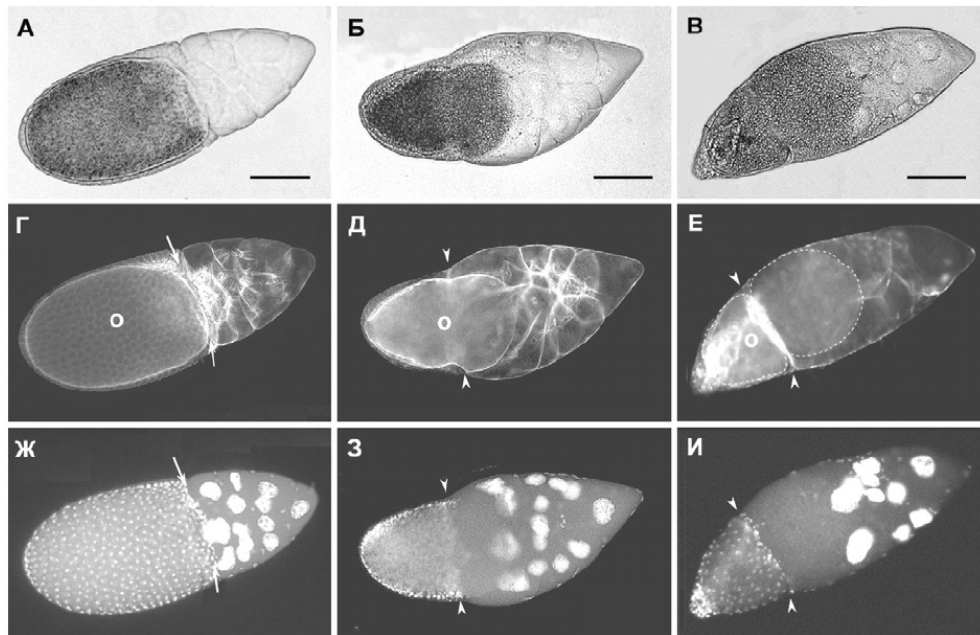


Рис. 47. Нарушение миграции фолликулярных клеток у мутантов. А, Г, Ж — камеры дикого типа на стадии 10 развития. В норме центрипетальные клетки (указаны стрелками) проникают внутрь камеры между ооцитом и питающими клетками. Б, Д, З — яйцевая камера мутанта *Trl^{en82}/Trl^{R85}*; В, Е, И — яйцевая камера мутанта *Trl^{362(ex)}/Trl^{R85}* на поздних стадиях развития. У мутантов центрипетальные клетки не проходят вглубь камеры, Е — ооцит (выделен пунктиром) внедряется в область питающих клеток. Г, Д, Е — яйцевые камеры, окрашены фаллоидином (О — ооцит). Ж, З, И — яйцевые камеры, окрашены DAPI. Треугольниками указана граница, где кончается миграция фолликулярных клеток. Масштаб 100 мкм.

на переднем крае яйца и необходимого для выхода из него в дальнейшем личинки, принимают участие и центрипетальные клетки. У мутантов оперкулум часто выглядят значительно более укороченным, чем в норме. В норме его длина составляет около 140 мкм, а у *Trl*-мутантов длина оперкулума в два раза меньше (Омелина и др., 2011).

В-третьих, у *Trl*-мутантов нарушено формирование дорзальных выростов хориона. У мутантов (рис. 48 Б, В) они неправильной формы и значительно короче, чем в норме (рис. 48 А).

В норме средняя длина ДВХ составляет 675 ± 41 мкм, тогда как у *Trl³⁶²/Trl^{R85}* мутантов длина ДВХ в среднем составляет 445 ± 37 мкм, а у *Trl^{en82}/Trl^{R85}*-мутантов 586 ± 31 мкм. (Омелина и др., 2011). Следует отметить, что уменьшение длины ДВХ у этих мутантов коррелирует с уменьшением экспрессии гена *Trl* в их яйцевых камерах. Так у *Trl³⁶²/Trl^{R85}*-мутантов в яичниках она снижена примерно в 10 раз, тогда как у *Trl^{en82}/Trl^{R85}*-мутантов она снижена примерно в три раза по сравнению с нормой. Введении в геном *Trl*-мутантов трансгена *hsp83:GAGA-519*,

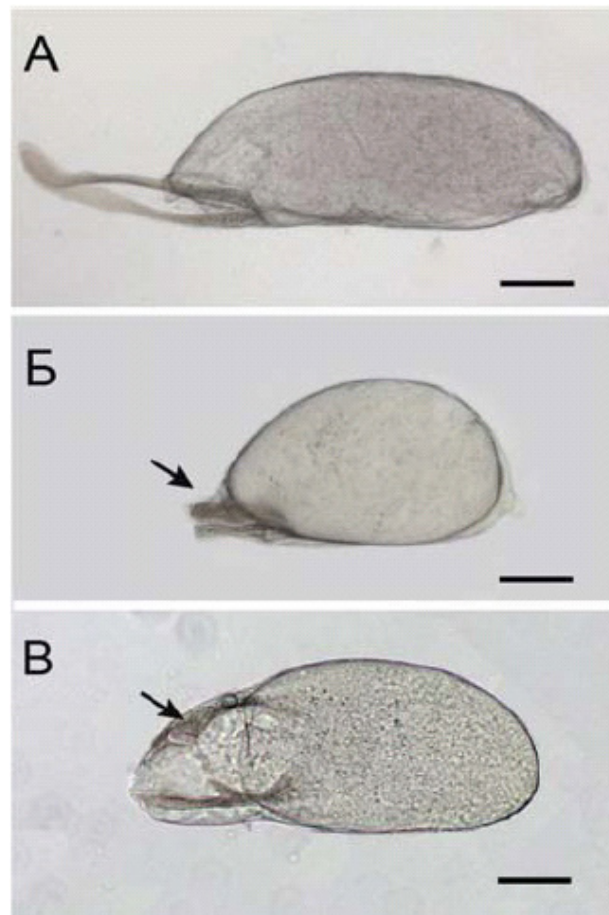


Рис. 48. Морфология яиц самок дикого типа и *Trl*-мутантов. А — яйцо самки дикого типа (*Oregon R*). Б — яйцо самки *Trl^{en82} / Trl^{R85}*. В — яйцо самки *Trl^{362(ex)} / Trl^{R85}*. Размер яйца у *Trl*-мутантов сильно уменьшен, укорочены дорзальные выросты хориона (указаны стрелкой). Масштаб 100 мкм.

с которого нарабатывается дополнительный белок GAGA, приводит к восстановлению длины ДВХ и оперкулума. Это указывает на то, что нарушения длины ДВХ и оперкулума связано именно с недостатком белка GAGA (Омелина и др., 2011).

3.4.4. Причины нарушения оогенеза у *Trl*-мутантов

Мы полагаем, что причиной многочисленных нарушений оогенеза у *Trl*-мутантов является нарушение экспрессии его генов-мишеней, контролирующих этот процесс. Снижение количества белка GAGA в разных типах клеток яйцевых камер *Trl*-мутантов, вероятно, нарушает экспрессию таких генов, что приводит к изменению количества их продуктов в клетках яйцевых камер и, как следствие этого, к нарушению нормального функционирования этих клеток.

Для поиска потенциальных генов-мишеней белка GAGA, ответственных за нарушения в оогенезе *Trl*-мутантов, мы использовали данные, представленные в

базах данных проекта modENCODE (<http://www.modencode.org/>). На основании этих баз нами были отобраны гены, которые по литературным данным контролируют оогенез дрозофилы и в регуляторных районах которых с помощью методов ChIP-seq и ChIP-chip найдены многочисленные сайты связывания белка GAGA. Однако представленные в modENCODE данные не отличаются высокой точностью по локализации сайтов связывания ТФ. Кроме того, поскольку отсутствуют данные о связывании GAGA в яичниках дрозофилы, мы использовали собственный компьютерный метод, позволяющий распознавать с высокой точностью GAGA сайты в заданном районе с помощью программного пакета SITECON (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/sitecon>). SITECON основан на определении консервативных конформационных и физико-химических свойств, характерных для того или иного участка ДНК. Использование данного пакета предполагает создание обучающей выборки, основанной на анализе экспериментально доказанных сайтов связывания требуемого ТФ (Oshchepkov *et al.*, 2004). В обучающую выборку были включены 120 экспериментально доказанных GAGA сайтов из 16 генов *D. melanogaster* (Omelina *et al.*, 2011). Среди них были отобраны сайты GAGnGAG и GAGnnnGAG типов (описывающие структуру подавляющего большинства природных сайтов) для дальнейшей работы по созданию обучающих выборок и подобраны оптимальные параметры для эффективного распознавания этих типов сайтов. С помощью разработанных методов распознавания GAGA сайтов среди потенциальных генов-мишеней GAGA был осуществлен поиск сайтов связывания. В экспериментах по задержке в геле ДНК пробы с использованием рекомбинантного белка His-GAGA была продемонстрирована высокая эффективность связывания выявленных сайтов. Более 70 % предсказанных сайтов типа GAGnGAG и более 90 % сайтов типа GAGnnnGAG демонстрировали связывание в проведенных нами экспериментах (Omelina *et al.*, 2011). Таким образом, созданные методы можно рассматривать как очень надежные методы распознавания сайтов связывания белка GAGA при выбранных параметрах. Проведя поиск GAGA сайтов с помощью разработанных методов, мы среди генов, контролирующих оогенез дрозофилы, отобрали гены, у которых в 5'-областях и в первых интронах были выявлены GAGA сайты GAGnGAG и GAGnnnGAG типов и мутанты которых характеризуются нарушениями оогенеза, сходными с нарушениями, выявленными у самок *Trl*-мутантов. К этим генам относятся: *domeless* (*dome*), *sn*, *chic*, *sax*, *tkv*, *N*, *bun*, *grk*, *br*, *cpb* (Omelina *et al.*, 2011). Для двух генов: *dpp* и *Act5C* ранее было показано наличие

GAGA сайтов в промоторных районах (Schwyter et al., 1995; Chung & Keller, 1990). Эти гены мы также выбрали для дальнейшего анализ.

Параллельно потенциальные гены-мишени белка GAGA отбирались из числа генов, экспрессия которых изменяется на фоне уменьшения количества белка GAGA в яйцевой камере *Trl*-мутантов. Д. А. Карагодиным был проведен сравнительный анализ транскрипции генов, экспрессирующихся в яичниках *D. melanogaster* в норме, а также на фоне снижения ТФ GAGA у мутантов с помощью микрочипов. В результате было установлено, что при снижении количества ТФ GAGA в яичниках изменяют экспрессию более чем 1000 генов, что дает основание предполагать, что они являются генами-мишенями ТФ GAGA. Среди этих генов нами были отобраны для дальнейшего анализа гены, которые по литературным данным влияют на оогенез (Табл.9), а также гены, влияющие на структуру цитоскелета (Табл. 10), поскольку известно, что структура актинового цитоскелета сильно влияет на функционирование всех типов клеток яйцевой камеры дрозофилы. Среди генов, меняющих экспрессию на фоне уменьшения

Табл. 9. Гены, влияющие на оогенез дрозофилы и меняющие экспрессию на фоне уменьшения количества белка GAGA по данным микрочипового анализа.

<i>aret</i>	<i>ash1</i>	<i>bam</i>	<i>br</i>	<i>brm</i>	<i>capt</i>	<i>capu</i>	<i>Cdc42</i>
<i>Cp36</i>	<i>Dl</i>	<i>Dlic</i>	<i>dpp</i>	<i>drd</i>	<i>EcR</i>	<i>Eip75B</i>	<i>fs(1)Yb</i>
<i>JIL-1</i>	<i>kekl</i>	<i>kra</i>	<i>lark</i>	<i>lqfR</i>	<i>M6</i>	<i>mago</i>	<i>Mcm6</i>
<i>mip120</i>	<i>Nacalpha</i>	<i>osk</i>	<i>Ote</i>	<i>Past1</i>	<i>phm</i>	<i>Rpd3</i>	<i>sgg</i>
<i>sima</i>	<i>stau</i>	<i>Sxl</i>	<i>Trl</i>	<i>Vm26Aa</i>			

Табл. 10. Гены, влияющие на структуру цитоскелета в клетках яйцевой камеры дрозофилы, которые меняют экспрессию на фоне уменьшения количества GAGA по данным микрочипового анализа.

<i>Act88F</i>	<i>alpha-catenin-related</i>	<i>αTub84B</i>	<i>αTub84D</i>	<i>AnxB10</i>	<i>Apc2</i>	<i>Arfp</i>
<i>Arpc2</i>	<i>Atgl</i>	<i>awd</i>	<i>Bap60</i>	<i>βTub56D</i>	<i>βTub97EF</i>	<i>capu</i>
<i>CG14687</i>	<i>CG14964</i>	<i>CG31735</i>	<i>CG33232</i>	<i>CG5022</i>	<i>CG5023</i>	<i>CG7261</i>
<i>CG7716</i>	<i>CLIP-190</i>	<i>cnn</i>	<i>dgt2</i>	<i>Dyb</i>	<i>Ebl</i>	<i>fil</i>
<i>γTub37C</i>	<i>Grip84</i>	<i>Hsp23</i>	<i>jbug</i>	<i>jub</i>	<i>kat80</i>	<i>kat-60L1</i>
<i>l(2)gl</i>	<i>mars</i>	<i>mask</i>	<i>pod1</i>	<i>Rfabg</i>	<i>sals</i>	<i>spas</i>
<i>stau</i>	<i>tau</i>	<i>tsr</i>	<i>WASp</i>	<i>Whamy</i>	<i>wupA</i>	<i>Zasp66</i>

количества GAGA есть гены, которые имеют нарушения оогенеза, сходные с обнаруженными у *Trl*-мутантов. К числу таких генов относятся гены *br*, *dpp*, *twinstar* (*tsr*), *Dl*.

Таким образом, для дальнейшего анализа мы выбрали гены *dome*, *sn*, *chic*, *sax*, *tkv*, *N*, *bun*, *grk*, *br*, *Act5C*, *cpb*, *dpp*, *tsr*, *Dl*. Мы исследовали экспрессию этих генов на фоне снижения количества белка GAGA, а также наличие генетического взаимодействия между этими генами и геном *Trl*, для того чтобы выяснить являются ли они генами-мишенями GAGA, ответственными за дефекты оогенеза *Trl*-мутантов.

3.4.4.1. Причины нарушения в структуре ЦАФ у *Trl*-мутантов

Поскольку одним из самых ярких дефектов, обнаруженных нами в оогенезе *Trl*-мутантов, было неправильное формирование ЦАФ в их питающих клетках, то мы осуществили поиск генов, ответственных за данное нарушение.

Среди выявленных потенциальных генов-мишеней нами были отобраны гены, нарушения которых могли привести к нарушениям в формировании цитоплазматических актиновых филаментов в питающих клетках *Trl*-мутантов. В результате нами для дальнейшего анализа были отобраны гены *sax*, *cpb*, *sn*. Нарушения в структуре ЦАФ у мутантов по этим генам сходны с теми, которые наблюдаются у *Trl*-мутантов. Кроме того, для анализа также выбран ген, кодирующий важнейший компонент актинового цитоскелета — белок Actin5C. Все эти гены содержат участки связывания с белком GAGA в регуляторных областях по данным проекта modENCODE. С помощью разработанных нами и верифицированных компьютерных методов мы также обнаружили в этих районах GAGA сайты.

Мы исследовали, как взаимодействуют анализируемые гены с геном *Trl* и как изменяется экспрессия генов на фоне снижения количества ТФ GAGA. Для оценки уровня экспрессии отобранных генов на фоне снижения уровня белка GAGA были использованы ПЦР в реальном времени, а также Нозерн-блот гибридизация.

Для генов *sn* (данные не приводятся), и *cpb* (рис. 49) не было продемонстрировано сколько-нибудь серьезного изменения в уровне экспрессии на фоне снижения количества белка GAGA. Ген *Act5C* демонстрирует некоторое усиление экспрессии на фоне уменьшения белка GAGA (рис. 50). Мы проверили

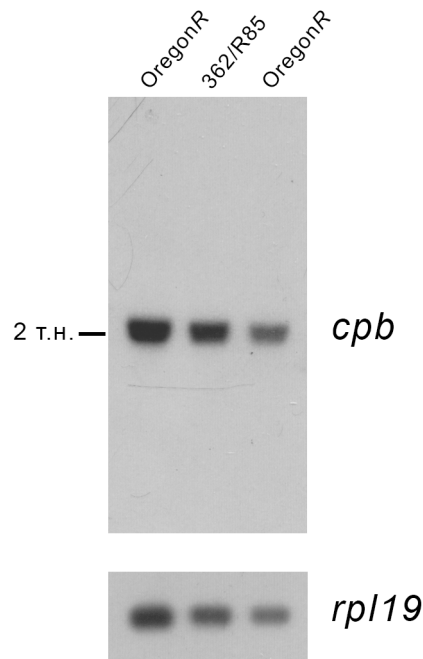


Рис. 49. Анализ экспрессии гена *caping protein beta* (*cpb*). Линии, из которых выделялась РНК, указаны сверху блота, внизу в качестве контроля нанесения показана гибридизация с зондом для гена *rpl19*.

как формируются ЦАФ у дигетерозигот, несущих мутацию гена *Trl* и мутацию по одному из этих генов. Однако мы не установили наличия взаимодействия генов *Act5C*, *cpb* и *sn* с геном *Trl*, т. е. наличие мутаций по генам *cpb*, *sn* и *Act5C* не усиливает дефективность формирования ЦАФ у мух несущих мутацию по

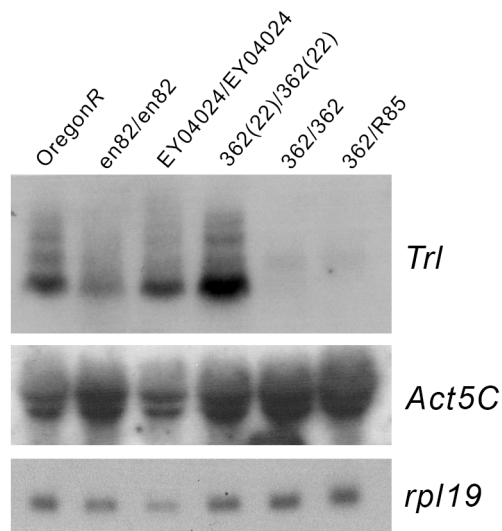


Рис. 50. Анализ экспрессии генов *Actin 5C* (*Act5C*) и *bifocal* (*bif*) в яйчниках *Trl*-мутантов. Линии, из которых выделялась РНК, указаны сверху блота, внизу в качестве контроля нанесения показана гибридизация с зондом для гена *rpl19*. Для демонстрации изменения экспрессии гена *Trl* в линиях приведена гибридизация с зондом на константную область этого гена.

гену *Trl* (данные не приводятся). Это позволило нам сделать заключение о том, что эти генов не являются причиной дефектов в организации ЦАФ в питающих клетках *Trl*-мутантов. Несмотря на то, что нами с помощью Нозерн-блот гибридизации было установлено, что у мутантов по гену *Trl* экспрессия гена *Act5C* в яичниках несколько выше, чем в норме, это, по-видимому, не сказывается серьезно на формировании ЦАФ в питающих клетках мутантов.

По литературным данным экспрессия гена *sax* снижается более чем в 2 раза у сильных гипоморфных мутантов гена *Trl* (Омелина и Коханенко, 2014). Мы проверили наличие генетического взаимодействия между генами *Trl* и *sax* (рис. 51). В результате нами было установлено, что у самок генотипа *sax⁴/+; Trl^{R85}/+* около 85 % камер ($n = 55$), находящихся на стадии 10В или на более поздних стадиях развития яйцевой камеры, имеют нарушения в формировании ЦАФ. У мутантов *sax⁵/+; 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 %. Ген *sax* кодирует белок, который является рецептором I типа белка Dpp, кодируемого геном *dpp* (Padgett *et al.*, 1987). Белок Dpp входит в суперсемейство трансформирующих факторов роста β (Transforming Growth Factor β — TGF- β). У дрозофилы в это семейство кроме белка Dpp входят также белки, кодируемые генами *60A* (Wharton *et al.*, 1991; Doctor *et al.*, 1992) и *screw* (Arora *et al.*, 1994).

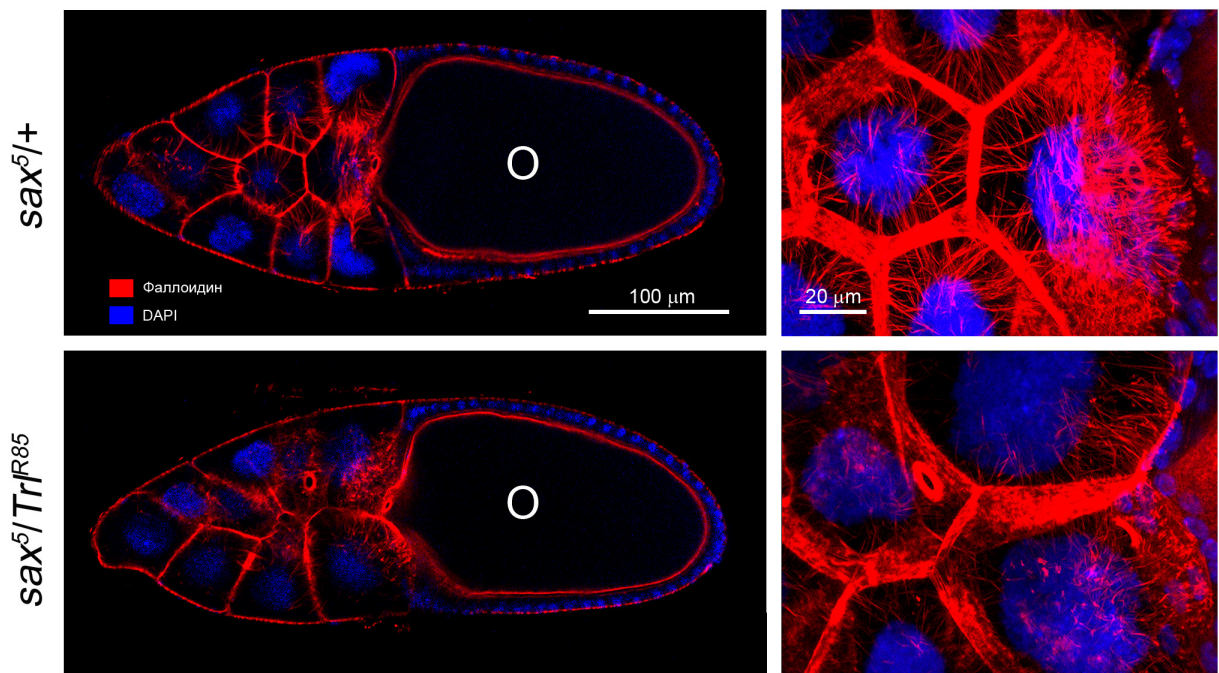


Рис. 51. Усиление дефектов в формировании ЦАФ у мутантов несущих в геноме мутацию гена *sax* и *Trl*. О — ооцит.

Показано, что нарушение в экспрессии гена *sax* приводит к нарушению в формировании ЦАФ в питающих клетках яйцевой камеры дрософилы (Twombly *et al.*, 1996). Этот результат кажется достаточно неожиданным, поскольку хорошо известно, что сигнальный путь DPP, предполагающий взаимодействие белков Dpp и Sax, важен для правильного функционирования соматических клеток яичников дрософилы. Однако в настоящее время нет данных о том, что ген *dpp* экспрессируется в клетках, происходящих из клеток зародышевого пути, а белок Dpp влияет на судьбу этих клеток. В то же время ген *sax* активно экспрессируется не только в соматических клетках яйцевой камеры, но и в клетках зародышевого пути. Авторы считают, что белок Sax, участвуя в DPP сигнальном пути в соматических клетках, взаимодействует с лигандом Dpp, тогда как, влияя на формирование ЦАФ, он взаимодействует с другими членами суперсемейства TGF- β , например, с белками 60A и SCREW (Twombly *et al.*, 1996).

Таким образом, мы установили, что причиной нарушения ЦАФ у *Trl*-мутантов может быть нарушение экспрессии гена *sax*. У мутантов по этому гену наблюдаются нарушения в структуре ЦАФ. В его регуляторных областях найдены сайты связывания белка GAGA, а его экспрессия снижается на фоне снижения количества белка GAGA (Омелина и Коханенко, 2014). Кроме того, количество камер с нарушениями ЦАФ сильно увеличено у двойных гетерозигот по сравнению с мутантами по одному из генов. Все это дает основания предполагать, что ген *sax* является геном-мишенью белка GAGA и нарушение его экспрессии приводит к дефектам в формировании ЦАФ в питающих клетках яйцевой камеры *Trl*-мутантов.

3.4.4.2. Причины нарушения в функционировании соматических клеток яйцевой камеры *Trl*-мутантов

Как отмечалось выше, нами было установлено, что у мутантов по гену *Trl* нарушено функционирование всех типов соматических клеток яйцевой камеры, включая миграцию БК (Огиенко и др., 20086).

Причины нарушения миграции БК у *Trl*-мутантов

Мы полагаем, что причиной нарушения миграции БК у *Trl*-мутантов является нарушение экспрессии генов-мишеней GAGA, контролирующих процесс миграции БК. Следует отметить, что увидеть насколько снижена экспрессия этих генов в кластере из 6–10 бордюрных клетках на фоне уменьшения количества

GAGA невозможно с помощью проведенного нами микрочипового анализа или ОТ-ПЦР, поскольку при проведении этих экспериментов мы использовали РНК, выделенную из целых яичников. Основной вклад в синтез РНК яичников вносят огромные полиплоидные питающие клетки, а вклад БК в производство всей РНК яйцевых камер дрозофилы очень незначителен. Поэтому для идентификации потенциальных генов-мишеней GAGA, ответственных за нарушения миграции БК, мы использовали полученные ранее данные (Luo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2006). В этих работах авторы выявили гены, преимущественно экспрессирующиеся в БК. Среди этих генов мы с помощью разработанных нами и верифицированных биоинформационных методов (Omelina *et al.*, 2011) отобрали гены, содержащие множественные сайты связывания ТФ GAGA и возможно, являющиеся его генами-мишенями. Среди этих генов нами для дальнейшего анализа были отобраны гены *Ras85D*, *Act5C*, *jar*, *dome*, *sax*, *tsr*, *cpb*. Мы провели эксперименты по выявлению генетического взаимодействия между выбранными для анализа генами и геном *Trl*. Для этого был осуществлен анализ миграции БК у компаундов, содержащих мутацию анализируемого гена, нуль-аллель гена *Trl* (*Trl^{R85}*) и конструкцию *gal4-slbo*, UAS-GFP. Конструкция *gal4-slbo*, UAS-GFP очень часто используется в экспериментах по анализу миграции БК, поскольку она позволяет визуализировать БК на 9-й стадии развития яйцевой камеры, когда происходит их активная миграция. В результате проведенных нами экспериментов было установлено, что мутации большинства генов, включая *Ras85D*, *dome*, *sax*, *tsr*, *cpb* практически не усиливают мутантный фенотип *Trl*-мутантов, т. е. у дигетерозигот по этим генам нет заметного увеличения числа камер с нарушениями миграции БК. В то же время мутации по генам *jaguar* (*jar*) и *Act5C* усиливают мутантный фенотип мутации *Trl^{R85}* даже в одной дозе. У мутантов *Trl^{R85}/+* процент камер с отставанием практически равен нулю, так же как и у мутантов, несущих одну дозу генов *jar* и *Act5C*. У компаундов же ситуация резко меняется (рис. 52). При добавлении мутации по гену *jar* в геном *Trl*-мутантов, процент камер с отставанием БК в процессе их миграции на 9 стадии возрастает до 53,9 % (мутация *jar³²²*; n = 89) и до 67,5 % (мутация *jar^{l646}*; n = 256). Добавление мутации по гену *Act5C* в геном мух *Trl/+* приводит к увеличению числа камер с отставшими БК до 52 % (мутация *Act5C^{G0177}*; n = 44).

Таким образом, мы полагаем, что причиной нарушения миграции БК в яйцевых камерах *Trl*-мутантов может быть неправильная экспрессия генов *jar*

и *Act5C*. Эти гены имеют сайты связывания в регуляторных районах и демонстрируют генетическое взаимодействие с геном *Trl*.

Ранее было показано, что в регуляторных районах гена *Act5C* располагаются многочисленные GAGA сайты, а активность проксимального промотора в культуре клеток S2 зависит от наличия таких сайтов (Chung & Keller, 1990). Нами было выше продемонстрировано, что при формировании ЦАФ в питающих клетках, несмотря на то, что экспрессия гена несколько увеличена у мутантов, мутации по гену *Act5C* не усиливают дефекты формирования ЦАФ

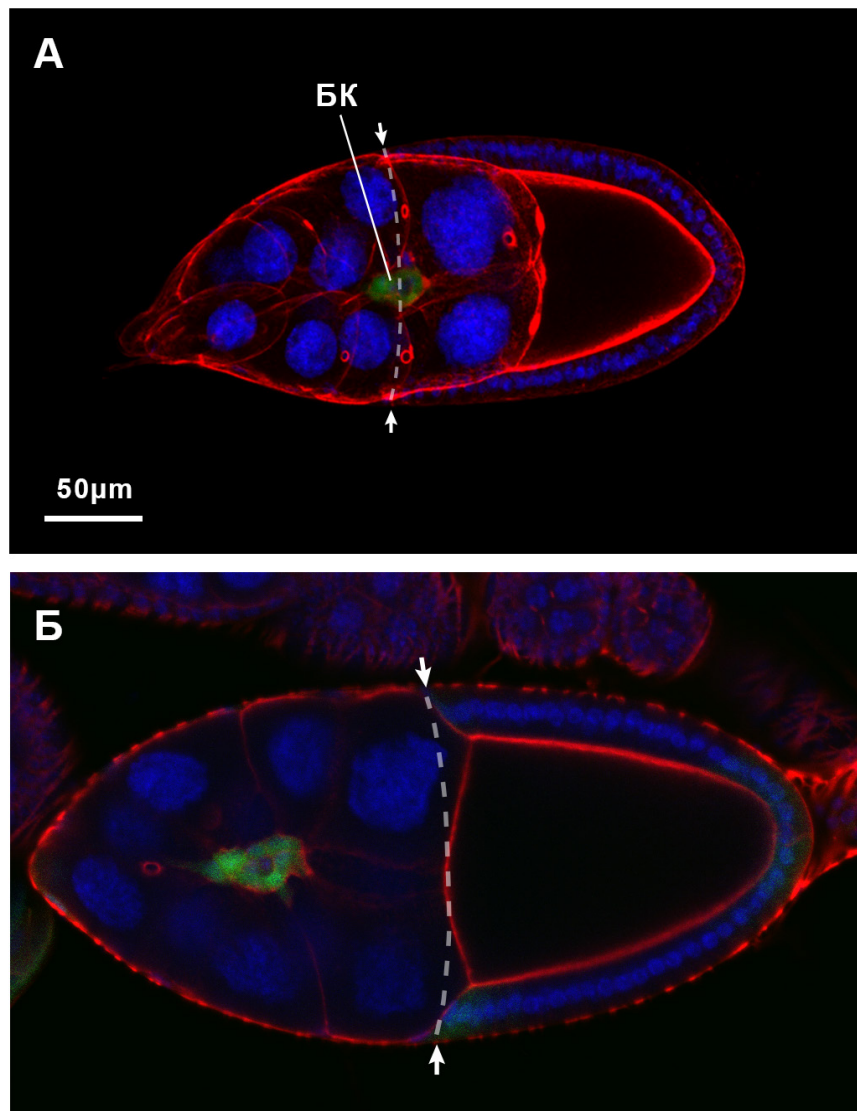


Рис. 52. Нарушение миграции БК у мутантов по гену *jaguar* на фоне снижения количества белка GAGA. Контроль: (А) Яйцевая камера + / *jar* на середине 9 стадии развития. (Б) Яйцевая камера *Trl^{R85} / jar* в конце 9 стадии развития. Миграция фолликулярных клеток, покрывающих яйцевую камеру и БК происходит синхронно, т.е не отличается от контроля. У дигетерозигот наблюдается отставание БК от границы мигрирующих фолликулярных клеток. Пунктиром показана граница мигрирующих фолликулярных клеток.

у *Trl*-мутантов. Однако мутации данного гена усиливают дефекты в миграции БК на фоне мутаций по гену *Trl*.

Причины дефектов дорзальных выростов хориона у *Trl*-мутантов

Как отмечалось выше, у мутантов по гену *Trl* нарушено формирование ДВХ. Многие ДВХ яиц, отложенных мутантными самками, укорочены и имеют неправильную форму (Огиенко и др., 2008б; Омелина и др., 2011). Такие дефекты развития ДВХ обычно связаны с нарушениями миграции соматических клеток яйцевой камеры дрозофилы. Миграцию соматических клеток, формирующих ДВХ, контролируют значительное количество генов, большинство из которых являются эволюционно-консервативными. Одним из наиболее важных сигнальных путей, контролирующих миграцию клеток, формирующих ДВХ, является сигнальный путь DPP. Нарушения в экспрессии генов, входящих в состав этого сигнального пути, включая гены *dpp*, *sax* и *tkv*, отражаются на формировании ДВХ (Омелина и Баричева, 2012). Белок Dpp является членом семейства трансформирующих факторов роста β (TGF- β). Гены *sax* и *tkv* кодируют его рецепторы I типа.

Известно, что гены *dpp*, *sax* и *tkv* генетически взаимодействуют с геном *Trl* в процессе формирования ДВХ (Омелина и Коханенко, 2014). Как уже упоминалось выше, во всех этих генах были найдены сайты связывания GAGA, а экспрессия гена *sax* снижается в яичниках *Trl*-мутантов. Ген *tkv* не меняет экспрессию на фоне снижения количества белка GAGA (Омелина и Коханенко, 2014). Мы исследовали экспрессию гена *dpp* с помощью ОТ-ПЦР в «реальном времени» в целых яичниках *Trl*³⁶²/*Trl*^{R85}-мутантов. Было установлено, что экспрессия *dpp* снижена в двое по сравнению с нормой, что согласуется с результатами микрочипового анализа. Таким образом, мы полагаем что экспрессия генов *sax* и *dpp* напрямую регулируется ТФ GAGA. Тогда как *tkv*, вероятно не регулируется GAGA непосредственно, а генетическое взаимодействие между *tkv* и *Trl* обусловлено связыванием Tkv и Dpp по механизму лиганд-рецептор.

Формирование ДВХ контролируется также сигнальным путем Notch. Трансмембранный белок-рецептор Notch играет важную роль в установлении границы между покровными и выстилающими клетками (рис. 12), из которых и формируются ДВХ. В ходе установления этой границы N взаимодействует с лигандами Ser и Dl.

С помощью ОТ-ПЦР в «реальном времени» нами было установлено, что экспрессия гена *Dl* снижается в 2 раза в яичниках *Trl*³⁶²/*Trl*^{R85}-мутантов. Поскольку по данным modENCODE в промоторной области и 5'-UTR гена *Dl* имеются протяженные районы связывания ТФ GAGA, можно предположить, что GAGA регулирует экспрессию гена *Dl* непосредственно, связываясь с его регуляторными областями.

Таким образом, неправильная миграция фолликулярных клеток, дающих начало ДВХ, приводящая к нарушенному формированию последних у *Trl*-мутантов, вероятно, объясняется нарушением у них экспрессии генов *dpp*, *sax* и *Dl*.

Причины нарушения миграции центрипетальных клеток у *Trl*-мутантов

Миграция ЦК контролируется рядом сигнальных путей, включая Dpp, Notch, Jak-Stat и EGFR. В конце 9 стадии развития яйцевой камеры белок-лиганд Dpp участвует в контроле миграции центрипетальных клеток, вызывая репрессию гена *bun*, кодирующего одноименный транскрипционный фактор (Dobens *et al.*, 2000). Большое количество белка Dpp наблюдаются в лидирующей части мигрирующих ЦК в течение всего процесса их миграции (Twombly *et al.*, 1996; Dobens *et al.*, 2000), что возможно стимулирует миграцию следующих за ними клеток, подобно тому, как это происходит при закрытии дорзальной поверхности эмбриона (embryonic dorsal closure). По данным Омелиной (Омелина, 2013) гены *bun* и *dpp* взаимодействуют с *Trl* в ходе формирования ДВХ. Как уже отмечалось, экспрессия гена *dpp* уменьшается на фоне снижения количества белка GAGA в яичниках самок. Таким образом, GAGA влияет на процесс миграции ЦК в оогенезе регулируя гены *dpp* и возможно *bun*. Вероятно ТФ GAGA также может регулировать экспрессию этих генов и в мигрирующих ЦК.

Поскольку миграция ЦК происходит по поверхности ооцита, мутации по генам, продукты которых участвуют в организации поверхности питающих клеток, показывают некоторые дефекты в миграции ЦК. Так, нормальный уровень DE-кадгерина (кодируемого у дрозофилы геном *shotgun*) требуется для правильной миграции ЦК. Показано, что экдизоновый рецептор (*EcR*), также требующийся для нормальной миграции ЦК, активирует экспрессию *shotgun* (Hackney *et al.*, 2007). Следует отметить что по данным микрочипового анализа ген *EcR* меняет экспрессию на фоне уменьшения количества GAGA. По данным проекта modENCODE в регуляторной области гена *EcR* располагаются многочисленные

районы связывания ТФ GAGA. Кроме того, районы связывания GAGA и EcR в значительной степени перекрываются (Negre *et al.*, 2011), что свидетельствует в пользу того, что они могут совместно регулировать экспрессию генов. Таким образом, GAGA может непосредственно регулировать экспрессию гена *EcR*, влияя тем самым на миграцию ЦК, а также он может влиять на этот процесс посредством совместного действия с EcR.

Заключение

Нами впервые были показаны многочисленные нарушения в оогенезе дрозофилы на фоне снижения количества белка GAGA. Нарушения затрагивают все типы клеток яйцевой камеры дрозофилы, однако наиболее сильные дефекты в морфологии и функционировании показаны для питающих и фолликулярных клеток. Следует отметить, что степень нарушений в ПК коррелирует с уровнем снижения экспрессии гена *Trl* в яичниках. Так наиболее сильные нарушения отмечены для мутантов *Trl*³⁶² и *Trl*^{ex(15)}, а также для мутантов *Trl*^{l3C}, которые характеризуются наибольшим снижением транскрипции гена *Trl* в яичниках мутантов. Однако, отсутствие заметного снижения транскрипции *Trl* в целых яичниках (мутанты *Trl*^{362(ex)}) также может сопровождаться стерильностью самок, хотя морфология ПК соответствует норме. Причиной стерильности у таких мутантов являются нарушения в функционировании ФК.

Анализ дефектов оогенеза у *Trl*-мутантов позволил предположить, что для обеспечения правильной экспрессии гена *Trl* в соматических клетках яйцевой камеры дрозофилы район, в котором расположены первые старты транскрипции, играет важную роль, тогда как для функционирования гена в ПК этот район не важен. Для правильного функционирования ПК особенно важен район, расположенный выше стартов транскрипции.

Поскольку GAGA белок является ТФ, мы полагаем, что причинами аномалий в функционировании разных типов клеток яичников *Trl*-мутантов является нарушение экспрессии генов-мишеней GAGA, контролирующих оогенез дрозофилы.

Причиной нарушения ЦАФ у *Trl*-мутантов может быть нарушение в экспрессии гена *sax* (рис. 53). Причиной нарушения миграции БК в яйцевых камерах *Trl*-мутантов может быть неправильная экспрессия генов *jar* и *Act5C*, а миграции ЦК — нарушение экспрессии генов *dpp* и *EcR*. И, наконец, причиной нарушенной

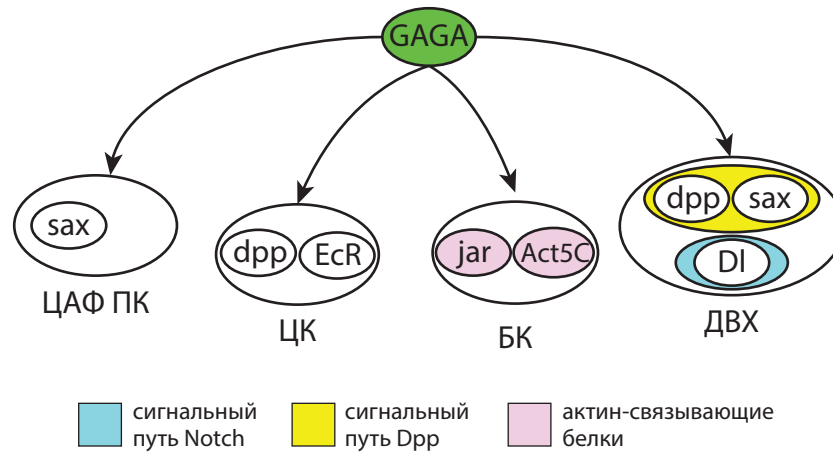


Рис. 53. Гены-мишени ТФ GAGA в разных типах клеток яйцевой камеры дрозифилы.

миграция фолликулярных клеток, дающих начало ДВХ у *Trl*-мутантов, вероятно, является неправильная экспрессии у них генов *sax*, *Dl* и *dpp* (рис. 53).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в процессе оогенеза дрозифилы ТФ GAGA регулирует работу ряда генов. Не исключено, что мы в настоящее время выявили еще далеко не все гены, регулируемые белком GAGA или взаимодействующие с ним в ходе оогенеза дрозифилы. Важность роли ТФ GAGA в процессе оогенеза дрозифилы хорошо согласуется с высокой степенью экспрессии данного гена в яичниках, что позволяет нарабатываться в этом органе большим количеством белка GAGA, необходимого для разных этапов оогенеза в разных типах клеток яйцевой камеры. Следует отметить, что нами установлено, что в разных типах клеток яйцевой камеры ТФ GAGA регулирует работу разных генов.

3.5. Влияние белка GAGA на сперматогенез дрозифилы

Получение новых гипоморфных мутаций по гену *Trl* позволило нам впервые продемонстрировать важность белка GAGA для протекания нормального сперматогенеза дрозифилы и установить причины нарушения данного процесса у *Trl*-мутантов. Было показано, что у мутантов *Trl^{R85}/Trl³⁶²* только половина самцов фертильны, но даже эти фертильные самцы продуцируют очень мало зрелых, подвижных сперматозоидов. У полностью стерильных самцов *Trl^{R85}/Trl^{(ex)15}* только 5 % мутантов продуцируют созревшую подвижную сперму.

Проведенные нами исследования свидетельствуют, что семенники мутантов по гену *Trl* намного меньше, чем семенники самцов дикого типа (рис. 54). У мутантов *Trl³⁶²/Trl^{R85}* они в 1,5–3, а у мутантов *Trl^{R85}/Trl^{(ex)15}* в 2–4 раза меньше

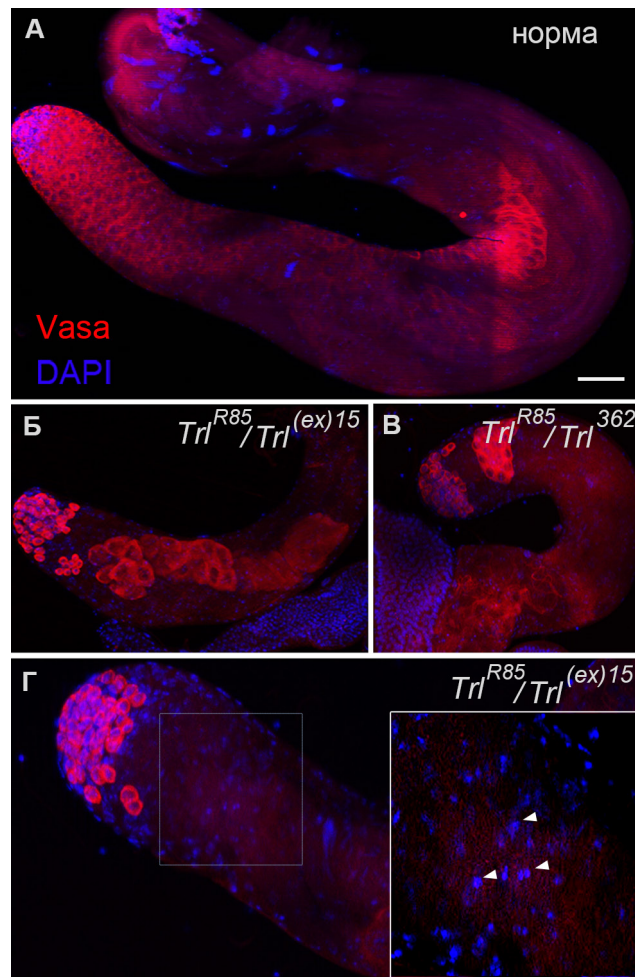


Рис. 54. Семенники взрослых самцов *Trl*-мутантов и дикой линии. (а) В семенниках дикой линии много КЗЛ, окрашенных антителами против белка Vasa (красный), тогда как у мутантов их много меньше (б, в, г). Семенники мутантов много меньше по размеру, чем в норме. Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштаб: (а – в) 20 мкм, (г) 5 мкм.

чем в норме (Dorogova *et al.*, 2014). Маленький размер семенников может сопровождаться уменьшением в них количества клеток зародышевой линии. Поэтому мы проанализировали развитие семенников, используя антитела к белку Vasa, специфично окрашивающие КЗЛ. В результате цитологический анализ выявил сильнейшее уменьшение числа КЗЛ у мутантов по сравнению с нормой. Окрашивание антителами против Vasa показало, что около 90 % семенников мутантов *Trl^{R85}/Trl^{(ex)15}* (рис. 54 Г) содержат цисты только на ранних стадиях развития (2 и 4 клетки), тогда как семенники мутантов *Trl^{R85}/Trl³⁶²*, содержащие преимущественно также ранние цисты, содержат и некоторое количество цист, находящихся на более поздних стадиях развития. Мы не наблюдали какие-либо значительные отклонения в развитии этих цист у мутантов *Trl^{R85}/Trl³⁶²* в ходе дальнейшего сперматогенеза. Нарушения хромосомной сегрегации, цитокинеза

и дифференциации сперматид наблюдались нами крайне редко (данные не приводятся), и очевидно, не могли быть причиной снижения фертильности самцов у *Trl*-мутантов.

Следует отметить, что в отличие от семенников нормальных мух, семенники *Trl*-мутантов при раздавливании превращаются в бесформенную клеточную массу, в которой обнаруживаются только несколько цист, находящихся на ранних стадиях сперматогенеза. Поэтому мы предположили, что в семенниках мутантов запускаются процессы деградации клеток. Этот процесс охватывает прежде всего цитоплазматический материал, в то время как ядра остаются интактными, поскольку ядра клеток семенников мутантов хорошо видны при окрашивании DAPI. Это означает, что у мутантов может сохраняться способность к клеточному делению, и сперматогонии проходят через серию митозов. Действительно, при помощи BrdU и антител к фосфорилированной форме H3-гистона было показано, что клетки апикальной зоны семенника активно включают BrdU и окрашиваются антителами к H3 гистону, что свидетельствовало, что эти клетки делятся митотически (данные не приводятся).

Таким образом, несмотря на то, что хорошо известно, что GAGA влияет на процесс митоза (Bhat *et al.*, 1996; Трунова *и др.*, 2001), причиной низкого числа клеток зародышевой линии в семенниках *Trl*-мутантов, скорее всего, не являются нарушение митоза или блокировка клеточного цикла. Причиной уменьшения количества половых клеток у *Trl*-мутантов может быть редукция числа КЗЛ.

3.5.1. Развитие половой системы *Trl*-мутантов на стадии эмбриогенеза

Количество клеток КЗЛ в сформированных половых органах дрозофилы определяется уже в раннем эмбриональном развитии. Мы выяснили, на какие из этих стадий может влиять белок GAGA в норме, используя иммунно-флуоресцентное окрашивание. В результате мы установили, что в норме внутриядерная локализация белка, отражающая его активное состояние, наблюдалась в течение очень короткого периода, в процессе формирования пула КЗЛ. В этот период КЗЛ активно делятся до тех пор, пока их число не достигнет сорока. В это время белок GAGA наиболее отчетливо выявляется в ядрах, где он виден в виде отдельных гранул, расположенных в области хроматина (рис. 55 А–В). Подобная картина распределения белка характерна и для соматических клеток

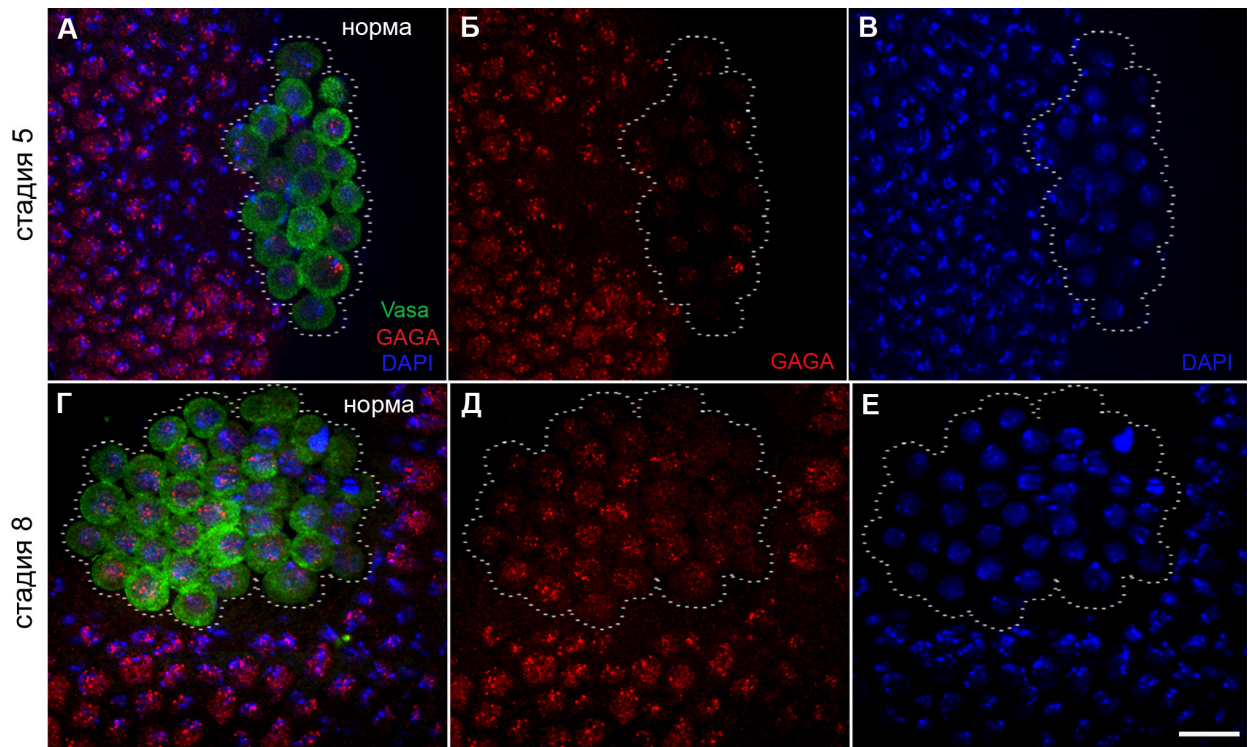


Рис. 55. Локализация GAGA в КЗЛ эмбрионов дикого типа. (а–в) На стадии 4 развития эмбрионов некоторое количество GAGA локализовано в ядрах КЗЛ (выделены пунктиром). (г–е) на стадии 8 GAGA присутствует в цитоплазме КЗЛ. КЗЛ помечены с помощью антител к белку Vasa (зеленый), ядра КЗЛ визуализированы с помощью DAPI (синий), и GAGA помечен с помощью антител к данному белку (красный). Масштаб 10 мкм.

эмбриона, но область связывания GAGA в них значительно больше. После же формирования необходимого количества КЗЛ, т. е. к началу миграции, белок GAGA в них выявляется уже только в цитоплазме (рис. 55 Г–Е). Хотя иммуно-флуоресцентное окрашивание выявляет на этой стадии белок GAGA во всей цитоплазме КЗЛ, совершенно очевидно, что его количество здесь много меньше, чем в соматических клетках.

Таким образом, в норме функциональная активность гена *Trl* в КЗЛ проявляется в течение короткого периода времени еще до начала их миграции. По сравнению с окружающими соматическими клетками, количество GAGA-фактора в КЗЛ незначительна не только по времени, но и по интенсивности. Однако, вероятно, даже кратковременный всплеск активности данного гена необходим для правильного формирования клеток зародышевой линии.

Мы исследовали, на каких стадиях эмбриогенеза наблюдаются нарушения в формировании КЗЛ, обусловленные снижением экспрессии гена *Trl*. На первом этапе анализировалось потомство самок генотипа М/Балансер (М — анализируемая мутация), скрещенных с самцами дикого типа. Это позволило установить,

что одна доза мутации гена *Trl* не влияет на судьбу КЗЛ в процессе эмбриогенеза, поскольку количество образованных КЗЛ и их дальнейшая миграция в область будущих гонад не отличались у гетерозигот от нормы. Однако две дозы мутации уже сказываются на миграции КЗЛ. На первых этапах эмбриогенеза у *Trl*-мутантов, так же как в диком типе, формируется кластер КЗЛ, располагающийся в области заднего полюса. По морфологии и количеству клеток КЗЛ мутантов на этой стадии никак не отличается от нормы. Эффект мутации начинает проявляться несколько позднее, в самом начале миграции КЗЛ, когда в начале гаструляции эти клетки отделяются от эмбрионального синцития и переносятся в карман заднего отдела средней кишки (стадии 6–7).

В норме зародышевые клетки теряют контакты с окружением и перемещаются синхронизированной группой (рис. 56 А). У мутантов в эмбрионах только часть клеток покидали задний полюс и оказывались внутри эндодермы. Остальные задерживались в задней части эмбриона (рис. 56 Б). На более поздних

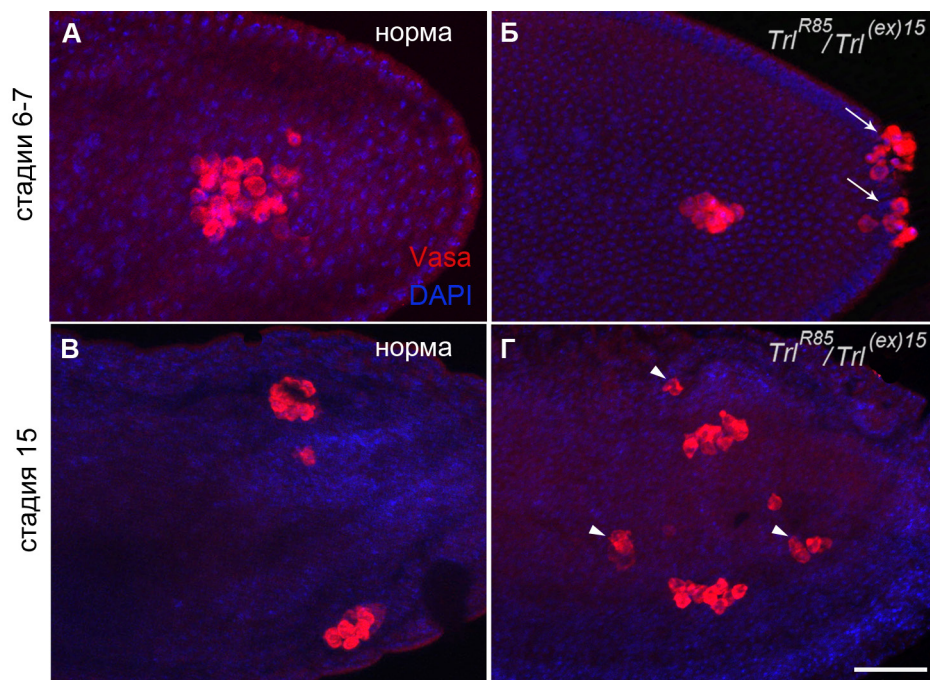


Рис. 56. Нехватка белка GAGA приводит к нарушениям в миграции КЗЛ в ходе эмбриогенеза. (а, б) Начало миграции КЗЛ на стадии 6–7 эмбриогенеза. (а) Эмбрионы дикой линии. КЗЛ мигрируют одной группой. (б) У *Trl*-мутантов некоторые КЗЛ теряют способность мигрировать (показаны стрелками) и остаются на заднем 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 помечены с помощью антител к белку Vasa (красные), ДНК окрашена DAPI (синий). Масштаб 50 мкм.

стадиях эмбриогенеза, в диком типе, зародышевые клетки формируют две компактные группы в области эмбриональной мезодермы — кластеры генеративных клеток будущих гонад. У мутантов некоторое количество клеток выявляются вне образованных сфер. Часть из них, вероятно, оказались не способными к дальнейшей миграции и остались в области средней кишки (рис. 56 В, Г).

Таким образом, нами было установлено, что мутации гена *Trl* вызывает значительные нарушения в процессе миграции КЗЛ и влияют тем самым на конечное число этих клеток в будущих гонадах. Нарушения развития, наблюдаемые у *Trl*-мутантов, предполагают важную роль GAGA-фактора в миграции клеток зародышевого пути. Однако мы полагаем, что в начальный период миграции определяющим является нарушение экспрессии GAGA в соматических клетках мутантов. Транскрипция генов в КЗЛ впервые регистрируется через три с половиной часа после откладывания яиц (8 стадия эмбриогенеза), в то время как в соматических клетках эмбриона она начинается уже через час после откладывания (Van Doren *et al.*, 1998; Santos & Lehmann, 2004; Nakamura *et al.*, 2010; Seydoux & Dunn, 1997). Следует отметить, что и в норме внутриядерная локализация GAGA в КЗЛ мутантов наблюдается только до 4 стадии эмбриогенеза, т. е. до начала их миграции. Очевидно, что в этот период мы выявляем в КЗЛ материнский белок, поскольку известно, что в это время в этих клетках нет активной экспрессии генов. Поскольку в соответствии с нашими наблюдениями нарушения в миграции КЗЛ у *Trl*-мутантов начинаются перед 8-й стадией, т. е. до начала зиготической транскрипции в КЗЛ, мы полагаем, что причиной этого нарушения являются окружающие соматические клетки. Для начала миграции КЗЛ должны отделиться от соматических клеток, что, по-видимому, обеспечивается реорганизацией мембран и цитоскелета последних. Как было описано выше, GAGA необходим для формирования актинового цитоскелета в клетках яйцевой камеры и для правильной миграции целого ряда клеток в ней (Огиенко *и др.*, 2008а, 2008б). Предполагается, что GAGA через регуляцию активности своих генов-мишеней контролирует фундаментальные аспекты динамики актина, которые важны для мобильности разных типов клеток, включая КЗЛ. У мутантов *Trl* некоторые КЗЛ так и остаются на поверхности эмбриона, даже не начав миграционный процесс, который характерен для этих клеток в норме.

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

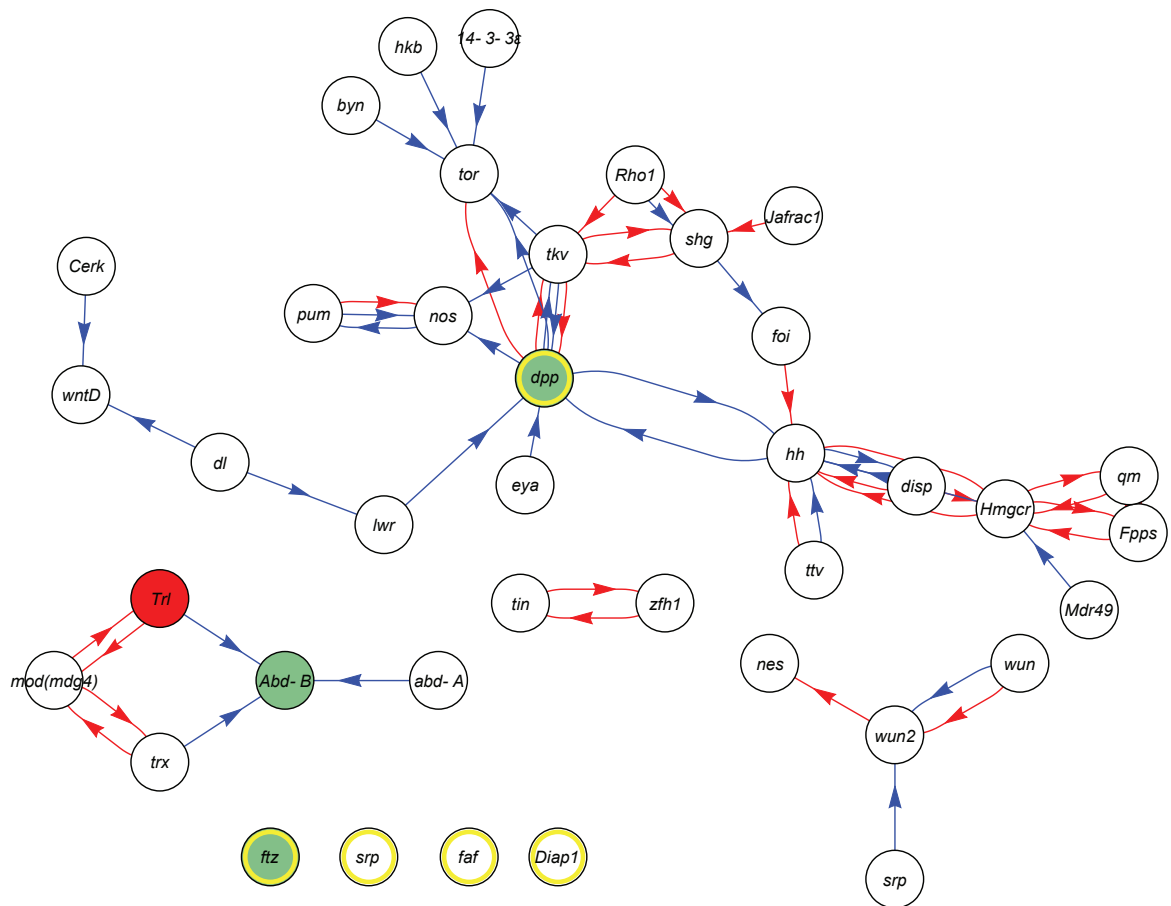


Рис. 57. Сеть генетически взаимодействующих генов, влияющих на миграцию КЗЛ по данным FlyBase. Красные стрелки — усиление фенотипа, синие стрелки — супрессия. Зеленым цветом показаны известные из литературы гены, содержащие GAGA-сайты. Желтым обведены гены, экспрессия которых меняется в яичниках на фоне снижения количества GAGA по данным микрочипового анализа.

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 еще в конце прошлого века было установлено, 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. 57 представлена схема сети генетически взаимодействующих генов, контролирующих разные этапы миграции КЗЛ. Из неё видно, что важную роль в этом процессе играет ген *dpp*, который взаимодействует со многими другими генами, контролирующими миграцию КЗЛ (рис. 57). Следует напомнить, что мы установили, 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.

3.5.2. Формирование гонад у личинок самцов дрозофилы в норме и у *Trl*-мутантов

Мы проанализировали, как сказывается недостаток белка GAGA на формировании гонад на личиночной стадии. В результате мы установили, что у личинок *Trl*-мутантов образуются более мелкие семенники, в 2–4 раза мельче нормальных (рис. 58), что вероятно связано с аномальной эмбриональной миграцией КЗЛ в эмбриогенезе.

В норме на каудальном конце семенников личинок располагаются соматические клетки, которые могут занимать до 30 % объема личиночного семенника

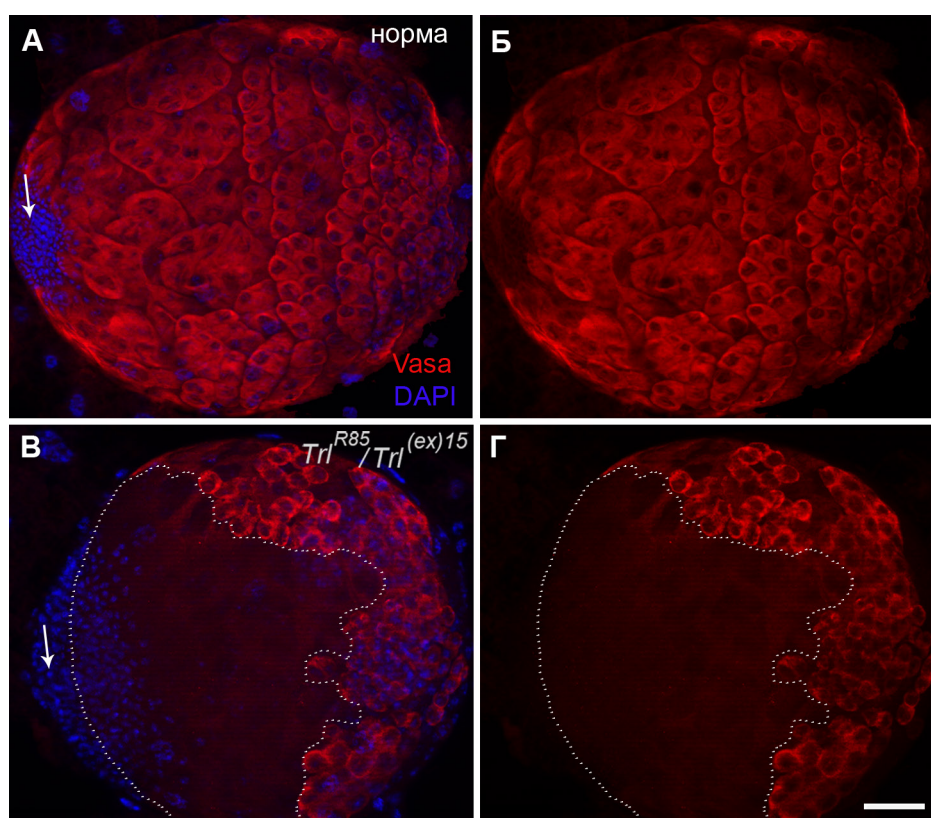


Рис. 58. Сравнение семенников самцов дикого типа и *Trl*-мутантов. (а, б) семенники дикого типа. (в, г) семенники мутантов. У мутантов семенники меньше и в них значительно меньше половых зародышевых клеток. На photographs представлены семенники личинок третьего возраста. Соматические клетки указаны стрелками. Половые зародышевые клетки помечены антителами Vasa (красный), не содержащая Vasa область выделена пунктирной линией. Ядра клеток — DAPI (синий). Масштаб: (а, б) 40 мкм, (в, г) 20 мкм.

(рис. 58 А, Б). У мутантов формируются мелкие семенники с неправильно расположенными соматическими клетками (просмотрено около 50 образцов). Такая особенность морфологии семенника, вероятно, связана с тем, что из-за дефицита КЗЛ часть соматических клеток не участвует в формировании гонад. Следует отметить, что, несмотря на недостаток КЗЛ, личиночные семенники *Trl*-мутантов имеют нормальную сферическую форму.

3.5.3. Сперматогенез на фоне снижения количества белка GAGA

Мы проанализировали, как сказывается недостаток белка GAGA на сперматогенезе взрослых самцов дрозофилы. Первоначально мы установили характер распределения белка GAGA в семенниках взрослых самцов в норме и у мутантов по гену. Известно, что обычно активно работающий транскрипционный фактор GAGA располагается внутри ядра, где он находится в области хроматина. В семенниках самцов дикого типа с помощью антител к данному белку нами было показано, что на ранних стадиях сперматогенеза, т. е. в 2х, 4х и 8 клеточных цистах, GAGA располагается внутри ядра (рис. 59 А–В). Однако по мере роста сперматоцитов и увеличения их объема характер окрашивания антителами меняется, и антитела распределяются равномерно во всей цитоплазме, при этом цитоплазматическая флуоресценция значительно слабее, чем внутриядерная, которая наблюдалась на более ранних стадиях (рис. 59 Г–Е).

Для *Trl*-мутантов, особенно для *Trl^{R85}/Trl^{ex(15)}*, характерно полное отсутствие внутриядерной локализации антител в сперматогониях и сперматоцитах даже на ранних стадиях. Белок GAGA выявляется только в цитоплазме этих клеток, а также в ядрах цистных клеток, которые демонстрируют незначительную, по сравнению с нормой, интенсивность флуоресценции.

Использование электронной микроскопии позволило установить, какие события происходят в цитоплазме и приводят к массовой деградации клеток в сперматогенезе у *Trl*-мутантов. Мы проанализировали ультратонкие срезы семенников у личинок и имаго мутантов *Trl^{R85}/Trl^{ex(15)}* и *Trl^{R85}/Trl³⁶²*, которые характеризуются наиболее сильным нарушением сперматогенеза. В результате было установлено, что мутации не приводит к патологическим изменениям внутриклеточной морфологии на самых ранних стадиях сперматогенеза. Клетки вокруг зоны Hub и расположенные рядом с этой областью сперматогонии морфологически не отличаются от таковых у самцов дикого типа. На этой стадии

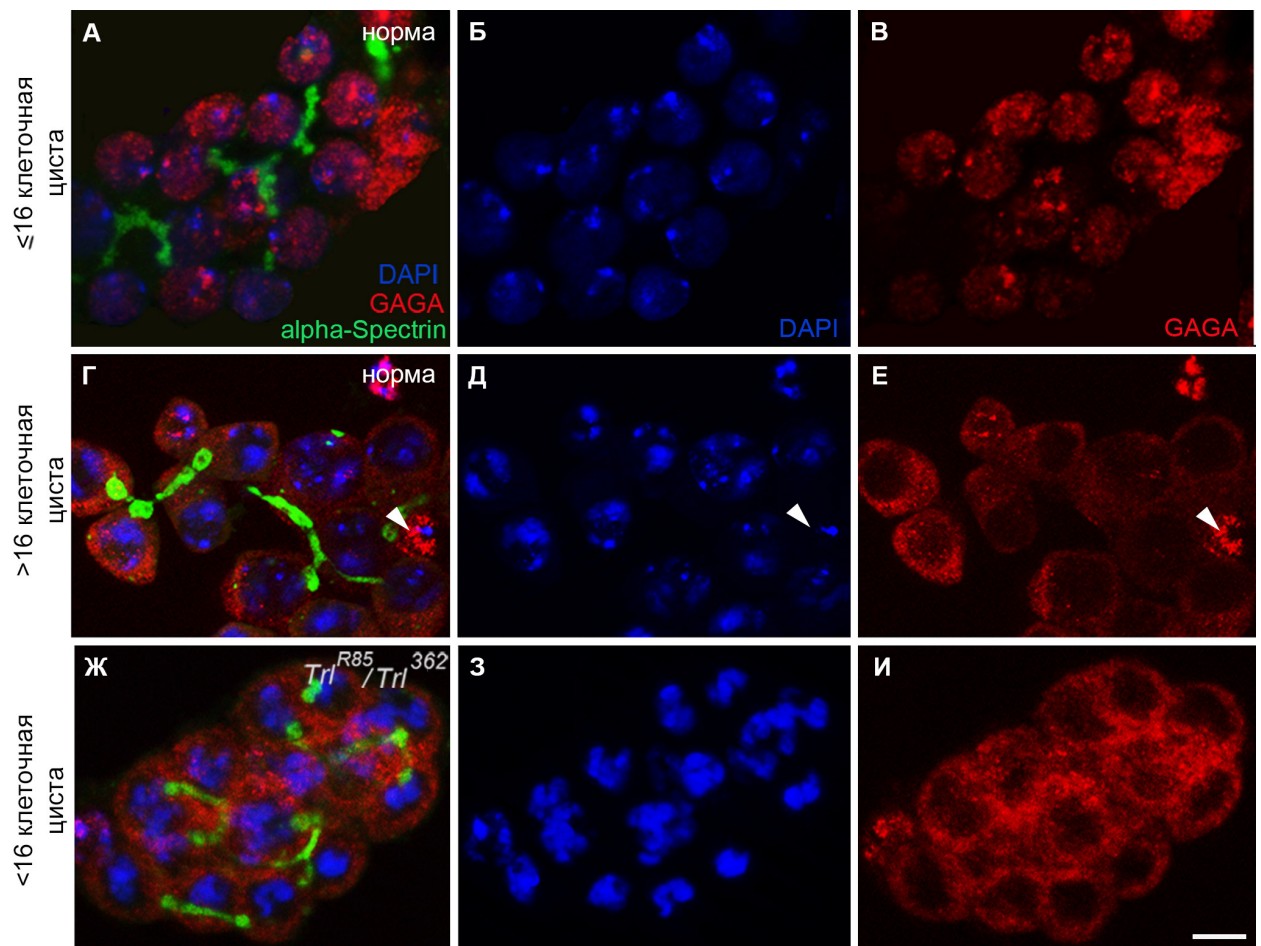


Рис. 59. Распределение белка GAGA в семенниках взрослых самцов дикого типа и *Trl*-мутантов. (а–в) В норме в течении раннего сперматогенеза (до формирования 16-клеточных цист) GAGA распределен внутри ядер, где он колокализуется с хроматином. (г–е) На более поздних стадиях в 16 клеточных цистах этот белок детектируется уже только в цитоплазме, и в ядрах цистных клеток (обозначены треугольниками). (ж–и) У мутантов даже на ранних стадиях GAGA выявляется не в ядрах, а в цитоплазме. Зародышевые половые клетки помечены с помощью антител на α -Spectrin (зеленый), белок GAGA с помощью антител (красный), ядра клеток окрашены DAPI (синий).

клеточная цитоплазма слабо структурирована: в ней мало митохондрий и других внутриклеточных мембран. После второго и третьего митозов количество митохондрий в клетках увеличивается, и в них проявляются значительные дефекты внутренней структуры и морфологии.

У *Trl^{R85}/Trl^{ex(15)}* мутантов, характеризующихся наиболее сильными отклонениями в ходе сперматогенеза, митохондрии значительно крупнее нормальных, имеют сильно разряженный электронно-прозрачный матрикс и значительные внутренние области, лишенные крист (рис. 60). Наружная мембрана местами лишена четких очертаний и выглядит разрыхленной. Если в норме митохондрии достаточно равномерно распределены в цитоплазме в виде компактных телец,

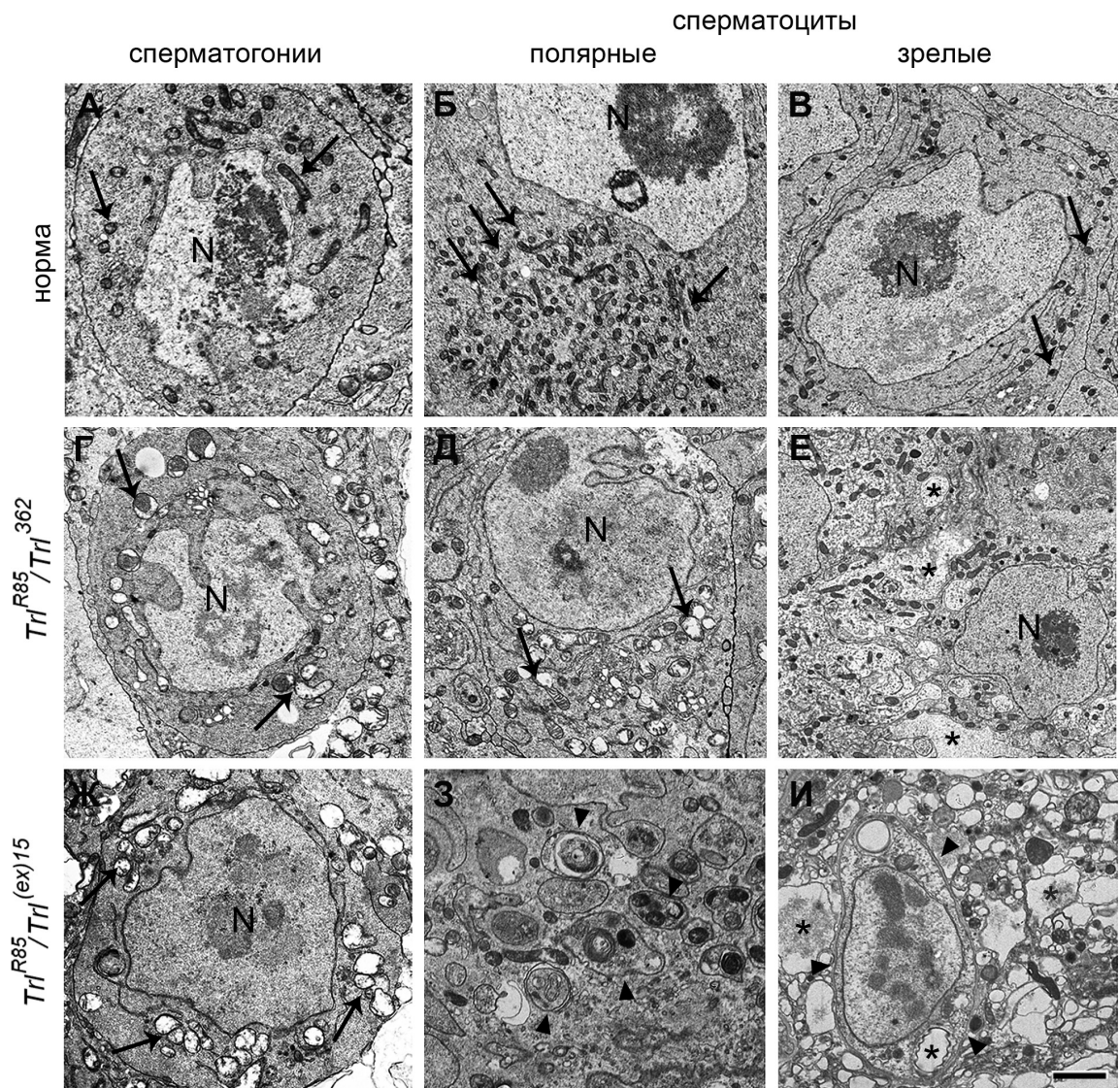


Рис. 60. Электронно-микроскопическое исследование дефектов сперматогенеза в норме и у *Trl*-мутантов на разных стадиях (сперматогонии, полярные сперматоциты и зрелые сперматоциты). У самцов дикого типа видны митохондрии нормальной морфологии. Митохондрии компактны и равномерно распределены по цитоплазме клеток. У мутантов *Trl^{R85} / Trl³⁶²* 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. Звездочками отмечен лизис цитоплазмы. Треугольниками указаны аутофагосомы.

то у мутантов часто происходит агрегация митохондрий и образование их локальных скоплений, не характерных для этой стадии. Дальнейшее развитие событий характеризуется появлением в клетках аутофагосом, включающих в себя клеточные органеллы и участки цитоплазмы. Характерной особенностью мутанта *Trl^{R85} / Trl^{ex(15)}* является быстрая и масштабная вакуолизация цитоплазмы,

которая заканчивается массовым лизисом как внутриклеточных структур, так и плазматической мембраны.

У Trl^{R85}/Trl^{362} мутантов дефекты сперматогенеза выражены слабее, но также выявляются аномалии в структуре митохондрий и активация аутофагии. Однако процесс деградации у этих мутантов развивается более постепенно и начинается с единичных событий на фоне нормального сперматогенеза. Сначала появляются аномальные митохондрии, которые окружаются двухмембранными вакуолями. По мере того, как клетки продолжают делиться и расти, количество митохондрий в них увеличивается. На ультратонких срезах полярных сперматоцитов наблюдаются множественные митохондрии с патологическими изменениями внутренней структуры. Большинство этих органелл выглядят разбухшими, имеют просветленный матрикс и деградированные цисты, как у мутантов $Trl^{R85}/Trl^{ex(15)}$. Но в целом у Trl^{R85}/Trl^{362} мутантов нарушения в сперматогенезе не такие резкие, как у $Trl^{R85}/Trl^{ex(15)}$ мутантов: митохондрии в их половых клетках менее гипертрофированы, не слипаются с образованием аномальных агрегатов, и процесс сперматогенеза, несмотря на митохондриальные дефекты, может доходить до стадии предмейотического роста. Однако сперматоциты с аномальными митохондриями далее этой стадии не развиваются и подвергаются лизису. Клеточная гибель происходит так же как и у $Trl^{R85}/Trl^{ex(15)}$ мутантов, через аутофагию с последующей деградацией цитоплазматического материала в лизосомах. Сперматоциты на этой стадии выглядят как бесформенная масса обломков цитоплазматических структур и лизосом, среди которых «плавают» ядра нормальной морфологии. У Trl^{R85}/Trl^{362} мутантов процессы деградации происходят избирательно, затрагивают приблизительно $\frac{2}{3}$ цист и не распространяются на окружающие ткани. В цистах, в которых сперматоциты не подвергаются аутофагии, сперматогенез идет далее без значительных нарушений и заканчивается формированием полноценных спермиев.

Таким образом, мы продемонстрировали, что мутации гена *Trl* приводят к нарушениям формирования митохондриального аппарата в клетках в ходе сперматогенеза. Патологии в структуре и функционировании митохондрий могут запускать процесс аутофагии и лизиса цитоплазмы. В соответствии с литературными данными потеря крист митохондрий может приводить к уменьшению синтеза АТФ и дефициту энергии в клетке. Кроме того, в цитозоле может аномально измениться содержание и других веществ. Изменение нормальной концентрации этих факторов может быть губительно для клетки и приводить

к аутофагии (Fischer *et al.*, 2012; Taylor & Rutter, 2011; Twig & Shirihai, 2011; Lee *et al.*, 2012).

В норме в ходе сперматогенеза *Drosophila* в клетках зародышевой линии выявляется огромное количество митохондрий, которые заполняют практически весь объем этих клеток. Очевидно, что у *Trl*-мутантов этот процесс нарушен, что приводит к аутофагии. У мутантов *Trl^{R85}/Trl^{(ex)15}* аутофагия начинается ранее, протекает быстрее и заканчивается лизисом цитоплазмы на стадии 4–8-клеточной цисты. У более слабых мутантов *Trl^{R85}/Trl³⁶²* этот процесс происходит менее драматично и клетки часто умирают уже на стадии 16-клеточной цисты. Следует подчеркнуть, что обнаруженный нами феномен аутофагии у мутантов *Trl* является уникальным, поскольку это первое описание ярко выраженной аутофагии в сперматогенезе дрозофилы. Аутофагия — эволюционно-консервативный процесс, который позволяет утилизировать поврежденные или отработанные органеллы и макромолекулы, позволяя тем самым клетке держать свою структуру в порядке (Mizushima, 2007; Kelekar, 2005; Glick *et al.*, 2010). Аутофагия, являющаяся одним из видов запрограммированной клеточной смерти, может наблюдаться на разных этапах онтогенеза и в разных органах и тканях. У *Drosophila* этот процесс описан для клеток слюнных желез, желудка и для питающих клеток яйцевой камеры на последних этапах оогенеза (Baehrecke, 2003; Neufeld & Baehrecke, 2008; McPhee & Baehrecke, 2009; Chang & Neufeld, 2010). В сперматогенезе аутофагия была описана у мыши как ответ на тепловой шок (Zhang *et al.*, 2012). В ходе сперматогенеза дрозофилы такой феномен не отмечался.

Мы полагаем, что неправильная экспрессия ряда генов-мишеней GAGA может быть причиной нарушений сперматогенеза дрозофилы при уменьшении количества этого ТФ. Известно, что экспрессия генов теплового шока *Hsp26* и *Hsp70* зависит от GAGA-фактора (Lee *et al.*, 2008). Потеря этих белков приводит к различным дефектам в метаболизме клеток: накоплению агрегатов неправильно упакованных макромолекул, дефектам внутриклеточного транспорта, редукции толерантности к стрессу (Saibil, 2008). В результате накапливаемые в клетке вредные факторы запускают механизм программируемой клеточной смерти. Один из членов семейства белков *Hsp70*, митохондриальный *Hsp70* (*mtHsp70*), является важным регулятором импорта полипептидов из цитозоля в матрикс митохондрий с последующей упаковкой этих белков. Редукция экспрессии *mtHsp70* изменяет состав матрикса и приводит к нарушению компартментализации

митохондрий (Voos & Rottgers, 2002; Liu *et al.*, 2001). Таким образом, изменение активности одного из генов семейства *Hsp70* не только участвует в обеспечении устойчивости к стрессу, но и контролирует физиологию клетки.

На культуре клеток было показано, что *Trl* может участвовать в регуляции экспрессии одного из генов, входящих в семейство *Hsp70* (Georgel, 2005; Weber *et al.*, 1997). Хотя взаимодействие генов *Trl* и *Hsp70* в обеспечении разных клеточных процессов изучено слабо, сравнение характера дефектов при нарушении экспрессии каждого из данных генов в процессе оогенеза показывает, что их функции могут перекрываться. В частности, оба гена контролируют миграцию бордюрных клеток и участвуют в формировании актинового цитоскелета. (Cobrerros *et al.*, 2008). Мутации по гену *Hsp70* также влияют на сперматогенез *Drosophila* но фокус действия этих мутаций не известен. Таким образом, не исключено, что экспрессия *Hsp70* может регулироваться GAGA в ходе сперматогенеза *Drosophila*.

Заключение

Таким образом, мы впервые установили, что GAGA требуется для формирования гамет у самцов *Drosophila*. Цитологический анализ *Trl*-мутантов показал, что GAGA участвует в обеспечении механизмов миграции клеток зародышевого пути в процессе эмбриогенеза, а также морфогенезе митохондрий в течение сперматогенеза. Нарушения в миграции клеток зародышевого пути приводят к формированию семенников, содержащих очень небольшое количество половых клеток. Установлено, что эти немногочисленные клетки могут развиваться нормально, в результате чего должно образовываться определенное количество спермы. Однако многочисленные митохондриальные дефекты, выявленные у *Trl*-мутантов, приводят к аутофагии в процессе сперматогенеза, в результате у анализируемых нами мутантов *Trl* наблюдается драматическое снижение фертильности. Следует отметить, что описанный мутантный фенотип семенников *Trl*-мутантов был полностью восстановлен, если в геном мутантов мы включали трансгены *hsp83:GAGA-519* и *hsp83:GAGA-581* продуцирующих продукты гена *Trl*. Самцы *Trl*-мутантов, несущие даже одну копию одного из трансгенов, показывают полностью нормальный сперматогенез и нормальную фертильность (Dorogova *et al.*, 2014). Это указывает на то, что именно снижение количества GAGA является причиной снижения фертильности самцов *Trl*-мутантов.

3.6. Влияние белка GAGA на формирование глаза дрозофилы

Используя полученный и охарактеризованный нами набор гипоморфных мутаций по гену *Trl*, мы исследовали влияние нарушений экспрессии данного гена на формирование глаза дрозофилы.

3.6.1. Анализ поверхности глаза у *Trl*-мутантов

С помощью электронного сканирующего микроскопа мы продемонстрировали, что для мутантов по гену *Trl* характерно нарушение поверхности глаза (рис. 61). В норме глаз дрозофилы состоит примерно из 700–800 функциональных единиц, называемых омматидиями. Поверхность глаза представляет собой правильно организованные ряды, состоящие из образованных секретом клеток омматидия линз. Поскольку линзы имеют форму шестиугольника длина горизонтальных сторон которых составляет 9 мкм, а скошенных — 11 мкм (Cagan & Ready, 1989), данная структура по морфологии напоминает соты.

В норме линзы расположены в виде четко организованных рядов. В трех вершинах каждой линзы располагается по одной механо-сенсорной щетинке. У мух дикого типа щетинки, располагающиеся вокруг линз на самой кромке глаза, могут отсутствовать (Ready *et al.*, 1976). В редких случаях щетинки могут отсутствовать и в вершинах линз, расположенных не по краю. Как показано в ТАБЛ. II, в линии *Oregon R* щетинки отсутствовали в 3,6 % вершин линз, расположенных не на краю глаза. Однако в некоторых случаях наблюдалось появление дополнительных щетинок, или они появлялись в необычных местах. Так было выявлено, что в глазах мух дикого типа в среднем 1,3 % щетинок изменили локализацию (ТАБЛ. II).

Табл. 11. Нарушение распределения щетинок вокруг омматидиев *Trl*-мутантов.

Тип нарушения	Встречаемость нарушений у мух следующих генотипов, (%)		
	<i>+/Y; Trl³⁶²/Trl^{R85}</i>	<i>+/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}</i>	<i>Oregon R</i> (самцы)
Отсутствие щетинки в должной позиции	26,0±1,0***	26,0±1,0***	3,6±0,4
Изменение локализации щетинки	4,2±0,5***	3,4±0,4***	1,3±0,3
Просмотрено позиций локализации щетинок:			
	1974	2006	2167

Примечание. Показана достоверность различий между частотами нарушений у мутантов контроле у мух *Oregon R* (***) - $P < 0,001$.

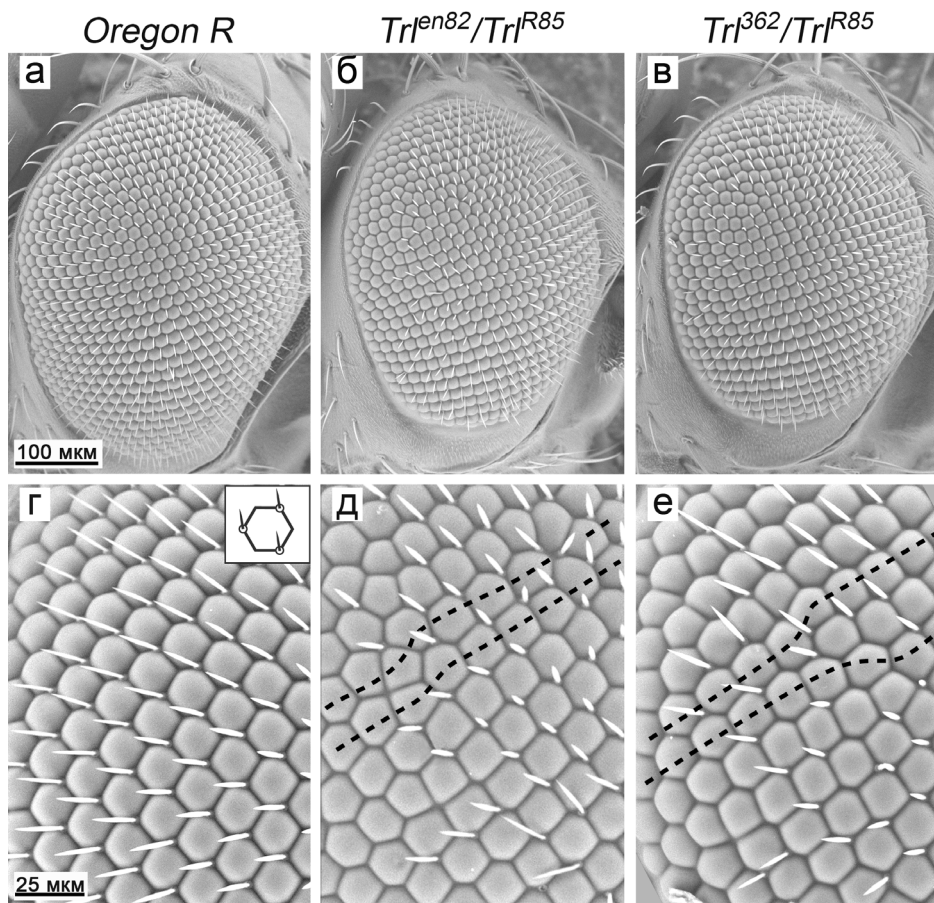


Рис. 61. Нарушения поверхности глаза имаго *Trl*-мутантов. а, г — глаз мухи дикого типа. Линзы располагаются ровными рядами. На схеме (г, вкладка) показано, что линза имеет форму шестиугольника, в трех вершинах которого располагаются щетинки; б, д — глаз мутанта *Trl^{en82}/Trl^{R85}*; в, е — глаз мутанта *Trl³⁶²/Trl^{R85}*. В глазах мутантов присутствуют линзы неправильной формы, наблюдается недостаток щетинок. Пунктиром отмечено нарушение четкости рядов из линз: (д) из-за изменения формы некоторых линз и недостатка одной линзы; (е) из-за вклинивания между рядами дополнительных линз. Масштаб: 100 мкм (а-в); 25 мкм (г-е).

У *Trl*-мутантов все вышеперечисленные дефекты в организации поверхности глаза значительно усиливаются. Анализ поверхности глаза показал, что у *Trl*-мутантов примерно четверть щетинок, располагающихся вокруг линз, отсутствует, т. е. отсутствие щетинок у мутантов наблюдается в 7 раз чаще, чем в контроле (табл. II, рис. 61). В анализе не учитывались щетинки, расположенные вокруг двух крайних рядов линз, поскольку, как отмечалось выше, такие щетинки часто отсутствуют и в глазах мух дикого типа. Установлено, что доля щетинок с измененной локализацией у *Trl*-мутантов также в 2–3 раза выше, чем в контроле (табл. II). Кроме того, у *Trl*-мутантов выявляются нарушения в организации рядов из линз. Особенно часто такие нарушения встречаются на заднем краю глаза. Нарушение рядов линз может быть связано с появлением

дополнительных линз или с отсутствием отдельных линз, а также с изменением их размера и формы (рис. 61 д, е). Последний дефект (изменение формы линз) характерен не только для дополнительных, но и для регулярных рядов. Следует отметить, что размер глаз у *Trl*-мутантов несколько меньше, чем у мух дикого типа. Так, в глазах мутантных самцов $+/Y; Trl^{362}/Trl^{R85}$ и $+/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}$ в среднем присутствует 584 и 588 линз (омматидиев), соответственно, тогда как у самцов дикого типа *Oregon R* — 665 линз (Павлова и др., 2010).

3.6.2. Анализ полутонких срезов глаз имаго дрозофилы

Для детального изучения внутренней структуры омматидиев был проведен анализ полутонких срезов глаз имаго дрозофил в норме и у мутантов. В норме на срезе глаза омматидии имеют форму шестиугольника, между которыми располагаются гранулы пигментных клеток (рис. 62 а). В каждом омматидии выявляются 6 внешних фотонейронов и два внутренних (фотонейроны 7 и 8), лежащих друг под другом на разной глубине. Каждый из фотонейронов состоит из тела клетки и уплотненной структуры — рабдомера. Рабдомер представляет собой около 60 тысяч светочувствительных микроворсинок, распределенных по

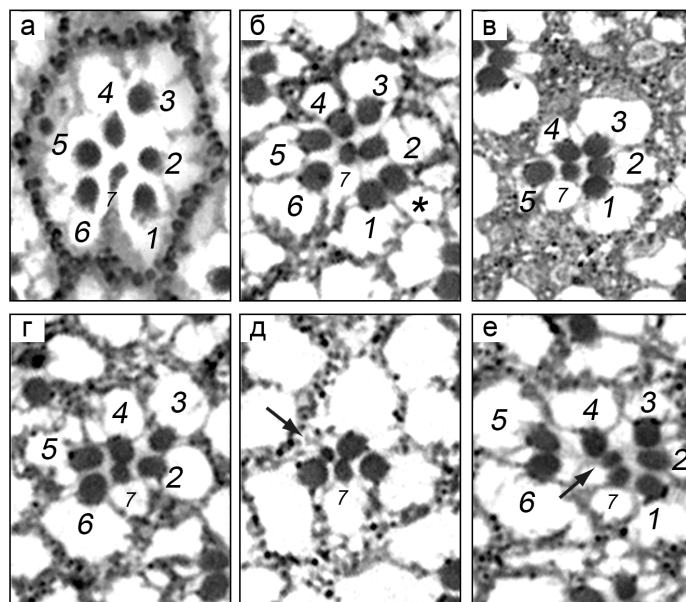


Рис. 62. Изменения количества фотонейронов в омматидиях мутантов Trl^{en82}/Trl^{R85} и Trl^{362}/Trl^{R85} . а — омматидий мухи дикого типа; б-е — омматидии *Trl*-мутантов. Цифрами 1-7 указаны фотонейроны R1-R7, соответственно. (б) Присутствие дополнительного внешнего фотонейрона (отмечен звездочкой). (в-д) Недостаток внешних фотонейронов R1-R6 (д, е). Присутствие дополнительного внутреннего фотонейрона. Наблюдается дополнительный фотонейрон, по расположению и морфологии рабдомера напоминающий R7 (отмечен стрелкой).

всей длине тела фотонейрона. Рабдомеры внешних фотонейронов R1-R6 образуют трапециевидную структуру, в центре которой располагается меньший по размеру рабдомер фотонейрона R7 (рис. 62 а) или R8, в зависимости от глубины среза. В норме аномалии в расположении и в количестве рабдомеров у мух дикого типа встречаются крайне редко (ТАБЛ. 12).

При анализе серий полутонких срезов глаз *Trl*-мутантов в части омматидиев были выявлены структурные нарушения. У мутантов *Trl³⁶²/Trl^{R85}* и *Trl^{en82}/Trl^{R85}* в некоторых омматидиях обнаруживалось отличное от нормы число внешних фотонейронов R1-R6 (таб.12; Павлова и др., 2010). Чаше встречались омматидии с меньшим (3-5) количеством фотонейронов R1-R6, однако встречались и омматидии с большим числом фотонейронов (рис. 62 в-д). Заключение об изменении числа фотонейронов делалось на основе анализа нескольких срезов. С частотой менее 0,5 % в омматидиях *Trl*-мутантов наблюдался дополнительный внутренний фотонейрон, по размеру и расположению рабдомера похожий на фотонейрон 7 (ТАБЛ. 12, рис. 62 д, е). Не исключено, что рабдомер R7 не отсутствовал, а был укорочен и расстояние между рабдомерами фотонейронов 7 и 8, которое в норме составляет 1мкм, увеличено.

Одним из наиболее часто встречаемых нарушений, выявленных при анализе полутонких срезов *Trl*-мутантов, было изменение ориентации омматидиев

Табл. 12. Нарушения количества и расположения фотонейронов в омматидиях *Trl*-мутантов.

Тип нарушения	Встречаемость нарушений у мух следующих генотипов, (%)	
	+/ <i>Y</i> ; <i>Trl³⁶²/Trl^{R85}</i>	+/ <i>Y</i> ; <i>Trl^{en82}/Trl^{R85}</i>
Недостаток внешних фотонейронов (R1-R6)	1,7±0,4***	0,9±0,3***
Избыток внешних фотонейронов (R1-R6)	0,2±0,1*	0,7±0,3***
Дополнительный фотонейрон R7	0,5±0,2**	0,1±0,1
Отсутствие рабдомера R7 на нескольких срезах	0,4±0,2**	2,2±0,5***
Изменена ориентация омматидия	11,7±1,0***	7,3±1,0***
Просмотрено омматидиев (глаз) у имаго на срезах:		
	1107 (7)	967 (5)

Примечание. У мух *Oregon R* данные нарушения выявлены не были (просмотрено 905 омматидиев, 5 глаз). Показана достоверность различий между частотами нарушений у мутантов *Trl³⁶²/Trl^{R85}*, *Trl^{en82}/Trl^{R85}* и в норме, у мух *Oregon R* (*** - $P < 0,001$; ** - $P < 0,01$; * - $P < 0,05$).

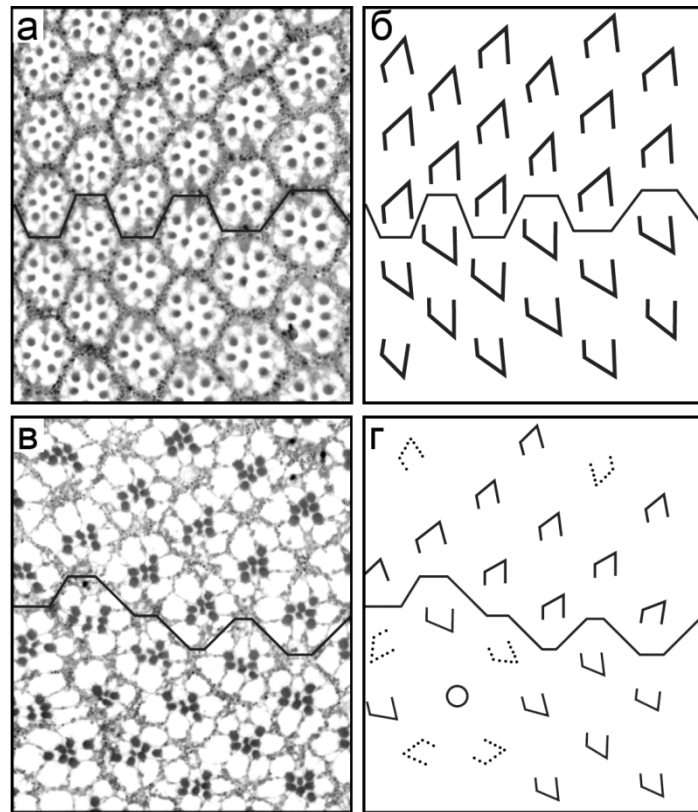


Рис. 63. Нарушение ориентации омматидиев в глазах *Trl*-мутантов. а — срез глаза мухи дикого типа; в — срез глаза мутанта *Trl*³⁶²/*Trl*^{R85}; б, г - схемы, изображающие ориентацию омматидиев на срезах. Линией изображен экватор, относительно которого в дорзальной и вентральной частях глаза омматидии располагаются зеркально. (а, б) В норме трапециевидные структуры из рабдомеров располагаются под углом $90^\circ \pm 20^\circ$ к горизонтали, отмечены черным, (в, г). У мутантов *Trl*³⁶²/*Trl*^{R85} в некоторых омматидиях трапециевидные структуры из рабдомеров отклоняются от нормального положения (отмечены пунктиром).

(Павлова и др., 2010). Об ориентации омматидия судят по расположению трапециевидной структуры, образованной рабдомерами. В норме две стороны этой структуры, располагающиеся параллельно друг другу, содержат рабдомеры R1, R2, R3 и R5, R6, соответственно. Третья сторона этой структуры содержит рабдомеры R3, R4, R5 и располагается под углом примерно 45° относительно стороны R1 R2, R3 (рис. 62 а, рис. 63 а, б). В норме омматидий ориентирован таким образом, что рабдомеры R1, R2, R3 и R5, R6 располагаются практически перпендикулярно, т. е. под углом $90^\circ \pm 10^\circ$ к условной срединной линии глаза — экватору (рис. 63 а, б). В процессе развития глаза клетки омматидиев претерпевают ротацию. Этот процесс происходит в глазо-антеннальном диске куколок, в результате чего устанавливается описанная ориентация омматидия у взрослых мух. Фотонейроны омматидия претерпевают ротацию как единое

целое, поэтому нарушение данного процесса приводит к тому, что стороны трапецевидной структуры одинаково отклоняются от нормального положения. В норме их отклонения не превышает 10° в омматидиях, располагающихся в центральной части глаза, и 20° в омматидиях, располагающихся ближе к периферии глаза (Reifegerste & Moses, 1999; Mirkovic & Mlodzik, 2006).

У *Trl*-мутантов наблюдается нарушение ориентации омматидиев. Так у мутантов *Trl³⁶²/Trl^{R85}* в среднем 11,7 % омматидиев ориентированы неправильно. У них наблюдается отклонение расположения трапецевидной структуры из рабдомеров более чем на 20° от нормального положения (рис. 63 в, г). У *Trl^{en82}/Trl^{R85}* мутантов данные нарушения встречались в 7,3 % омматидиев (табл. 12). В некоторых случаях угол расположения структуры из рабдомеров относительно горизонтали составлял 53° и 167° вместо $90^\circ \pm 20^\circ$ (Павлова и др., 2010).

3.6.3. Анализ глазо-антеннальных имагинальных дисков *Trl*-мутантов

Структура и распределение конусных и пигментных клеток у *Trl*-мутантов анализировались на оптических срезах глазо-антеннальных имагинальных дисков куколок в возрасте 42 часа после окукливания, поскольку к этому моменту все клетки глаза занимают свои окончательные позиции (Cagan & Ready, 1989). В ходе экспериментов глазо-антеннальные диски окрашивались антителами к белку Armadillo (Arm), что позволяет выявить границы клеток. Как показано на рис. 64, в норме на оптических срезах, проходящих через вершину омматидия, выявляются четыре конусные клетки (отмечены коричневым), окруженные двумя первичными пигментными клетками одинакового размера (отмечены фиолетовым). Вокруг них располагаются 6 вторичных пигментных клеток (отмечены бирюзовым), образуя гексагональную ячейку. В каждой из шести вершин этой структуры лежит одна третичная пигментная клетка (желтый) или механо-сенсорная щетинка (зеленый).

У *Trl*-мутантов наблюдаются нарушения в числе и расположении вторичных и третичных ПГК. В норме щетинки, а также вторичные и третичные ПГК образуют гексагональную ячейку вокруг омматидия. Каждая вторичная ПГК прилегает с одной стороны к щетинке, а с другой к третичной ПГК. Между двумя щетинками, лежат две вторичные ПГК и одна третичная (на схеме отмечены бирюзовым и желтым цветом, соответственно). У мутантов *Trl^{en82}/Trl^{R85}* между

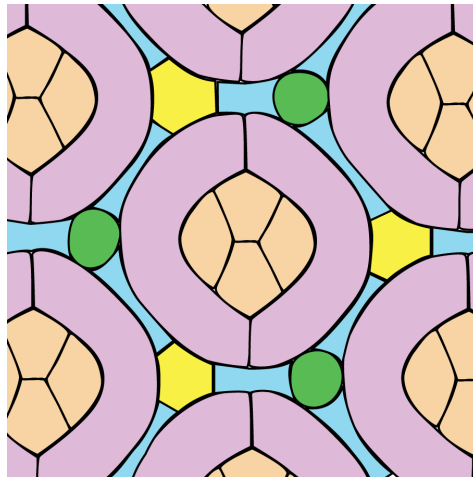


Рис. 64. Схема расположения клеток омматида на апикальной поверхности глазо-антеннального имажинального диска 42-х часовых куколок дрозофилы. Коричневым цветом выделены конусные клетки, первичные пигментные клетки — фиолетовым, голубым — вторичные пигментные клетки, желтым — третичные пигментные клетки, зеленым выделены щетинки.

щетинками, могут присутствовать дополнительные ПГК, на схеме они отмечены красным цветом (рис. 65 в, г). Чаще такие клетки присутствуют рядом со вторичными ПГК. У мутантов наблюдаются также нарушения в распределении щетинок и третичных ПГК. На месте щетинки часто располагается третичная ПГК (отмечено широкой стрелкой), а иногда на месте третичной пигментной клетки располагается щетинка (отмечено узкой черной стрелкой). Иногда рядом со щетинкой присутствует дополнительная щетинка (отмечено белой стрелкой).

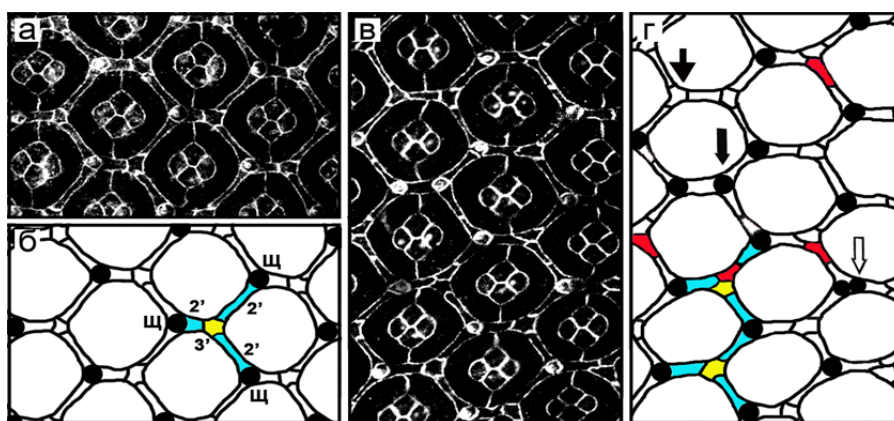


Рис. 65. Нарушение распределения пигментных клеток и щетинок (Щ) — вокруг омматида *Trl*-мутантов. Фотографии оптических срезов омматида верхней поверхности глазо-антеннальных имажинальных дисков 42-х часовых куколок: (а, б) дикого типа; (в, г) мутантов *Trl*^{en82} / *Trl*^{R85}. Схемы расположения пигментных клеток и щетинок в дисках, представленных на фотографиях: (а, б) в норме; (и, г) у мутантов. Щ — щетинка, 2' — вторичная ПК, 3' — третичная ПК. Диски окрашивались антителами к белку Arm.

Следует отметить, что замещение щетинки третичной пигментной клеткой иногда происходит также и у мух линии *Oregon R*, однако данная замена, если и наблюдается, то обычно вокруг омматидиев, располагающихся по краю диска.

Нами установлено, что недостаток белка GAGA может приводить и к изменению количества и размера первичных пигментных клеток омматидия. У мутантов *Trl^{en82}/Trl^{R85}* и *Trl³⁶²/Trl^{R85}* в среднем 1,3 и 2,3 % омматидиев, соответственно, содержат три первичные пигментные клетки. Наличие только одной такой клетки наблюдалось в 0,1 % омматидиев мутантов обоих генотипов (ТАБЛ. 13, рис. 66 б, в). В некоторых омматидиях этих мутантов первичные пигментные клетки имеют не одинаковый размер, что сопровождается тем, что один или оба контакта между этими клетками отклоняются от нормального расположения (рис. 66 г). Такие нарушения встречаются с частотами 0,2 и 0,6 % у мутантов *Trl^{en82}/Trl^{R85}* и *Trl³⁶²/Trl^{R85}*, соответственно.

Нами впервые было установлено, что у *Trl*-мутантов некоторые омматидии содержат не четыре, как в норме, а другое количество конусных клеток (рис. 67; Павлова и др., 2010). Такое нарушение наблюдалось у мутантов *Trl^{en82}/Trl^{R85}* и *Trl³⁶²/Trl^{R85}* с частотой 2,6 % 4,3 %, соответственно (ТАБЛ. 13). Чаше встречались омматидии, в которых присутствовало 3 конусные клетки, однако в некоторых

Табл. 13. Нарушения структуры омматидия, наблюдаемые в глазо-антеннальных имажинальных дисках 42-часовых куколок *Trl*-мутантов.

Тип нарушения	Встречаемость нарушений у куколок следующих генотипов, (%)		
	<i>+/Y; Trl³⁶²/Trl^{R85}</i>	<i>+/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}</i>	<i>Oregon R</i> (самцы)
Недостаток конусных клеток	4,3±0,4***	2,6±0,3***	0,0±0,1
Изменена ориентация контактов между конусными клетками	0,8±0,2***	0,4±0,1***	0,0±0,1
Нарушены контакты между конусными клетками	0,2±0,1	0,4±0,1	0,2±0,1
Изменено количество первичных пигментных клеток	2,4±0,3***	1,4±0,2***	0,3±0,2
Изменен размер первичных пигментных клеток	0,6±0,2***	0,2±0,1*	0,0±0,1
Просмотрено омматидиев (дисков) куколок:			
	2679 (16)	2841 (12)	1027 (15)

Примечание. Показана достоверность различий между частотами нарушений у мутантов *Trl³⁶²/Trl^{R85}*, *Trl^{en82}/Trl^{R85}* и в норме, у мух *Oregon R* (*** - $P < 0,001$; * - $P < 0,05$).

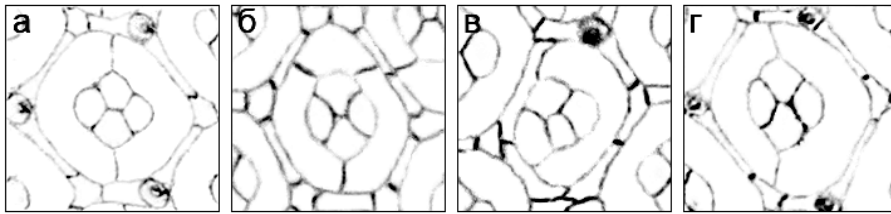


Рис. 66. Нарушения количества первичных ПГК и контактов между ними у мутантов *Trl^{en82} / Trl^{R85}* и *Trl³⁶² / Trl^{R85}*. Фотографии омматидиев в глазо-антеннальных имажинальных дисках 42-х часовых куколок: (а) дикого типа; (б - д) мутантов по гену *Trl*. (а) в норме две первичных ПГК одинакового размера окружают кластер конусных клеток. (б) В омматидии присутствует одна дополнительная первичная ПГК. У мутантов: (в) в омматидии присутствует всего одна первичная ПГК. (г) первичные ПГК имеют неодинаковый размер, поскольку нижний контакт между этими клетками нарушен. Окрашивание дисков проводилось с помощью антител к белку Arm.

омматидиях наблюдалось 2 или 5 конусных клеток. В норме конусные клетки организованы в кластер эллипсовидной формы. У *Trl*-мутантов примерно в 1 % омматидиев кластеры имеют другую форму (табл. 13). Среди них в половине случаев изменялась ориентация контакта конусных клеток, в результате чего форма кластера была сильно изменена (рис. 67).

Таким образом, снижение экспрессии гена *Trl* приводит к разнообразным дефектам структуры глаза. Поскольку продукт гена *Trl* — ТФ GAGA участвует в регуляции транскрипции ряда генов дрозофилы, то наиболее вероятной причиной нарушений в структуре глаза у *Trl*-мутантов является изменение

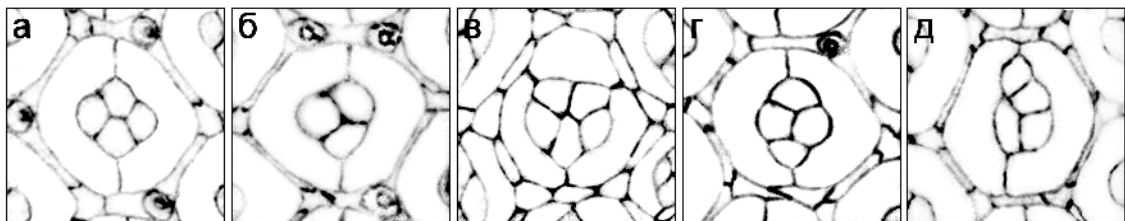


Рис. 67. Нарушения в организации кластеров конусных клеток у мутантов *Trl^{en82} / Trl^{R85}* и *Trl³⁶² / Trl^{R85}*. Фотографии омматидиев в глазо-антеннальных имажинальных дисках 42-х часовых куколок: (а) дикого типа; (б - д) мутантов по гену *Trl*. (а) в норме 4 конусные клетки организованы в кластер в центре омматидия, каждая из них контактирует с двумя ближайшими конусными клетками. Верхняя и нижняя конусные клетка контактируют в центре кластера. У мутантов: (б) в кластере присутствуют 3 конусных клетки; (в) в кластере присутствуют 5 конусных клеток; (г) нарушение контактов между конусными клетками: вместо экваториальных в центре кластера контактируют передняя и задняя конусные клетки; (д) значительно уменьшен контакт верхней конусной клетки с задней конусной клеткой. Окрашивание дисков проводилось с помощью антител к белку Arm.

экспрессии гена или генов, участвующих в его развитии. К числу потенциальных генов-мишеней белка GAGA может относиться ген *lozenge* (*lz*), поскольку мутация *Trl^{en82}* была выявлена М. А. Волошиной как энхансер проявления фенотипа температуро-чувствительной мутации *lz^{ts1}* (М. А. Волошина, персональное сообщение). К потенциальным генам-мишеням белка GAGA, задействованным в развитии глаза, могут относиться также и гены комплекса *Bar*, поскольку нами было отмечено, что *Trl*-мутации усиливают эффект, вызываемый дупликацией *Bar^l*, заключающийся в формировании узкого глаза. Эти гены имеют сайты связывания белка GAGA в своих регуляторных районах (Omelina *et al.*, 2011). С помощью разработанного на основе программного пакета SITECON Е. С. Омелиной и Д. Ю. Ощепковым метода распознавания сайтов связывания белка GAGA, в 5'-области гена *lozenge* была обнаружена последовательность *agaaGAGcaaGAGAGAGAG-AGAGAGAGAGAG*, расположенная в районе –281...–251 п. н., относительно старта транскрипции. В ней содержатся потенциальные сайты связывания GAGA. Потенциальные сайты связывания белка GAGA были выявлены и в 5'-областях генов комплекса *Bar*. В этот комплекс входят гены *BarH1* и *BarH2*. Установлено, что гены *BarH1* и *BarH2* экспрессируются в одних и тех же типах клеток, а их продукты содержат практически одинаковые гомеодомены и, как предполагают, имеют одинаковые функции (Higashijima *et al.*, 1992). В 5'-области гена *BarH1* выявлен сайт *gaaaccgggGAGAGACtttatttca*, расположенный в районе –319...–295 п. н. относительно старта транскрипции данного гена. В районе –168...–144 п. н. относительно старта транскрипции гена *BarH2*, располагается сайт *caggtcaatGAGcGAaaaagagacg*. Сайты, найденные в регуляторных областях генов *BarH1* и *BarH2*, относятся к GAGA сайтам типа *GAGnGAG*. Методом задержки ДНК-зонда в геле было подтверждено связывание рекомбинантного белка GAGA с последовательностями GAGA-сайтов, выявленных в 5'-областях генов *lz*, *BarH1* и *BarH2* (Omelina *et al.*, 2011). Найденные в 5'-областях гена *lz*, *BarH1* и *BarH2* GAGA сайты, с которыми связывается рекомбинантный белок GAGA, дают основание предполагать, что данные гены являются генами-мишенями белка GAGA.

Для подтверждения данного предположения мы провели анализ генетического взаимодействия между генами *Trithorax-like*, *Bar* и *lz*, а также исследовали, как изменяется экспрессия генов *Bar* и *lz* на фоне уменьшения количества белка GAGA.

3.6.4. Взаимодействие генов *Trithorax-like* и *lozenge*

В экспериментах по выявлению генов, взаимодействующих с геном *lz*, обычно используют температуро-чувствительную мутацию *lz^{tsl}*. У мутантов *lz^{tsl}*, выращенных при 25 °С, поверхность глаза практически не отличается от нормы, тогда как в глазах мух, выращенных при 28 °С, на поверхности глаза выявляются плохо сформированные линзы с размытыми между ними границами. Также выявляются линзы, отличающиеся от нормы по форме и размеру. Кроме того, у таких мутантов встречаются неправильно расположенные щетинки, в некоторых случаях щетинки могут отсутствовать. Глаза мутантов *lz^{tsl}*, выращенных при 28 °С, меньше, чем у мух дикого типа (Gupta & Rodrigues, 1995). У мух, несущих мутацию *lz^{tsl}*, а также мутацию гена, взаимодействующего с геном *lz*, глаза и при 25 °С должны быть аналогичны глазам мутантов *lz^{tsl}*, выращенным при 28 °С (Gupta & Rodrigues, 1995; Kaminker *et al.*, 2001). В нашей работе мы продемонстрировали, что проявление мутации *lz^{tsl}* при 25 °С значительно усиливается на фоне гипоморфных мутаций *Trl^{en82}* и *Trl³⁶²*. Такой же эффект мы наблюдали и при использовании гипоморфной мутации *lz^K*, проявление которой не зависит от температуры.

Нами установлено, что у мутантов *lz^{tsl}; Trl³⁶²/Trl^{R85}* и *lz^{tsl}; Trl^{en82}/Trl^{R85}* сильно изменилась поверхность глаза по сравнению с одиночными мутантами. Так на заднем краю глаза дигетерозигот многие линзы имеют ненормальную форму и/или размер (рис. 68), тогда как у мутантов *lz^{tsl}*, выращенных при 25 °С, а также у мутантов *Trl³⁶²/Trl^{R85}* и *Trl^{en82}/Trl^{R85}* нарушения наблюдаются лишь в одиночных омматидиях. Кроме того, у мутантов *lz^{tsl}; Trl³⁶²/Trl^{R85}* и *lz^{tsl}; Trl^{en82}/Trl^{R85}* выявлены более сильные нарушения в распределение щетинок, располагающихся вокруг омматидиев, чем у одиночных мутантов. У мутантов *lz^{tsl}; Trl³⁶²/Trl^{R85}* и *lz^{tsl}; Trl^{en82}/Trl^{R85}* щетинки отсутствуют примерно в 40 % позиций, тогда как у мутантов по одному из генов они отсутствуют в 25 % случаев. У двойных мутантов в среднем в 2–3 раза увеличена встречаемость щетинок в неправильной позиции (табл. 14).

У мутантов, несущих в геноме другую мутацию по гену *lz* — *lz^K* на фоне мутаций по гену *Trl*, поверхность глаз также изменена значительно сильнее, чем у мутантов по одному из этих генов (рис. 69). Следует отметить, что мутация *lz^K* приводит к более сильным нарушениям, чем мутация *lz^{tsl}*. У мутантов *lz^K*, выращенных при нормальной температуре, на заднем краю глаза многие линзы

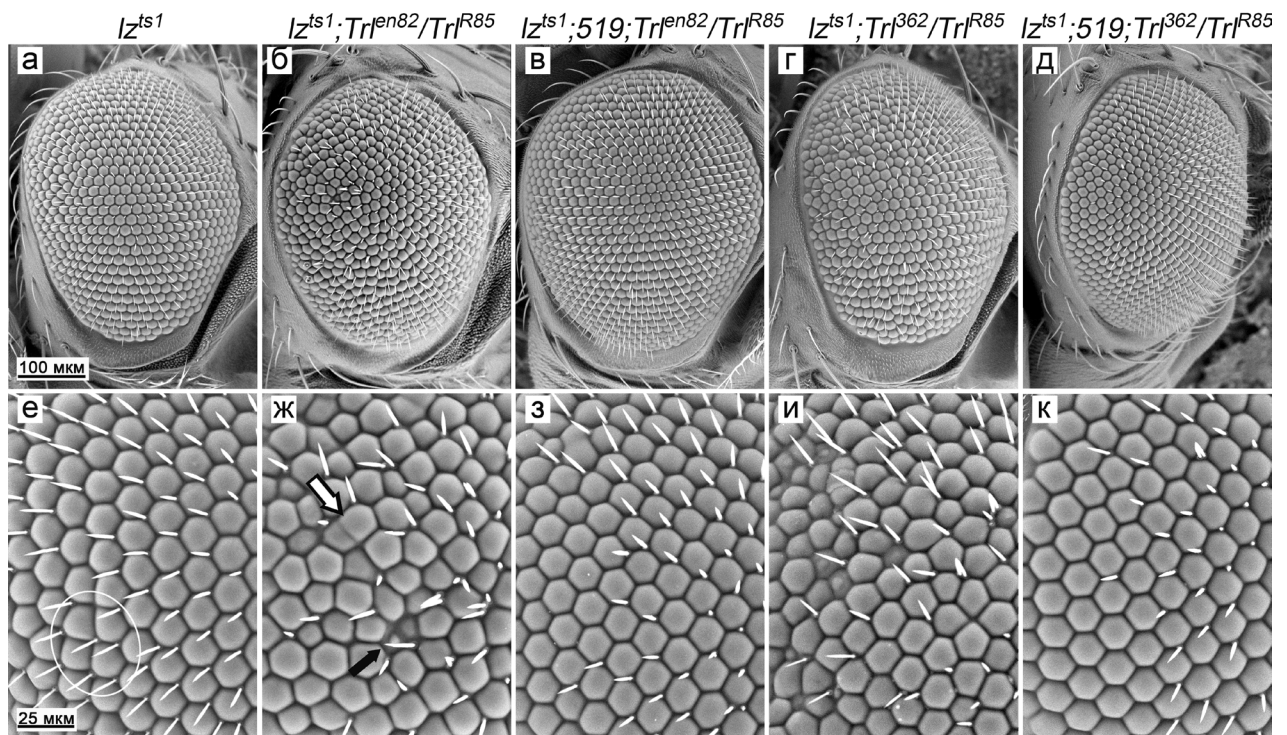


Рис. 68. Усиление проявления мутации lz^{ts1} на фоне мутаций по гену Trl . Глаза самцов мутантов: (а, е) lz^{ts1}/Y ; (б, ж) $lz^{ts1}/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}$; (г, и) $lz^{ts1}/Y; Trl^{362}/Trl^{R85}$. (а, е) На заднем краю глаз мутантов встречаются линзы имеющие необычную форму или измененную длину сторон, а также отличное от нормы расположение щетинок (пример отмечен овалом). (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) Спасение 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).

Табл. 14. Нарушение числа и локализации щетинок вокруг омматидиев мутантов lz^{ts1} и мутантов $lz^{ts1}; Trl^{362}/Trl^{R85}$ и $lz^{ts1}; Trl^{en82}/Trl^{R85}$.

Тип нарушения	Встречаемость нарушений у мух следующих генотипов, (%)		
	$lz^{ts1}/Y; Trl^{362}/Trl^{R85}$	$lz^{ts1}/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}$	lz^{ts1}/Y
Отсутствие щетинки в должной позиции	38,0±1,8***	42,3±1,5***	24,5±1,0
Изменена локализация щетинки	14,0±1,3***	17,1±1,1***	6,6±0,6
Просмотрено позиций локализации щетинок:			
	742	1108	1803

Примечание. Показана достоверность различий между частотами нарушений у двойных мутантов $lz^{ts1}/Y; Trl^{362}/Trl^{R85}$, $lz^{ts1}/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}$ и одиночных lz^{ts1}/Y (***) — $P < 0,001$). Частоты отсутствия щетинки в определенной позиции и изменения позиции щетинки у мутантов Trl^{362}/Trl^{R85} соответственно равны, 26,0±1 % и 4,2±0,5 %, а у мутантов Trl^{en82}/Trl^{R85} эти значения составляют соответственно 26,0±1 % и 3,4 ±0,4 %. Таким образом, у одиночных мутантов все эти частоты достоверно меньше чем частоты нарушений у двойных мутантов ($P < 0,001$).

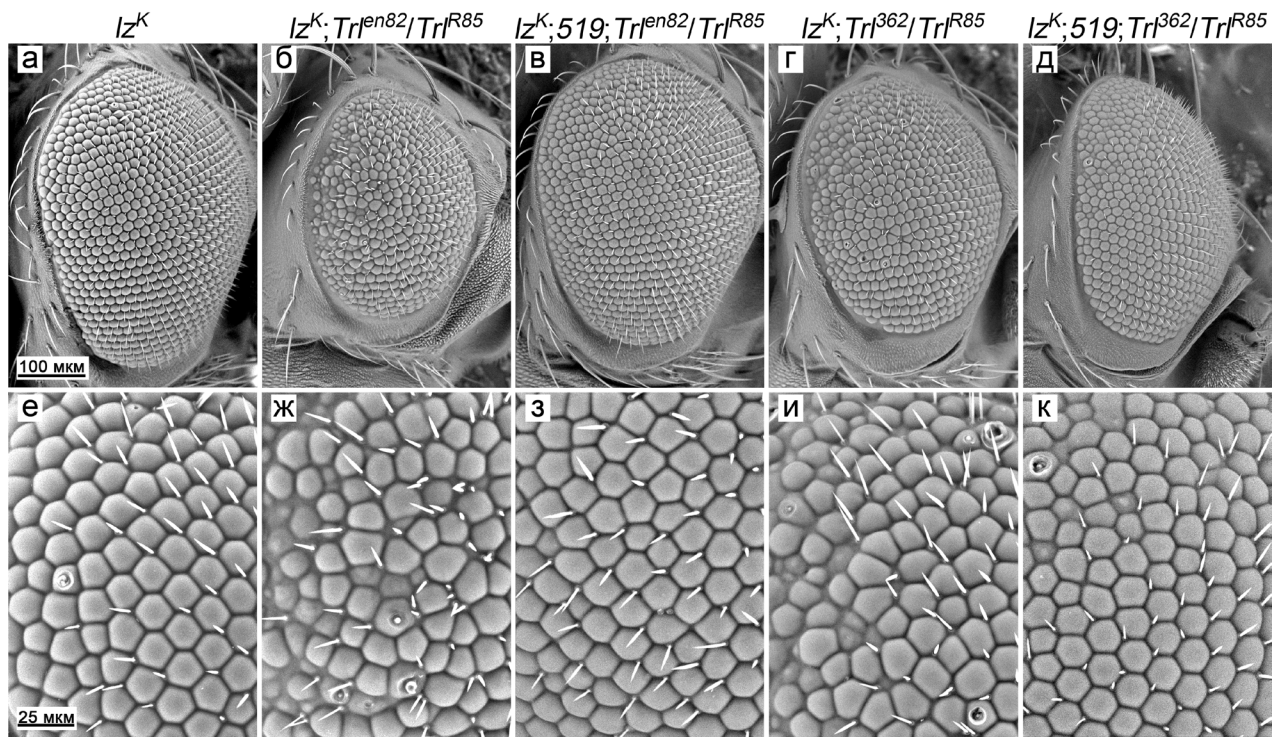


Рис. 69. Усиление проявления мутации lz^K на фоне мутаций по гену Trl . Глаза самцов: (а, е) lz^K/Y ; (б, ж) $lz^K/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}$; (в, з) $lz^K/Y; 519; Trl^{en82}/Trl^{R85}$; (г, и) $lz^K/Y; Trl^{362}/Trl^{R85}$. Введение в геном мутантов трансгенных конструкций $hsp83:GAGA-519$, обеспечивающих наработку изоформы GAGA-519 в значительной степени восстанавливает нормальную поверхность их глаз. Масштаб: 100 мкм (а – д), 25 мкм (е – к).

имеют отличную от нормы форму и размер. Некоторые линзы содержат кратеры, отмечено также изменение распределения щетинок вокруг омматидиев (рис. 69; Batterham *et al.*, 1996). У мутантов $lz^K; Trl^{362}/Trl^{R85}$ и $lz^K; Trl^{en82}/Trl^{R85}$ наблюдается явное увеличение частоты данных нарушений. Глаза таких двойных мутантов значительно меньше по размеру, чем в норме или у самцов мутантов lz^K и Trl . Площадь глаз самцов lz^K/Y примерно на 8 % меньше нормы, а у мутантов $lz^K/Y; Trl^{362}/Trl^{R85}$ и $lz^K/Y; Trl^{en82}/Trl^{R85}$ она примерно в половину меньше нормы.

Для подтверждения того, что именно недостаток белка GAGA приводит к такому сильному нарушению структуры глаз мутантов $lz^{ts1}; Trl^{362}/Trl^{R85}$, $lz^K; Trl^{362}/Trl^{R85}$, $lz^{ts1}; Trl^{en82}/Trl^{R85}$ и $lz^K; Trl^{en82}/Trl^{R85}$ были проведены эксперименты по спасению фенотипа данных мутантов. В геном двойных мутантов был введен трансген $hsp83:GAGA-519$, обеспечивающий наработку изоформы GAGA-519. Это в значительной степени способствовало восстановлению поверхности глаза (рис. 68, рис. 69).

Для более детального исследования структуры глаз при взаимодействии генов Trl и lz был проведен анализ срезов глаз имаго и глазо-антеннальных имагинальных

дисков 42-часовых куколок мутантов lz^{ts1} ; Trl^{362}/Trl^{R85} и lz^{ts1} ; Trl^{en82}/Trl^{R85} . Следует отметить, что до недавнего времени описания внутренней структуры глаза мутантов lz^{ts1} не было. И только в результате проведенного нами анализа было выявлено, что у этих мутантов, выращенных при 25 °C, в 0,8 % омматидиев присутствует неполный набор внешних фотонейронов, а в 0,1 % омматидиев присутствует дополнительный фотонейрон R7. В некоторых случаях в омматидиях наблюдалось отсутствие рабдомера фотонейрона R7 на нескольких срезах глаза, однако чаще рабдомер R7 все же появлялся на других срезах. Вероятно, у этих мутантов наблюдается прерывистость рабдомера R7 или его укорочение вследствие чего увеличивается расстояние между рабдомерами фотонейронов R7 и R8. Кроме этого нами было установлено, что 9 % омматидиев мутантов lz^{ts1} характеризуются отличной от нормы ориентацией. Вероятно, отсутствие данных о наличии вышеперечисленных дефектов можно объяснить тем, что детальный анализ срезов глаз слабых гипоморфных мутантов по гену lz ранее не проводился, а на срезах глаз сильных мутантов данное нарушение маскируется другими более явными дефектами.

У мутантов lz^{ts1} ; Trl^{362}/Trl^{R85} и lz^{ts1} ; Trl^{en82}/Trl^{R85} частота описанных выше нарушений намного выше, чем у мутантов, несущих мутацию только по одному из генов (табл. 15). Наиболее часто у двойных мутантов наблюдается изменение

Табл. 15. Нарушения числа и расположения фотонейронов в омматидиях мутантов lz^{ts1} и мутантов lz^{ts1} ; Trl^{362}/Trl^{R85} и lz^{ts1} ; Trl^{en82}/Trl^{R85} .

Тип нарушения	Встречаемость нарушений у куколок следующих генотипов, (%)		
	lz^{ts1}/Y ; Trl^{362}/Trl^{R85}	lz^{ts1}/Y ; Trl^{en82}/Trl^{R85}	lz^{ts1}/Y ; $+/+$
Недостаток внешних фотонейронов (R1-R6)	5,0±0,9***	12,1±1,6***	0,8±0,3
Избыток внешних фотонейронов (R1-R6)	0,7±0,4	1,2±0,5	0±0,1
Дополнительный фотонейрон R7	1,1±0,4	3,3±0,9***	0,1±0,1
Отсутствие рабдомера R7 на нескольких срезах	3,9±0,8***	7,6±1,3***	0,4±0,2
Изменена ориентация омматидия	25,6±2,2***	35,7±3,0***	9,1±1,1
<u>Просмотрено омматидиев (глаз) у имаго на срезах:</u>			
	561 (5)	422 (6)	762 (4)

Примечание. Показана достоверность различий между частотами нарушений у двойных мутантов lz^{ts1}/Y ; Trl^{362}/Trl^{R85} , lz^{ts1}/Y ; Trl^{en82}/Trl^{R85} и у одиночных lz^{ts1}/Y (***) - $P < 0,001$.

ориентации омматидия. Данное нарушение встречалось с частотой 25,6 % у мутантов lz^{ts1} ; Trl^{362}/Trl^{R85} и 35,7 % у lz^{ts1} ; Trl^{en82}/Trl^{R85} . Следует напомнить, что этот дефект встречается у одиночных lz^{ts1} - и Trl -мутантов значительно реже.

В омматидиях мутантов lz^{ts1} ; Trl^{362}/Trl^{R85} и lz^{ts1} ; Trl^{en82}/Trl^{R85} с частотой 5,7 и 13,3 %, соответственно встречалось отличное от нормы количество внешних фотонейронов. Встречаемость дополнительного фотонейрона R7 у двойных мутантов увеличивается до 1,1 % у lz^{ts1} ; Trl^{362}/Trl^{R85} и 3,3 % у lz^{ts1} ; Trl^{en82}/Trl^{R85} . Отсутствие рабдомера R7 на нескольких срезах наблюдалось в 3,9 % омматидиев у мутантов lz^{ts1} ; Trl^{362}/Trl^{R85} и в 7,6 % омматидиев у lz^{ts1} ; Trl^{en82}/Trl^{R85} .

Для мутантов lz^{ts1} ; Trl^{362}/Trl^{R85} и lz^{ts1} ; Trl^{en82}/Trl^{R85} встречаемость структурных нарушений омматидия, таких как изменение его ориентации, недостаток внешних фотонейронов, изменение непрерывности или длины рабдомера фотонейрона R7 достоверно выше ($P < 0,001$), чем у lz^{ts1} - и Trl -мутантов. Увеличение частоты омматидиев с дополнительным фотонейроном R7 у двойных мутантов относительно таковой для мутантов по одному из генов, также является достоверным ($P < 0,001$). Все эти данные свидетельствуют о том, что гены lz и Trl взаимодействуют.

3.6.5. Генетическое взаимодействие генов *Trl* и *BarH1*

Нами было установлено, что не только проявление lz мутаций, но и мутации *Bar^l* (B^l) усиливается на фоне мутаций Trl^{362}/Trl^{R85} и Trl^{en82}/Trl^{R85} (рис. 70). Мутация B^l представляет собой дупликацию гена *BarH1*, что приводит к увеличению экспрессии гена *Bar* (Kojima *et al.*, 1991). У гомозиготных самок или гемизиготных по мутации B^l самцов формируется узкий глаз. У самок $B^l/+$ формируется несколько больший по размеру глаз, чем у самок B^l/B^l , содержащий выемку на переднем краю. Известно, что такой фенотип обусловлен остановкой продвижения морфогенетической бороздки и блокированием дифференцировки клеток в глазных дисках личинок третьего возраста (Kojima *et al.*, 1991). Нами установлено, что размер глаза самок $B^l/+$; Trl^{en82}/Trl^{R85} и $B^l/+$; Trl^{362}/Trl^{R85} значительно меньше, чем у самок $B^l/+$; $+/+$ и несколько меньше глаз самок гомозиготных по мутации B^l . Глаза самок генотипа $B^l/+$; Trl^{en82}/Trl^{R85} и $B^l/+$; Trl^{362}/Trl^{R85} содержат в среднем по 80 омматидиев, тогда как глаза самок B^l/B^l содержат около 90 омматидиев, а самок $B^l/+$ — около 350 омматидиев.

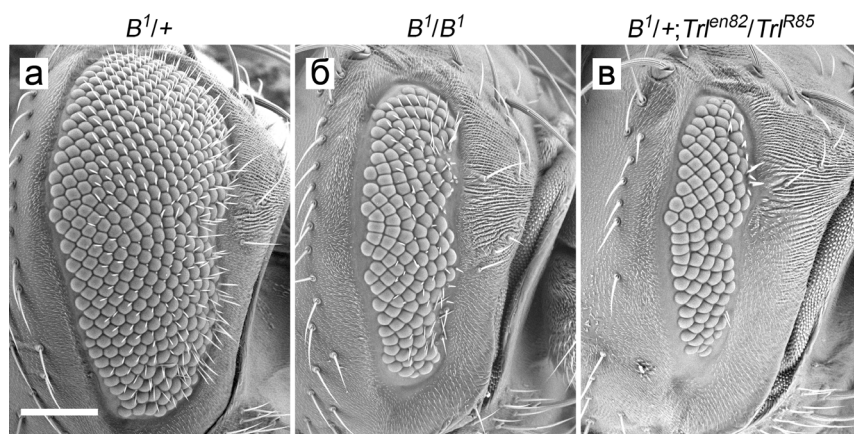


Рис. 70. Усиление проявления мутации гена *BarH1* (B^1) на фоне мутаций по гену *Trl*. (а) Глаз самки $B^1/+$. В среднем глаз самки $B^1/+$ содержит 350 омматидиев, что примерно в половину меньше, чем в норме. На переднем краю глаза видна выемка. (б) Глаз самки B^1/B^1 . Глаз самки B^1/B^1 в среднем содержит 90 омматидиев. (в) Глаз самки $B^1/+; Trl^{en82}/Trl^{R85}$. Глаз состоит из 76 омматидиев. По размеру и форме он схож с глазом гомозигот B^1/B^1 . Отличительной особенностью глаза мутантов $B^1/+; Trl^{en82}/Trl^{R85}$ является полное отсутствие большинства щетинок, в норме располагающихся вокруг омматидидиев. Масштаб: 100 мкм.

Кроме того, у двойных мутантов почти полностью отсутствуют щетинки, в норме располагающиеся вокруг омматидиев, что отличает их не только от глаз мух дикого типа, но и от глаз мутантов по генам *Bar* и *Trl*.

Таким образом, полученные нами результаты дают основание предполагать возможность того, что белок GAGA участвует в регуляции экспрессии генов *lz* и *BarH1*. Поскольку дефекты структуры глаз мутантов $B^1/+$, вызванные сверхэкспрессией гена *BarH1*, усиливаются на фоне мутаций по гену *Trl*, характеризующихся снижением количества белка GAGA, можно предположить, что в норме данный белок выступает в роли репрессора активности этого гена. В случае гена *lz*, белок GAGA, вероятно, выступает в качестве активатора транскрипции. В 5'-областях генов *lz* и *BarH1* нами были выявлены потенциальные сайты связывания белка GAGA, что может свидетельствовать в пользу того, что уровень экспрессии этих генов напрямую регулируется данным белком.

3.6.6. Анализ экспрессии генов *lz* и *Bar* у мутантов Trl^{362}/Trl^{R85} и Trl^{en82}/Trl^{R85}

Для анализа экспрессии гена *lz* в глазо-антеннальных имажинальных дисках *Trl*-мутантов нами были использованы разные методы, включая Нозерн-блот-гибридизацию, ОТ-ПЦР и Вестерн-блот-анализ. Чувствительности первых двух

методов, к сожалению, оказалось недостаточно для выявления продуктов гена *lz*. Это, вероятно, связано с тем, что транскрипция гена *lz* очень слаба, а успешная детекция белковых продуктов гена *lz* связана с наработкой и накоплением в клетках глазных дисков значительно большего количества данного белка, по сравнению с исходным количеством транскриптов. Это связано, прежде всего с тем, что одна молекула мРНК может служить матрицей для многих белковых молекул (Alberts *et al.*, 2002). Было показано, что белки в среднем в 900 раз обильнее представлены, чем их матричные РНК (Schwanhausser *et al.*, 2011). Возможно также, что скорость деградации транскриптов гена *lz* гораздо выше, чем деградация Lz-белков, что позволяет им накапливаться в клетках в значительных количествах.

Методом Вестерн-блот-анализа удалось сравнить количества белка Lz в имажинальных дисках белых предкуколок дикого типа и мутантов по гену *Trl*. Было установлено, что у мутантов *Trl^{en82}/Trl^{R85}* и *Trl³⁶²/Trl^{R85}* относительное количество белка Lz снижено соответственно до уровня 50 и 80 % от нормы (рис. 71). Из рисунка видно, что белок Lz в клетках глазо-антеннальных имажинальных дисков представлен в виде двух основных изоформ, молекулярный вес которых составляет 75 и 82 кДа. Эти значения близки к предсказанному молекулярному весу двух известных изоформ белка Lz — 73,2 и 84,7 кДа.

Таким образом, как следует из полученных нами результатов, количество белка Lz у мутантов по гену *Trl* снижено и это, вероятно, объясняет природу многих дефектов, наблюдаемых в глазах *Trl*-мутантов, поскольку многие из них выявляются и у *lz*-мутантов или у мутантов по его генам-мишеням. К дефектам, которые могут быть объяснены нарушением экспрессии гена *lz* относятся:

- 1) **Уменьшение количества конусных клеток или ненормально ориентированных контактов между этими клетками**, характерное для *Trl*-мутантов, может быть связано с неправильной экспрессией гена *lz* и, как следствие этого, с нарушением экспрессии гена-мишени белка Lz — гена *spr*. У мутантов по этому гену в некоторых омматидиях наблюдается недостаток конусных клеток, а также нарушения организации кластеров конусных клеток, что проявляется в изменении формы конусных клеток и формировании нетипичных или неправильно ориентированных контактов между этими клетками (Fu & Noll, 1997; Flores *et al.*, 2000).

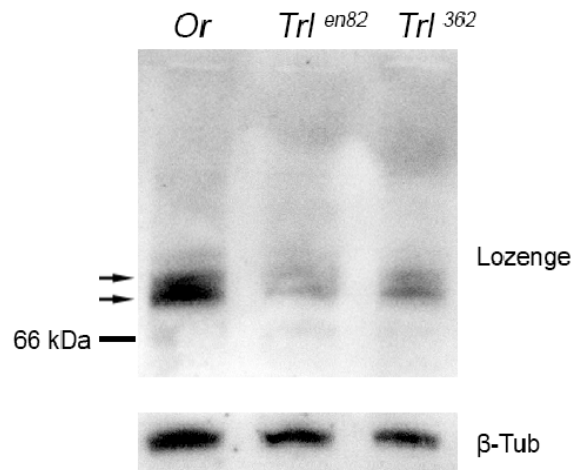


Рис. 71. Результаты иммуно-блот-гибридизации с моноклональными антителами против белка Lz демонстрируют снижение количества белка Lz у *Trl*-мутантов. На дорожки блота нанесены экстракты из глазо-антеннальных имагинальных дисков предкуколок дрозофилы генотипов *OregonR*, *Trl^{en82} / Trl^{R85}* и *Trl³⁶² / 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.

- 2) **Уменьшение количества внешних фотонейронов**, найденное у *Trl*-мутантов, может также быть связано с неправильной экспрессией гена *spa*. Одной из причин уменьшения числа внешних фотонейронов является их деградация, вызванная нарушением числа конусных и пигментных клеток формирующих физический каркас, обеспечивающий их поддержку. В пользу этого предположения свидетельствует то, что у мутантов по гену *spa*, который экспрессируется в конусных и первичных пигментных клетках, наблюдается недостаток фотонейронов (Daga *et al.*, 1996; Fu & Noll, 1997; Freeman, 2006).
- 3) **Укорочение рабдомера фотонейрона R7 или его прерывистость**, наблюдаемые у *Trl*-мутантов, было отмечено нами также у мутантов мутантов *lz^{ts1}*. Доля омматидиев с прерывистым рабдомером фотонейрона R7 у дигетерозигот *lz^{ts1}; Trl^{en82} / Trl^{R85}* и *lz^{ts1}; Trl³⁶² / Trl^{R85}* достоверно выше, чем у мутантов по одному из генов. Это позволяет предполагать, что причиной данного нарушения у *Trl*-мутантов является недостаток белка Lz.
- 4) **Наличие дополнительных вторичных и третичных пигментных клеток вокруг омматидиев** у *Trl*-мутантов, вероятно, также объясняется неправильной экспрессией у них гена *lz*. Дос-Сантос и соавторы показали,

что причиной увеличения количества пигментных клеток в глазо-антеннальных имагинальных дисках мутантов *Trl^{l3C}/Trl^{l3C}* является уменьшение случаев апоптоза, посредством которого в норме удаляется избыток предшественников вторичных и третичных ПГК на стадии 25–35 часов после окукливания (Dos-Santos *et al.*, 2008). В этих клетках белок GAGA, по-видимому, обеспечивает либо подавление сигнала к выживанию, либо стимуляцию сигнала к апоптозу, предназначенных для предшественников вторичных и третичных пигментных клеток, располагающихся в определенных позициях. Известно, что белок Lz участвует в подавлении сигнала к выживанию, посредством блокировки передачи сигнала через DER/Ras1-каскад, в некоторых предшественниках вторичных и третичных пигментных клеток. Возможно, у куколок *Trl*-мутантов на стадии 25–35 часов после окукливания в конусных клетках и/или в предшественниках вторичных и третичных пигментных клеток присутствует меньше белка Lz, чем в норме, поэтому подавление сигнала к выживанию ослабевает, и развиваются дополнительные вторичные и третичные клетки вокруг омматидиев.

- 5) **Изменение ориентации трапецевидной структуры из рабдомеров фотонейронов**, характерное для *Trl*-мутантов, сходно с нарушением ориентации омматидиев, продемонстрированным нами при анализе срезов глаз мутантов *lz^{ts1}*. У мутантов *lz^{ts1}; Trl³⁶²/Trl^{R85}* и *lz^{ts1}; Trl^{en82}/Trl^{R85}* доля омматидиев с отличной от нормы ориентацией достоверно выше, чем у мутантов по одному из генов. Это свидетельствует в пользу того, что данное нарушение у *Trl*-мутантов может быть обусловлено недостатком белка Lz.
- 6) **Нарушение распределения щетинок вокруг омматидиев** *Trl*-мутантов также сходно с нарушением распределения щетинок у мутантов *lz^{ts1}*. Это также свидетельствует в пользу того, что этот дефект может быть обусловлен неправильной экспрессией у *Trl*-мутантов гена *lz*.

Поскольку мы выявили генетическое взаимодействие между генами *Trl* и *Bar*, и в регуляторных областях генов, входящих в комплекс *Bar* были обнаружены сайты связывания GAGA, можно предположить, что гены комплекса *Bar* регулируются ТФ GAGA. Для проверки этого предположения мы исследовали экспрессию генов из комплекса *Bar* у *Trl*-мутантов. Для анализа экспрессии гена *Bar* в глазо-антеннальных имагинальных дисках *Trl*-мутантов нами был использован метод Вестерн-блот гибридизации (рис. 72). Для этого блоты с

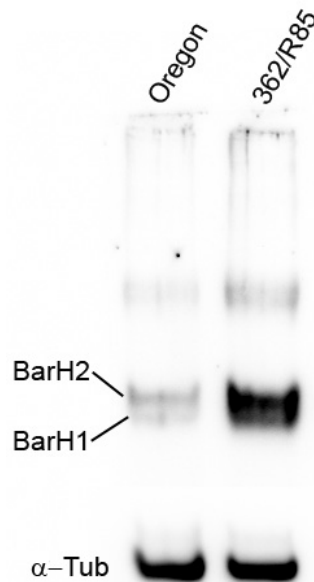


Рис. 72. Результаты иммуно-блот гибридизации с антителами против белков Bar демонстрируют увеличение количества белков комплекса *Bar* у *Trl*-мутантов. На дорожки блота нанесены экстракты из глазо-антеннальных имагинальных дисков предкуколок дрозофилы генотипов *OregonR* и *Trl*³⁶²/*Trl*^{R85}. Во всех образцах выявляется две полосы (отмечены стрелками), 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.

нанесенными белками, выделенными из дисков мух дикого типа и мутантов, были гибридизованы с антителами к белкам Bar. В результате нами было установлено, что экспрессия генов, входящих в комплекс Bar, усиливается в несколько раз на фоне снижения белка GAGA. Эти данные хорошо согласуются с данными, полученными при анализе генетического взаимодействия генов *Trl* и *Bar*. Поскольку проявления мутации *Bar^l* усиливается на фоне мутаций по гену *Trl*, можно полагать, что снижение количества GAGA приводит к увеличению экспрессии генов *Bar*.

Нарушение четкости рядов из омматидиев у *Trl*-мутантов может быть связано с нарушением экспрессии у них генов, входящих в комплекс *Bar*. У мутантов на поверхности глаза наблюдаются выпадения одного или нескольких омматидиев из регулярного ряда или же наоборот вклинивание между рядами одного или нескольких омматидиев. Данные дефекты, по-видимому, связаны с нарушением продвижения морфогенетической бороздки и нарушением процесса «спейсирования» омматидиев в пределах морфогенетической бороздки. Известно, что для правильного продвижения морфогенетической бороздки необходим

белок Bar. В пользу того, что белок GAGA совместно с белком Bar участвует в продвижении морфогенетической бороздки, свидетельствует усиление дефекта у дигетерозигот по генам *Trl* и *Bar*.

Заключение

Проведенный нами анализ влияния белка GAGA на формирование глаза дрозофилы выявил у проанализированных *Trl*-мутантов *Trl*³⁶²/*Trl*^{R85} и *Trl*^{en82}/*Trl*^{R85} целый спектр нарушений в этом процессе, не отмеченных в ранее проведенных исследованиях. Ранее было выявлено что у *Trl*-мутантов наблюдаются: 1) изменение количества и размера первичных пигментных клеток; 2) увеличение количества пигментных клеток, располагающихся вокруг омматидиев; 3) отсутствие некоторых щетинок; 4) огрубление поверхности глаза (Farkas *et al.*, 1994; Dos-Santos *et al.*, 2008). Нами впервые было продемонстрировано наличие у *Trl*-мутантов следующих нарушений: 1) изменение количества фотонейронов; 2) изменение количества конусных клеток; 3) изменение ориентации отдельных омматидиев; 4) изменение организации рядов из омматидиев.

Мы полагаем, что нам удалось выявить большее количество нарушений в глазах *Trl*-мутантов, поскольку мы использовали новые, полученные нами мутации, более подходящие для анализа глаза. Следует отметить, что ранее для анализа структуры глаза у *Trl*-мутантов использовались мутанты *Trl*^{l3C} или клоны нуль-аллелей. Однако авторы не представляли данные о том, насколько снижена экспрессия в развивающемся глазу мутантов *Trl*^{l3C}. Они также не продемонстрировали полного отсутствия белка GAGA в клонах *Trl*^{81.1}/*Trl*^{81.1}. Не исключено, что в этих клетках наблюдается все же некоторое количество белка GAGA. Возможно также, что при исследовании мутантов *Trl*^{l3C}/*Trl*^{l3C}, выборка срезов глаз и глазо-антеннальных дисков была недостаточной для выявления дефектов в количестве фотонейронов и конусных клеток, которые, как следует из наших результатов, встречаются достаточно редко, только примерно в 2–4 % всех омматидиев.

В нашей работе впервые осуществлен поиск генов-мишеней ТФ GAGA, ответственных за наблюдаемые дефекты в развитии глаз *Trl*-мутантов. Мы полагаем, что нарушения структуры глаз *Trl*-мутантов могут быть связаны с изменением экспрессии генов *lz* и *Bar* на фоне снижения количества белка GAGA. Ген *lz*, играющий важную роль в процессе формирования глаза, демонстрирует генетическое взаимодействие с геном *Trl*. Кроме того, в данной

работе 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. В пользу того, что экспрессия гена *lz* может напрямую регулироваться ТФ GAGA, свидетельствует наличие GA-богатого района в 5'-области гена *lz*, с которым по нашим данным *in vitro* связывается рекомбинантный белок GAGA. Следует отметить, что по результатам ChIP-on-chip экспериментов было установлено, что белок GAGA связывается с промоторным районом гена *lz* (Schuettengruber *et al.*, 2009). Этот район включает в себя последовательность, использованную нами в эксперименте по задержке ДНК-зонда в геле. И наконец, нами установлена общность спектра нарушений в структуре глаз *Trl*-мутантов с дефектами в глазах *lz*-мутантов. В регуляторных районах генов из комплекса *Bar* также найдены сайты связывания GAGA. Гены *Trl* и *Bar* взаимодействуют генетически и, наконец, экспрессия гена *Bar* усиливается на фоне уменьшения экспрессии гена *Trl*. Усиление проявления фенотипа мутантов *B^l/+*, связанного с увеличением экспрессии гена *BarH1* (Kojima *et al.*, 1991), на фоне *Trl*-мутаций, приводящих к снижению уровня транскрипции данного гена, говорит о том, что в норме белок GAGA обеспечивает репрессию генов *Bar*. О том, что белок GAGA может участвовать в подавлении активности генов, свидетельствуют авторегуляция экспрессии гена *Trl* по принципу обратной связи (Kosoy *et al.*, 2002), а также присутствие GAGA в белковых комплексах, обеспечивающих репрессию генов (Horard *et al.*, 2000; Czermin *et al.*, 2001; Poux *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 ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Зарайский А. Г., Лукьянов С. А., Ламан А. Г. Изучение пространственно-временного распределения мРНК α -субъединицы Na^+ - K^+ -АТФазы в раннем развитии шпорцевой лягушки методом гибридизации *in situ* // Онтогенез. – 1989. – Т. 20. – С. 128-133.
- Карагодин Д. А., Баттулина Н. В., Меркулова Т. И., Баричева Э. М. Анализ причин нарушения экспрессии гена *Trithorax-like* *Drosophila melanogaster* у мутантов *Trl*³⁶⁰⁹ // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 471, № 6. – С. 732-735.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. – 2008а. – Т. 39, № 2. – С. 134-142.
- 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. – 2008б. – Т. 12, № 3. – С. 399-405.
- Омелина Е. С. Идентификация генов-мишеней транскрипционного фактора GAGA, участвующих в формировании дорзальных выростов хориона яйца *Drosophila melanogaster*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск. 2013. – 16 с.
- 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.

- Омелина Е. С., Коханенко А. А. Поиск новых генов-мишеней транскрипционного фактора GAGA в ходе оогенеза *Drosophila melanogaster* // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2014. № 1. – С. 132-153.
- 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.
- 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.
- Перелыгина 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.
- Перелыгина 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Adam J. C., Montell D. J. A role for extra macrochaetae downstream of Notch in follicle cell differentiation // Development. – 2004. – Vol. 131, № 23. – P. 5971-80. (doi: 10.1242/dev.01442)
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. From RNA to Protein // Molecular Biology of the Cell. – New York: Garland Science, 2002.
- Arnold C. D., Gerlach D., Stelzer C., Boryn L. M., Rath M., Stark A. Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq // Science. – 2013. – Vol. 339, № 6123. – P. 1074-7. (doi: 10.1126/science.1232542)

- Arora K., Levine M. S., O'Connor M. B. The screw gene encodes a ubiquitously expressed member of the TGF-beta family required for specification of dorsal cell fates in the *Drosophila* embryo // *Genes Dev.* – 1994. – Vol. 8, № 21. – P. 2588-601.
- Artavanis-Tsakonas S., Matsuno K., Fortini M. E. Notch signaling // *Science.* – 1995. – Vol. 268, № 5208. – P. 225-32.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M. D., Lake R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development // *Science.* – 1999. – Vol. 284, № 5415. – P. 770-6.
- Artavanis-Tsakonas S., Simpson P. Choosing a cell fate: a view from the Notch locus // *Trends Genet.* – 1991. – Vol. 7, № 11-12. – P. 403-8.
- Baehrecke E. H. Autophagic programmed cell death in *Drosophila* // *Cell Death Differ.* – 2003. – Vol. 10, № 9. – P. 940-5. (doi: 10.1038/sj.cdd.4401280)
- Bai J., Uehara Y., Montell D. J. Regulation of invasive cell behavior by taiman, a *Drosophila* protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer // *Cell.* – 2000. – Vol. 103, № 7. – P. 1047-58.
- Baker N. E. Notch signaling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle // *Bioessays.* – 2000. – Vol. 22, № 3. – P. 264-73. (doi: 10.1002/(sici)1521-1878(200003)22:3<264::aid-bies8>3.0.co;2-m)
- 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.
- Batterham P., Crew J. R., Sokac A. M., Andrews J. R., Pasquini G. M., Davies A. G., Stocker R. F., Pollock J. A. Genetic analysis of the lozenge gene complex in *Drosophila melanogaster*: adult visual system phenotypes // *J Neurogenet.* – 1996. – Vol. 10, № 4. – P. 193-220.
- Behan K. J., Nichols C. D., Cheung T. L., Farlow A., Hogan B. M., Batterham P., Pollock J. A. Yan regulates Lozenge during *Drosophila* eye development // *Dev Genes Evol.* – 2002. – Vol. 212, № 6. – P. 267-76. (doi: 10.1007/s00427-002-0241-4)
- Bejarano F., Busturia A. Function of the Trithorax-like gene during *Drosophila* development // *Dev Biol.* – 2004. – Vol. 268, № 2. – P. 327-41. (doi: 10.1016/j.ydbio.2004.01.006)
- Belozerov V. E., Majumder P., Shen P., Cai H. N. A novel boundary element may facilitate independent gene regulation in the Antennapedia complex of *Drosophila* // *EMBO J.* – 2003. – Vol. 22, № 12. – P. 3113-21. (doi: 10.1093/emboj/cdg297)
- Bender W., Spierer P., Hogness D. S. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the Ace and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster* // *J Mol Biol.* – 1983. – Vol. 168, № 1. – P. 17-33.

- Benyajati C., Mueller L., Xu N., Pappano M., Gao J., Mosammaparast M., Conklin D., Granok H., Craig C., Elgin S. Multiple isoforms of GAGA factor, a critical component of chromatin structure // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – Vol. 25, № 16. – P. 3345-53.
- Berg C. A. The *Drosophila* shell game: patterning genes and morphological change // *Trends Genet.* – 2005. – Vol. 21, № 6. – P. 346-55. (doi: 10.1016/j.tig.2005.04.010)
- Berg C. A. Tube formation in *Drosophila* egg chambers // *Tissue Eng Part A.* – 2008. – Vol. 14, № 9. – P. 1479-88. (doi: 10.1089/ten.tea.2008.0124)
- Bernues J., Pineyro D., Kosoy A. General, negative feedback mechanism for regulation of Trithorax-like gene expression in vivo: new roles for GAGA factor in flies // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35, № 21. – P. 7150-9. (doi: 10.1093/nar/gkm590)
- Bevilacqua A., Fiorenza M. T., Mangia F. A developmentally regulated GAGA box-binding factor and Spl are required for transcription of the hsp70.1 gene at the onset of mouse zygotic genome activation // *Development.* – 2000. – Vol. 127, № 7. – P. 1541-51.
- Bhat K. M., Farkas G., Karch F., Gyurkovics H., Gausz J., Schedl P. The GAGA factor is required in the early *Drosophila* embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division // *Development.* – 1996. – Vol. 122, № 4. – P. 1113-24.
- Biggin M. D., Tjian R. Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts // *Cell.* – 1988. – Vol. 53, № 5. – P. 699-711.
- Bonaccorsi S., Giansanti M. G., Gatti M. Spindle assembly in *Drosophila* neuroblasts and ganglion mother cells // *Nat Cell Biol.* – 2000. – Vol. 2, № 1. – P. 54-6. (doi: 10.1038/71378)
- Bonet C., Fernandez I., Aran X., Bernues J., Giralt E., Azorin F. The GAGA protein of *Drosophila* is phosphorylated by CK2 // *J Mol Biol.* – 2005. – Vol. 351, № 3. – P. 562-72. (doi: 10.1016/j.jmb.2005.06.039)
- Boyle M. J., Berg C. A. Control in time and space: Tramtrack69 cooperates with Notch and Ecdysone to repress ectopic fate and shape changes during *Drosophila* egg chamber maturation // *Development.* – 2009. – Vol. 136, № 24. – P. 4187-97. (doi: 10.1242/dev.042770)
- Braun R. E., Behringer R. R., Peschon J. J., Brinster R. L., Palmiter R. D. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid // *Nature.* – 1989. – Vol. 337, № 6205. – P. 373-6. (doi: 10.1038/337373a0)
- Brock H. W., Fisher C. L. Maintenance of gene expression patterns // *Dev Dyn.* – 2005. – Vol. 232, № 3. – P. 633-55. (doi: 10.1002/dvdy.20298)
- Broihier H. T., Moore L. A., Van Doren M., Newman S., Lehmann R. zfh-1 is required for germ cell migration and gonadal mesoderm development in *Drosophila* // *Development.* – 1998. – Vol. 125, № 4. – P. 655-66.

- Bruhat A., Tourmente S., Chapel S., Sobrier M. L., Couderc J. L., Dastugue B. Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional regulation of the beta 3 tubulin gene by 20-hydroxyecdysone in *Drosophila* Kc cells // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – Vol. 18, № 10. – P. 2861-7.
- Brummel T. J., Twombly V., Marques G., Wrana J. L., Newfeld S. J., Attisano L., Massague J., O'Connor M. B., Gelbart W. M. Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in *Drosophila* // *Cell.* – 1994. – Vol. 78, № 2. – P. 251-61.
- Burnett W. V. Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation // *Biotechniques.* – 1997. – Vol. 22, № 4. – P. 668-71.
- Busturia A., Lloyd A., Bejarano F., Zavortink M., Xin H., Sakonju S. The MCP silencer of the *Drosophila* Abd-B gene requires both Pleiohomeotic and GAGA factor for the maintenance of repression // *Development.* – 2001. – Vol. 128, № 11. – P. 2163-73.
- Cagan R. L., Ready D. F. The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina // *Dev Biol.* – 1989. – Vol. 136, № 2. – P. 346-62.
- Calvi B. R., Lilly M. A., Spradling A. C. Cell cycle control of chorion gene amplification // *Genes Dev.* – 1998. – Vol. 12, № 5. – P. 734-44.
- Canon J., Banerjee U. In vivo analysis of a developmental circuit for direct transcriptional activation and repression in the same cell by a Runx protein // *Genes Dev.* – 2003. – Vol. 17, № 7. – P. 838-43. (doi: 10.1101/gad.1064803)
- Casci T., Vinos J., Freeman M. Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling // *Cell.* – 1999. – Vol. 96, № 5. – P. 655-65.
- Cavaliere V., Donati A., Hsouna A., Hsu T., Gargiulo G. dAkt kinase controls follicle cell size during *Drosophila* oogenesis // *Dev Dyn.* – 2005. – Vol. 232, № 3. – P. 845-54. (doi: 10.1002/dvdy.20333)
- Cavalli G., Paro R. Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation // *Curr Opin Cell Biol.* – 1998. – Vol. 10, № 3. – P. 354-60.
- Cavalli G., Paro R. The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis // *Cell.* – 1998. – Vol. 93, № 4. – P. 505-18.
- Chang Y. Y., Neufeld T. P. Autophagy takes flight in *Drosophila* // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584, № 7. – P. 1342-9. (doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.006)
- Chopra V. S., Srinivasan A., Kumar R. P., Mishra K., Basquin D., Docquier M., Seum C., Pauli D., Mishra R. K. Transcriptional activation by GAGA factor is through its direct interaction with dmTAF3 // *Dev Biol.* – 2008. – Vol. 317, № 2. – P. 660-70. (doi: 10.1016/j.ydbio.2008.02.008)

- Chung Y. T., Keller E. B. Regulatory elements mediating transcription from the *Drosophila melanogaster* actin 5C proximal promoter // *Mol Cell Biol.* – 1990. – Vol. 10, № 1. – P. 206-16.
- Cobrerros L., Fernandez-Minan A., Luque C. M., Gonzalez-Reyes A., Martin-Bermudo M. D. A role for the chaperone Hsp70 in the regulation of border cell migration in the *Drosophila* ovary // *Mech Dev.* – 2008. – Vol. 125, № 11-12. – P. 1048-58. (doi: 10.1016/j.mod.2008.07.006)
- Coffman C. R. Cell migration and programmed cell death of *Drosophila* germ cells // *Ann N Y Acad Sci.* – 2003. – Vol. 995. – P. 117-26.
- Cooley L., Verheyen E., Ayers K. chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis // *Cell.* – 1992. – Vol. 69, № 1. – P. 173-84.
- Costlow N., Lis J. T. High-resolution mapping of DNase I-hypersensitive sites of *Drosophila* heat shock genes in *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol Cell Biol.* – 1984. – Vol. 4, № 9. – P. 1853-63.
- Cox R. T., Spradling A. C. A Balbiani body and the fusome mediate mitochondrial inheritance during *Drosophila* oogenesis // *Development.* – 2003. – Vol. 130, № 8. – P. 1579-90.
- Cummings M. R., King R. C. The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. General staging characteristics // *Journal of Morphology.* – 1969. – Vol. 128, № 4. – P. 427-441. (doi: 10.1002/jmor.1051280404)
- Czermin B., Schotta G., Hulsmann B. B., Brehm A., Becker P. B., Reuter G., Imhof A. Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila* // *EMBO Rep.* – 2001. – Vol. 2, № 10. – P. 915-9. (doi: 10.1093/embo-reports/kve210)
- Daga A., Karlovich C. A., Dumstrei K., Banerjee U. Patterning of cells in the *Drosophila* eye by Lozenge, which shares homologous domains with AML1 // *Genes Dev.* – 1996. – Vol. 10, № 10. – P. 1194-205.
- Deal R. B., Henikoff J. G., Henikoff S. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones // *Science.* – 2010. – Vol. 328, № 5982. – P. 1161-4. (doi: 10.1126/science.1186777)
- Deng W., Lin H. Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila* // *Dev Biol.* – 1997. – Vol. 189, № 1. – P. 79-94. (doi: 10.1006/dbio.1997.8669)
- Derynck R. TGF-beta-receptor-mediated signaling // *Trends Biochem Sci.* – 1994. – Vol. 19, № 12. – P. 548-53.

- de Cuevas M., Lilly M. A., Spradling A. C. Germline cyst formation in *Drosophila* // *Annu Rev Genet.* – 1997. – Vol. 31. – P. 405-28. (doi: 10.1146/annurev.genet.31.1.405)
- de Wit E., Braunschweig U., Greil F., Bussemaker H. J., van Steensel B. Global chromatin domain organization of the *Drosophila* genome // *PLoS Genet.* – 2008. – Vol. 4, № 3. – P. e1000045. (doi: 10.1371/journal.pgen.1000045)
- Dobens L., Jaeger A., Peterson J. S., Raftery L. A. Bunched sets a boundary for Notch signaling to pattern anterior eggshell structures during *Drosophila* oogenesis // *Dev Biol.* – 2005. – Vol. 287, № 2. – P. 425-37. (doi: 10.1016/j.ydbio.2005.09.019)
- Dobens L. L., Peterson J. S., Treisman J., Raftery L. A. *Drosophila* bunched integrates opposing DPP and EGF signals to set the operculum boundary // *Development.* – 2000. – Vol. 127, № 4. – P. 745-54.
- Dobens L. L., Raftery L. A. *Drosophila* oogenesis: a model system to understand TGF-beta/Dpp directed cell morphogenesis // *Ann N Y Acad Sci.* – 1998. – Vol. 857. – P. 245-7.
- Dobens L. L., Raftery L. A. Integration of epithelial patterning and morphogenesis in *Drosophila* ovarian follicle cells // *Dev Dyn.* – 2000. – Vol. 218, № 1. – P. 80-93. (doi: 10.1002/(sici)1097-0177(200005)218:1<80::aid-dvdy7>3.0.co;2-8)
- Doctor J. S., Jackson P. D., Rashka K. E., Visalli M., Hoffmann F. M. Sequence, biochemical characterization, and developmental expression of a new member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila melanogaster* // *Dev Biol.* – 1992. – Vol. 151, № 2. – P. 491-505.
- Dokucu M. E., Zipursky S. L., Cagan R. L. Atonal, rough and the resolution of proneural clusters in the developing *Drosophila* retina // *Development.* – 1996. – Vol. 122, № 12. – P. 4139-47.
- Domingos P. M., Mlodzik M., Mendes C. S., Brown S., Steller H., Mollereau B. Spalt transcription factors are required for R3/R4 specification and establishment of planar cell polarity in the *Drosophila* eye // *Development.* – 2004. – Vol. 131, № 22. – P. 5695-702. (doi: 10.1242/dev.01443)
- Dominguez M. Dual role for Hedgehog in the regulation of the proneural gene atonal during ommatidia development // *Development.* – 1999. – Vol. 126, № 11. – P. 2345-53.
- Dominguez M., Wasserman J. D., Freeman M. Multiple functions of the EGF receptor in *Drosophila* eye development // *Curr Biol.* – 1998. – Vol. 8, № 19. – P. 1039-48.
- Dorman J. B., James K. E., Fraser S. E., Kiehart D. P., Berg C. A. bullwinkle is required for epithelial morphogenesis during *Drosophila* oogenesis // *Dev Biol.* – 2004. – Vol. 267, № 2. – P. 320-41. (doi: 10.1016/j.ydbio.2003.10.020)
- Dorn R., Szidonya J., Korge G., Sehnert M., Taubert H., Archoukieh E., Tschiersch B., Morawietz H., Wustmann G., Hoffmann G., et al. P transposon-induced dominant

- enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* // Genetics. – 1993. – Vol. 133, № 2. – P. 279-90.
- 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. (doi: 10.1002/dvg.22789)
- Dos-Santos N., Rubin T., Chalvet F., Gandille P., Cremazy F., Leroy J., Boissonneau E., Theodore L. *Drosophila* retinal pigment cell death is regulated in a position-dependent manner by a cell memory gene // Int J Dev Biol. – 2008. – Vol. 52, № 1. – P. 21-31. (doi: 10.1387/ijdb.072406nd)
- Duchek P., Rorth P. Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis // Science. – 2001. – Vol. 291, № 5501. – P. 131-3. (doi: 10.1126/science.291.5501.131)
- Espinas M. L., Jimenez-Garcia E., Vaquero A., Canudas S., Bernues J., Azorin F. The N-terminal POZ domain of GAGA mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity // J Biol Chem. – 1999. – Vol. 274, № 23. – P. 16461-9.
- Espinas M. L., Canudas S., Fanti L., Pimpinelli S., Casanova J., Azorin F. The GAGA factor of *Drosophila* interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide // EMBO Rep. – 2000. – Vol. 1, № 3. – P. 253-9. (doi: 10.1093/embo-reports/kvd046)
- Farkas G., Gausz J., Galloni M., Reuter G., Gyurkovics H., Karch F. The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor // Nature. – 1994. – Vol. 371, № 6500. – P. 806-8. (doi: 10.1038/371806a0)
- Farkas G., Leibovitch B. A., Elgin S. C. Chromatin organization and transcriptional control of gene expression in *Drosophila* // Gene. – 2000. – Vol. 253, № 2. – P. 117-36.
- Faucheux M., Roignant J. Y., Netter S., Charollais J., Antoniewski C., Theodore L. batman Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor // Mol Cell Biol. – 2003. – Vol. 23, № 4. – P. 1181-95.
- Fedorova L., Fedorov A. Introns in gene evolution // Genetica. – 2003. – Vol. 118, № 2-3. – P. 123-31.
- Fischer F., Hamann A., Osiewacz H. D. Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways // Trends Biochem Sci. – 2012. – Vol. 37, № 7. – P. 284-92. (doi: 10.1016/j.tibs.2012.02.004)
- Flores G. V., Daga A., Kalhor H. R., Banerjee U. Lozenge is expressed in pluripotent precursor cells and patterns multiple cell types in the *Drosophila* eye through the control of cell-specific transcription factors // Development. – 1998. – Vol. 125, № 18. – P. 3681-7.

- Flores G. V., Duan H., Yan H., Nagaraj R., Fu W., Zou Y., Noll M., Banerjee U. Combinatorial signaling in the specification of unique cell fates // *Cell*. – 2000. – Vol. 103, № 1. – P. 75-85.
- Freeman M. Misexpression of the *Drosophila argos* gene, a secreted regulator of cell determination // *Development*. – 1994a. – Vol. 120, № 8. – P. 2297-304.
- Freeman M. The *spitz* gene is required for photoreceptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor // *Mech Dev*. – 1994b. – Vol. 48, № 1. – P. 25-33.
- Freeman M. Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye // *Cell*. – 1996. – Vol. 87, № 4. – P. 651-60.
- Freeman M. Cell determination strategies in the *Drosophila* eye // *Development*. – 1997. – Vol. 124, № 2. – P. 261-70.
- Freeman M. R. Sculpting the nervous system: glial control of neuronal development // *Curr Opin Neurobiol*. – 2006. – Vol. 16, № 1. – P. 119-25. (doi: 10.1016/j.conb.2005.12.004)
- Freeman M., Klamt C., Goodman C. S., Rubin G. M. The *argos* gene encodes a diffusible factor that regulates cell fate decisions in the *Drosophila* eye // *Cell*. – 1992. – Vol. 69, № 6. – P. 963-75.
- French R. L., Cosand K. A., Berg C. A. The *Drosophila* female sterile mutation twin peaks is a novel allele of *tramtrack* and reveals a requirement for Ttk69 in epithelial morphogenesis // *Dev Biol*. – 2003. – Vol. 253, № 1. – P. 18-35.
- Fuda N. J., Lis J. T. A new player in Pol II pausing // *EMBO J*. – 2013. – Vol. 32, № 13. – P. 1796-8. (doi: 10.1038/emboj.2013.138)
- Fuller M. T. Spermatogenesis // *The development of Drosophila melanogaster* / Bate M., Martinez Arias A. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. – P. 71-147.
- Fu W., Noll M. The Pax2 homolog *sparkling* is required for development of cone and pigment cells in the *Drosophila* eye // *Genes Dev*. – 1997. – Vol. 11, № 16. – P. 2066-78.
- Georgel P. T. Chromatin potentiation of the *hsp70* promoter is linked to GAGA-factor recruitment // *Biochem Cell Biol*. – 2005. – Vol. 83, № 4. – P. 555-65. (doi: 10.1139/o05-060)
- Gerasimova T. I., Corces V. G. Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator // *Cell*. – 1998. – Vol. 92, № 4. – P. 511-21.
- Geyer P. K., Corces V. G. Separate regulatory elements are responsible for the complex pattern of tissue-specific and developmental transcription of the *yellow* locus in *Drosophila melanogaster* // *Genes Dev*. – 1987. – Vol. 1, № 9. – P. 996-1004.

- Gildea J. J., Lopez R., Shearn A. A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2 // *Genetics*. – 2000. – Vol. 156, № 2. – P. 645-63.
- Gilmour D. S., Thomas G. H., Elgin S. C. *Drosophila* nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters // *Science*. – 1989. – Vol. 245, № 4925. – P. 1487-90.
- Glaser R. L., Thomas G. H., Siegfried E., Elgin S. C., Lis J. T. Optimal heat-induced expression of the *Drosophila* hsp26 gene requires a promoter sequence containing (CT)_n(GA)_n repeats // *J Mol Biol*. – 1990. – Vol. 211, № 4. – P. 751-61. (doi: 10.1016/0022-2836(90)90075-w)
- Glick D., Barth S., Macleod K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms // *J Pathol*. – 2010. – Vol. 221, № 1. – P. 3-12. (doi: 10.1002/path.2697)
- Grammont M., Irvine K. D. Organizer activity of the polar cells during *Drosophila* oogenesis // *Development*. – 2002. – Vol. 129, № 22. – P. 5131-40.
- Granok H., Leibovitch B. A., Shaffer C. D., Elgin S. C. Chromatin. Ga-ga over GAGA factor // *Curr Biol*. – 1995. – Vol. 5, № 3. – P. 238-41.
- Greenberg A. J., Yanowitz J. L., Schedl P. The *Drosophila* GAGA factor is required for dosage compensation in males and for the formation of the male-specific-lethal complex chromatin entry site at 12DE // *Genetics*. – 2004. – Vol. 166, № 1. – P. 279-89.
- Greenberg A. J., Schedl P. GAGA factor isoforms have distinct but overlapping functions in vivo // *Mol Cell Biol*. – 2001. – Vol. 21, № 24. – P. 8565-74. (doi: 10.1128/mcb.21.24.8565-8574.2001)
- Green P., Hartenstein A. Y., Hartenstein V. The embryonic development of the *Drosophila* visual system // *Cell Tissue Res*. – 1993. – Vol. 273, № 3. – P. 583-98.
- Guild G. M., Connelly P. S., Shaw M. K., Tilney L. G. Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping // *J Cell Biol*. – 1997. – Vol. 138, № 4. – P. 783-97.
- Gumucio D. L., Shelton D. A., Bailey W. J., Slightom J. L., Goodman M. Phylogenetic footprinting reveals unexpected complexity in trans factor binding upstream from the epsilon-globin gene // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1993. – Vol. 90, № 13. – P. 6018-22.
- Gupta B. P., Rodrigues V. Distinct mechanisms of action of the Lozenge locus in *Drosophila* eye and antennal development are suggested by the analysis of dominant enhancers // *J Neurogenet*. – 1995. – Vol. 10, № 3. – P. 137-51.
- Gutzeit H. O. The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in *Drosophila* follicles // *J Cell Sci*. – 1986. – Vol. 80. – P. 159-69.

- Hackney J. F., Pucci C., Naes E., Dobens L. Ras signaling modulates activity of the ecdysone receptor EcR during cell migration in the *Drosophila* ovary // *Dev Dyn.* – 2007. – Vol. 236, № 5. – P. 1213-26. (doi: 10.1002/dvdy.21140)
- Haerry T. E., Gehring W. J. A conserved cluster of homeodomain binding sites in the mouse *Hoxa-4* intron functions in *Drosophila* embryos as an enhancer that is directly regulated by *Ultrabithorax* // *Dev Biol.* – 1997. – Vol. 186, № 1. – P. 1-15. (doi: 10.1006/dbio.1997.8582)
- Hagstrom K., Muller M., Schedl P. A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the *Fab-7* boundary in the *Drosophila* bithorax complex // *Genetics.* – 1997. – Vol. 146, № 4. – P. 1365-80.
- Hanafusa H., Torii S., Yasunaga T., Nishida E. *Sproutyl* and *Sprouty2* provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway // *Nat Cell Biol.* – 2002. – Vol. 4, № 11. – P. 850-8. (doi: 10.1038/ncb867)
- Hardison R. C., Taylor J. Genomic approaches towards finding cis-regulatory modules in animals // *Nat Rev Genet.* – 2012. – Vol. 13, № 7. – P. 469-83. (doi: 10.1038/nrg3242)
- Harrison D. A., McCoon P. E., Binari R., Gilman M., Perrimon N. *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway // *Genes Dev.* – 1998. – Vol. 12, № 20. – P. 3252-63.
- Hartl D. L., Lozovskaya E. R. Genome evolution: between the nucleosome and the chromosome // *EXS.* – 1994. – Vol. 69. – P. 579-92.
- Hayashi T., Kojima T., Saigo K. Specification of primary pigment cell and outer photoreceptor fates by *BarH1* homeobox gene in the developing *Drosophila* eye // *Dev Biol.* – 1998. – Vol. 200, № 2. – P. 131-45. (doi: 10.1006/dbio.1998.8959)
- Hayashi T., Saigo K. Diversification of cell types in the *Drosophila* eye by differential expression of prepatter genes // *Mech Dev.* – 2001. – Vol. 108, № 1-2. – P. 13-27.
- Haynie J. L., Bryant P. J. Development of the eye-antenna imaginal disc and morphogenesis of the adult head in *Drosophila melanogaster* // *J Exp Zool.* – 1986. – Vol. 237, № 3. – P. 293-308. (doi: 10.1002/jez.1402370302)
- Heberlein U., Mlodzik M., Rubin G. M. Cell-fate determination in the developing *Drosophila* eye: role of the rough gene // *Development.* – 1991. – Vol. 112, № 3. – P. 703-12.
- Heberlein U., Hariharan I. K., Rubin G. M. Star is required for neuronal differentiation in the *Drosophila* retina and displays dosage-sensitive interactions with *Ras1* // *Dev Biol.* – 1993. – Vol. 160, № 1. – P. 51-63. (doi: 10.1006/dbio.1993.1285)
- Heberlein U., Borod E. R., Chanut F. A. Dorsoventral patterning in the *Drosophila* retina by *wingless* // *Development.* – 1998. – Vol. 125, № 4. – P. 567-77.

- Hendrix D. A., Hong J. W., Zeitlinger J., Rokhsar D. S., Levine M. S. Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the *Drosophila* embryo // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2008. – Vol. 105, № 22. – P. 7762-7. (doi: 10.1073/pnas.0802406105)
- Higashijima S., Kojima T., Michiue T., Ishimaru S., Emori Y., Saigo K. Dual Bar homeobox genes of *Drosophila* required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development // *Genes Dev*. – 1992. – Vol. 6, № 1. – P. 50-60.
- Hodgson J. W., Argiropoulos B., Brock H. W. Site-specific recognition of a 70-base-pair element containing d(GA)(n) repeats mediates bithoraxoid polycomb group response element-dependent silencing // *Mol Cell Biol*. – 2001. – Vol. 21, № 14. – P. 4528-43. (doi: 10.1128/mcb.21.14.4528-4543.2001)
- Horard B., Tatout C., Poux S., Pirrotta V. Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor // *Mol Cell Biol*. – 2000. – Vol. 20, № 9. – P. 3187-97.
- Horne-Badovinac S., Bilder D. Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber // *Dev Dyn*. – 2005. – Vol. 232, № 3. – P. 559-74. (doi: 10.1002/dvdy.20286)
- Hsu T., Bagni C., Sutherland J. D., Kafatos F. C. The transcriptional factor CF2 is a mediator of EGF-R-activated dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis // *Genes Dev*. – 1996. – Vol. 10, № 11. – P. 1411-21.
- Inoue H., Imamura T., Ishidou Y., Takase M., Udagawa Y., Oka Y., Tsuneizumi K., Tabata T., Miyazono K., Kawabata M. Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp // *Mol Biol Cell*. – 1998. – Vol. 9, № 8. – P. 2145-56.
- Iwanami M., Hiromi Y., Okabe M. Cell-type specific utilization of multiple negative feedback loops generates developmental constancy // *Genes Cells*. – 2005. – Vol. 10, № 7. – P. 743-52. (doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00871.x)
- Jang A. C., Starz-Gaiano M., Montell D. J. Modeling migration and metastasis in *Drosophila* // *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. – 2007. – Vol. 12, № 2-3. – P. 103-14. (doi: 10.1007/s10911-007-9042-8)
- Jarman A. P., Sun Y., Jan L. Y., Jan Y. N. Role of the proneural gene, atonal, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors // *Development*. – 1995. – Vol. 121, № 7. – P. 2019-30.
- Jin M. H., Sawamoto K., Ito M., Okano H. The interaction between the *Drosophila* secreted protein argos and the epidermal growth factor receptor inhibits dimerization of the receptor and binding of secreted spitz to the receptor // *Mol Cell Biol*. – 2000. – Vol. 20, № 6. – P. 2098-107.

- Kaminker J. S., Singh R., Lebestky T., Yan H., Banerjee U. Redundant function of Runt Domain binding partners, Big brother and Brother, during *Drosophila* development // *Development*. – 2001. – Vol. 128, № 14. – P. 2639-48.
- 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. 178-84. (doi: 10.1016/j.gene.2013.02.012)
- Kauffmann R. C., Li S., Gallagher P. A., Zhang J., Carthew R. W. Ras1 signaling and transcriptional competence in the R7 cell of *Drosophila* // *Genes Dev*. – 1996. – Vol. 10, № 17. – P. 2167-78.
- Kelekar A. Autophagy // *Ann N Y Acad Sci*. – 2005. – Vol. 1066. – P. 259-71. (doi: 10.1196/annals.1363.015)
- Kelley R. L., Meller V. H., Gordadze P. R., Roman G., Davis R. L., Kuroda M. I. Epigenetic spreading of the *Drosophila* dosage compensation complex from roX RNA genes into flanking chromatin // *Cell*. – 1999. – Vol. 98, № 4. – P. 513-22.
- Keplinger B. L., Guo X., Quine J., Feng Y., Cavener D. R. Complex organization of promoter and enhancer elements regulate the tissue- and developmental stage-specific expression of the *Drosophila melanogaster* *Gld* gene // *Genetics*. – 2001. – Vol. 157, № 2. – P. 699-716.
- Kerrigan L. A., Croston G. E., Lira L. M., Kadonaga J. T. Sequence-specific transcriptional antirepression of the *Drosophila* *Kruppel* gene by the GAGA factor // *J Biol Chem*. – 1991. – Vol. 266, № 1. – P. 574-82.
- Kim M. H., Shin J. S., Park S., Hur M. W., Lee M. O., Park H., Lee C. S. Retinoic acid response element in *HOXA-7* regulatory region affects the rate, not the formation of anterior boundary expression // *Int J Dev Biol*. – 2002. – Vol. 46, № 3. – P. 325-8.
- Kim S. W., Ho S. C., Hong S. J., Kim K. M., So E. C., Christoffolete M., Harney J. W. A novel mechanism of thyroid hormone-dependent negative regulation by thyroid hormone receptor, nuclear receptor corepressor (NCoR), and GAGA-binding factor on the rat *cD44* promoter // *J Biol Chem*. – 2005. – Vol. 280, № 15. – P. 14545-55. (doi: 10.1074/jbc.M411517200)
- Kim J., He X., Sinha S. Evolution of regulatory sequences in 12 *Drosophila* species // *PLoS Genet*. – 2009. – Vol. 5, № 1. – P. e1000330. (doi: 10.1371/journal.pgen.1000330)
- Kimmel B. E., Heberlein U., Rubin G. M. The homeo domain protein rough is expressed in a subset of cells in the developing *Drosophila* eye where it can specify photoreceptor cell subtype // *Genes Dev*. – 1990. – Vol. 4, № 5. – P. 712-27.
- King R. C. *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*. / King R. C. – New York: Academic Press, 1970. – 227 p.

- Klein D. E., Nappi V. M., Reeves G. T., Shvartsman S. Y., Lemmon M. A. Argos inhibits epidermal growth factor receptor signalling by ligand sequestration // *Nature*. – 2004. – Vol. 430, № 7003. – P. 1040-4. (doi: 10.1038/nature02840)
- Kojima T., Ishimaru S., Higashijima S., Takayama E., Akimaru H., Sone M., Emori Y., Saigo K. Identification of a different-type homeobox gene, BarH1, possibly causing Bar (B) and Om(1D) mutations in *Drosophila* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1991. – Vol. 88, № 10. – P. 4343-7.
- Kosoy A., Pagans S., Espinas M. L., Azorin F., Bernues J. GAGA factor down-regulates its own promoter // *J Biol Chem*. – 2002. – Vol. 277, № 44. – P. 42280-8. (doi: 10.1074/jbc.M207505200)
- Kramer S., Okabe M., Hacohen N., Krasnow M. A., Hiromi Y. Sprouty: a common antagonist of FGF and EGF signaling pathways in *Drosophila* // *Development*. – 1999. – Vol. 126, № 11. – P. 2515-25.
- Kramarov A. A., Mikhaleva E. A., Rozovsky Ya M., Pochechueva T. V., Baikova N. A., Arsenjeva E. L., Gvozdev V. A. Insect mucin-type glycoprotein: immunodetection of the O-glycosylated epitope in *Drosophila melanogaster* cells and tissues // *Insect Biochem Mol Biol*. – 1997. – Vol. 27, № 6. – P. 513-21.
- Kumar J. P. The molecular circuitry governing retinal determination // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – Vol. 1789, № 4. – P. 306-14. (doi: 10.1016/j.bbagr.2008.10.001)
- Kumar S. Remote homologue identification of *Drosophila* GAGA factor in mouse // *Bioinformation*. – 2011. – Vol. 7, № 1. – P. 29-32.
- Kunwar P. S., Starz-Gaiano M., Bainton R. J., Heberlein U., Lehmann R. Trel, a G protein-coupled receptor, directs transepithelial migration of *Drosophila* germ cells // *PLoS Biol*. – 2003. – Vol. 1, № 3. – P. E80. (doi: 10.1371/journal.pbio.0000080)
- Kurilo L. F. Oogenesis in antenatal development in man // *Hum Genet*. – 1981. – Vol. 57, № 1. – P. 86-92.
- Kvon E. Z., Stampfel G., Yanez-Cuna J. O., Dickson B. J., Stark A. HOT regions function as patterned developmental enhancers and have a distinct cis-regulatory signature // *Genes Dev*. – 2012. – Vol. 26, № 9. – P. 908-13. (doi: 10.1101/gad.188052.112)
- Lai Z. C., Harrison S. D., Karim F., Li Y., Rubin G. M. Loss of tramtrack gene activity results in ectopic R7 cell formation, even in a sina mutant background // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – Vol. 93, № 10. – P. 5025-30.
- Lee H., Kraus K. W., Wolfner M. F., Lis J. T. DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of hsp70 // *Genes Dev*. – 1992. – Vol. 6, № 2. – P. 284-95.
- Lee C., Li X., Hechmer A., Eisen M., Biggin M. D., Venters B. J., Jiang C., Li J., Pugh B. F., Gilmour D. S. NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing

- at many genes in *Drosophila* // *Mol Cell Biol.* – 2008. – Vol. 28, № 10. – P. 3290-300. (doi: 10.1128/mcb.02224-07)
- Lee J., Giordano S., Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling // *Biochem J.* – 2012. – Vol. 441, № 2. – P. 523-40. (doi: 10.1042/bj20111451)
- Lefevre G. A photographic representation and interpretation of the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* salivary glands // *The Genetics and Biology of Drosophila* / Ashburner M., Novitski E. – London: Academic Press, 1976. – P. 31-66.
- Lehmann M. Anything else but GAGA: a nonhistone protein complex reshapes chromatin structure // *Trends Genet.* – 2004. – Vol. 20, № 1. – P. 15-22. (doi: 10.1016/j.tig.2003.11.005)
- Lehmann M., Siegmund T., Lintermann K. G., Korge G. The pipsqueak protein of *Drosophila melanogaster* binds to GAGA sequences through a novel DNA-binding domain // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 43. – P. 28504-9.
- Leibovitch B. A., Lu Q., Benjamin L. R., Liu Y., Gilmour D. S., Elgin S. C. GAGA factor and the TFIID complex collaborate in generating an open chromatin structure at the *Drosophila melanogaster* hsp26 promoter // *Mol Cell Biol.* – 2002. – Vol. 22, № 17. – P. 6148-57.
- Letsou A., Arora K., Wrana J. L., Simin K., Twombly V., Jamal J., Staehling-Hampton K., Hoffmann F. M., Gelbart W. M., Massague J., et al. *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family // *Cell.* – 1995. – Vol. 80, № 6. – P. 899-908.
- Lieber T., Kidd S., Young M. W. kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch // *Genes Dev.* – 2002. – Vol. 16, № 2. – P. 209-21. (doi: 10.1101/gad.942302)
- Li J., Liang V. C., Sedgwick T., Wong J., Shi Y. B. Unique organization and involvement of GAGA factors in transcriptional regulation of the *Xenopus* stromelysin-3 gene // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – Vol. 26, № 12. – P. 3018-25.
- Li J., Xia F., Li W. X. Coactivation of STAT and Ras is required for germ cell proliferation and invasive migration in *Drosophila* // *Dev Cell.* – 2003. – Vol. 5, № 5. – P. 787-98.
- Li J., Liu Y., Rhee H. S., Ghosh S. K., Bai L., Pugh B. F., Gilmour D. S. Kinetic competition between elongation rate and binding of NELF controls promoter-proximal pausing // *Mol Cell.* – 2013. – Vol. 50, № 5. – P. 711-22. (doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.016)
- Li J., Gilmour D. S. Distinct mechanisms of transcriptional pausing orchestrated by GAGA factor and MIBP, a novel transcription factor // *EMBO J.* – 2013. – Vol. 32, № 13. – P. 1829-41. (doi: 10.1038/emboj.2013.111)

- Lim J., Choi K. W. Bar homeodomain proteins are anti-proneural in the *Drosophila* eye: transcriptional repression of atonal by Bar prevents ectopic retinal neurogenesis // *Development*. – 2003. – Vol. 130, № 24. – P. 5965-74. (doi: 10.1242/dev.00818)
- Lim J., Choi K. W. Induction and autoregulation of the anti-proneural gene Bar during retinal neurogenesis in *Drosophila* // *Development*. – 2004. – Vol. 131, № 22. – P. 5573-80. (doi: 10.1242/dev.01426)
- Lim J., Jafar-Nejad H., Hsu Y. C., Choi K. W. Novel function of the class I bHLH protein Daughterless in the negative regulation of proneural gene expression in the *Drosophila* eye // *EMBO Rep*. – 2008. – Vol. 9, № 11. – P. 1128-33. (doi: 10.1038/embor.2008.166)
- Lindsley D. T., Tokuyasu K. T. *Spermatogenesis // The Genetics and Biology of Drosophila* / Ashburner M., Wright T. R. F. – London: Academic Press, 1980. – P. 225-294.
- Lin H., Yue L., Spradling A. C. The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation // *Development*. – 1994. – Vol. 120, № 4. – P. 947-56.
- Liu Q., Krzewska J., Liberek K., Craig E. A. Mitochondrial Hsp70 Ssc1: role in protein folding // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276, № 9. – P. 6112-8. (doi: 10.1074/jbc.M009519200)
- Lopez-Schier H., St Johnston D. Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during *Drosophila* oogenesis // *Genes Dev*. – 2001. – Vol. 15, № 11. – P. 1393-405. (doi: 10.1101/gad.200901)
- Lu Q., Wallrath L. L., Granok H., Elgin S. C. (CT)_n (GA)_n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila* hsp26 gene // *Mol Cell Biol*. – 1993. – Vol. 13, № 5. – P. 2802-14.
- Luo J., Zuo J., Wu J., Wan P., Kang D., Xiang C., Zhu H., Chen J. In vivo RNAi screen identifies candidate signaling genes required for collective cell migration in *Drosophila* ovary // *Sci China Life Sci*. – 2015. – Vol. 58, № 4. – P. 379-89. (doi: 10.1007/s11427-014-4786-z)
- Mahajan-Miklos S., Cooley L. The villin-like protein encoded by the *Drosophila* quail gene is required for actin bundle assembly during oogenesis // *Cell*. – 1994. – Vol. 78, № 2. – P. 291-301.
- Mahmoudi T., Katsani K. R., Verrijzer C. P. GAGA can mediate enhancer function in trans by linking two separate DNA molecules // *EMBO J*. – 2002. – Vol. 21, № 7. – P. 1775-81. (doi: 10.1093/emboj/21.7.1775)
- Mahowald A. P. Assembly of the *Drosophila* germ plasm // *Int Rev Cytol*. – 2001. – Vol. 203. – P. 187-213.
- Makunin I. V., Volkova E. I., Belyaeva E. S., Nabirochkina E. N., Pirrotta V., Zhimulev I. F. The *Drosophila* suppressor of underreplication protein binds to late-replicating regions of polytene chromosomes // *Genetics*. – 2002. – Vol. 160, № 3. – P. 1023-34.

- Margolis J., Spradling A. Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary // *Development*. – 1995. – Vol. 121, № 11. – P. 3797-807.
- Matharu N. K., Hussain T., Sankaranarayanan R., Mishra R. K. Vertebrate homologue of *Drosophila* GAGA factor // *J Mol Biol*. – 2010. – Vol. 400, № 3. – P. 434-47. (doi: 10.1016/j.jmb.2010.05.010)
- McPhee C. K., Baehrecke E. H. Autophagy in *Drosophila melanogaster* // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – Vol. 1793, № 9. – P. 1452-60. (doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.02.009)
- Meller V. H., Gordadze P. R., Park Y., Chu X., Stuckenholtz C., Kelley R. L., Kuroda M. I. Ordered assembly of roX RNAs into MSL complexes on the dosage-compensated X chromosome in *Drosophila* // *Curr Biol*. – 2000. – Vol. 10, № 3. – P. 136-43.
- Miller A. The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster* // *Biology of Drosophila* / Demerec M. – New York: Wiley, 1950. – P. 420-534.
- Min W., Woo H. J., Lee C. S., Lee K. K., Yoon W. K., Park H. W., Kim M. H. 307-bp fragment in HOXA7 upstream sequence is sufficient for anterior boundary formation // *DNA Cell Biol*. – 1998. – Vol. 17, № 3. – P. 293-9. (doi: 10.1089/dna.1998.17.293)
- Mirkovic I., Mlodzik M. Cooperative activities of *drosophila* DE-cadherin and DN-cadherin regulate the cell motility process of ommatidial rotation // *Development*. – 2006. – Vol. 133, № 17. – P. 3283-93. (doi: 10.1242/dev.02468)
- Mishra R. K., Mihaly J., Barges S., Spierer A., Karch F., Hagstrom K., Schweinsberg S. E., Schedl P. The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity // *Mol Cell Biol*. – 2001. – Vol. 21, № 4. – P. 1311-8. (doi: 10.1128/mcb.21.4.1311-1318.2001)
- Mizushima N. Autophagy: process and function // *Genes Dev*. – 2007. – Vol. 21, № 22. – P. 2861-73. (doi: 10.1101/gad.1599207)
- Mlodzik M., Hiromi Y., Weber U., Goodman C. S., Rubin G. M. The *Drosophila* seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates // *Cell*. – 1990. – Vol. 60, № 2. – P. 211-24.
- Montell D. J. Border-cell migration: the race is on // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2003. – Vol. 4, № 1. – P. 13-24. (doi: 10.1038/nrm1006)
- Montell D. J., Rorth P., Spradling A. C. slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP // *Cell*. – 1992. – Vol. 71, № 1. – P. 51-62.
- Montell D. J., Yoon W. H., Starz-Gaiano M. Group choreography: mechanisms orchestrating the collective movement of border cells // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2012. – Vol. 13, № 10. – P. 631-45. (doi: 10.1038/nrm3433)

- Moore L. A., Broihier H. T., Van Doren M., Lunsford L. B., Lehmann R. Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in *Drosophila* // *Development*. – 1998. – Vol. 125, № 4. – P. 667-78.
- Nagaraj R., Banerjee U. Combinatorial signaling in the specification of primary pigment cells in the *Drosophila* eye // *Development*. – 2007. – Vol. 134, № 5. – P. 825-31. (doi: 10.1242/dev.02788)
- Nakamura A., Shirae-Kurabayashi M., Hanyu-Nakamura K. Repression of early zygotic transcription in the germline // *Curr Opin Cell Biol*. – 2010. – Vol. 22, № 6. – P. 709-14. (doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.012)
- Nakayama T., Nishioka K., Dong Y. X., Shimojima T., Hirose S. *Drosophila* GAGA factor directs histone H3.3 replacement that prevents the heterochromatin spreading // *Genes Dev*. – 2007. – Vol. 21, № 5. – P. 552-61. (doi: 10.1101/gad.1503407)
- Negre N., Brown C. D., Ma L., Bristow C. A., Miller S. W., Wagner U., Kheradpour P., Eaton M. L., Loriaux P., Sealfon R., Li Z., Ishii H., Spokony R. F., Chen J., Hwang L., Cheng C., Auburn R. P., Davis M. B., Domanus M., Shah P. K., Morrison C. A., Zieba J., Suchy S., Senderowicz L., Victorsen A., Bild N. A., Grundstad A. J., Hanley D., MacAlpine D. M., Mannervik M., Venken K., Bellen H., White R., Gerstein M., Russell S., Grossman R. L., Ren B., Posakony J. W., Kellis M., White K. P. A cis-regulatory map of the *Drosophila* genome // *Nature*. – 2011. – Vol. 471, № 7339. – P. 527-31. (doi: 10.1038/nature09990)
- Nellen D., Affolter M., Basler K. Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of *Drosophila* body pattern by decapentaplegic // *Cell*. – 1994. – Vol. 78, № 2. – P. 225-37.
- Neufeld T. P., Baehrecke E. H. Eating on the fly: function and regulation of autophagy during cell growth, survival and death in *Drosophila* // *Autophagy*. – 2008. – Vol. 4, № 5. – P. 557-62.
- Neuman-Silberberg F. S., Schupbach T. The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein // *Cell*. – 1993. – Vol. 75, № 1. – P. 165-74.
- Neuman-Silberberg F. S., Schupbach T. The *Drosophila* TGF-alpha-like protein *Gurken*: expression and cellular localization during *Drosophila* oogenesis // *Mech Dev*. – 1996. – Vol. 59, № 2. – P. 105-13.
- O'Brien T., Wilkins R. C., Giardina C., Lis J. T. Distribution of GAGA protein on *Drosophila* genes in vivo // *Genes Dev*. – 1995. – Vol. 9, № 9. – P. 1098-110.

- O'Donnell K. H., Wensink P. C. GAGA factor and TBF1 bind DNA elements that direct ubiquitous transcription of the *Drosophila* alpha 1-tubulin gene // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22, № 22. – P. 4712-8.
- 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. (doi: 10.1002/cbin.10025)
- Ohtsuki S., Levine M. GAGA mediates the enhancer blocking activity of the *eve* promoter in the *Drosophila* embryo // *Genes Dev.* – 1998. – Vol. 12, № 21. – P. 3325-30.
- 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 // *Comput Biol Chem.* – 2011. – Vol. 35, № 6. – P. 363-70. (doi: 10.1016/j.compbiolchem.2011.10.008)
- Omichinski J. G., Pedone P. V., Felsenfeld G., Gronenborn A. M., Clore G. M. The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode // *Nat Struct Biol.* – 1997. – Vol. 4, № 2. – P. 122-32.
- Orphanides G., LeRoy G., Chang C. H., Luse D. S., Reinberg D. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes // *Cell.* – 1998. – Vol. 92, № 1. – P. 105-16.
- Oshchepkov D. Y., Vityaev E. E., Grigorovich D. A., Ignatieva E. V., Khlebodarova T. M. SITECON: a tool for detecting conservative conformational and physicochemical properties in transcription factor binding site alignments and for site recognition // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32, № Web Server issue. – P. W208-12. (doi: 10.1093/nar/gkh474)
- Padgett R. W., St Johnston R. D., Gelbart W. M. A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family // *Nature.* – 1987. – Vol. 325, № 6099. – P. 81-4. (doi: 10.1038/325081a0)
- Pagans S., Ortiz-Lombardia M., Espinas M. L., Bernues J., Azorin F. The *Drosophila* transcription factor tramtrack (TTK) interacts with Trithorax-like (GAGA) and represses GAGA-mediated activation // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30, № 20. – P. 4406-13.
- Pan D., Rubin G. M. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis // *Cell.* – 1997. – Vol. 90, № 2. – P. 271-80.
- Paro R., Strutt H., Cavalli G. Heritable chromatin states induced by the Polycomb and trithorax group genes // *Novartis Found Symp.* – 1998. – Vol. 214. – P. 51-61; discussion 61-6, 104-13.

- Paterson J., O'Hare K. Structure and transcription of the singed locus of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. – 1991. – Vol. 129, № 4. – P. 1073-84.
- Pedone P. V., Ghirlando R., Clore G. M., Gronenborn A. M., Felsenfeld G., Omichinski J. G. The single Cys2-His2 zinc finger domain of the GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high-affinity specific DNA binding // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – Vol. 93, № 7. – P. 2822-6.
- Pepling M. E., Spradling A. C. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts // *Development*. – 1998. – Vol. 125, № 17. – P. 3323-8.
- Pertceva J. A., Dorogova N. V., Bolobolova E. U., Nerusheva O. O., Fedorova S. A., Omelyanchuk L. V. The role of *Drosophila* hyperplastic discs gene in spermatogenesis // *Cell Biol Int*. – 2010. – Vol. 34, № 10. – P. 991-6. (doi: 10.1042/cbi20100105)
- Platero J. S., Csink A. K., Quintanilla A., Henikoff S. Changes in chromosomal localization of heterochromatin-binding proteins during the cell cycle in *Drosophila* // *J Cell Biol*. – 1998. – Vol. 140, № 6. – P. 1297-306.
- Poux S., Melfi R., Pirrotta V. Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC // *Genes Dev*. – 2001. – Vol. 15, № 19. – P. 2509-14. (doi: 10.1101/gad.208901)
- Poux S., Horard B., Sigrist C. J., Pirrotta V. The *Drosophila* trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing // *Development*. – 2002. – Vol. 129, № 10. – P. 2483-93.
- Preston C. R., Engels W. R. P-element-induced male recombination and gene conversion in *Drosophila* // *Genetics*. – 1996. – Vol. 144, № 4. – P. 1611-22.
- Preston C. R., Sved J. A., Engels W. R. Flanking duplications and deletions associated with P-induced male recombination in *Drosophila* // *Genetics*. – 1996. – Vol. 144, № 4. – P. 1623-38.
- Proutski V., Holmes E. C. Primer Master: a new program for the design and analysis of PCR primers // *Comput Appl Biosci*. – 1996. – Vol. 12, № 3. – P. 253-5.
- Raff J. W., Kellum R., Alberts B. The *Drosophila* GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle // *EMBO J*. – 1994. – Vol. 13, № 24. – P. 5977-83.
- Rawls A. S., Schultz S. A., Mitra R. D., Wolff T. Bedraggled, a putative transporter, influences the tissue polarity complex during the R3/R4 fate decision in the *Drosophila* eye // *Genetics*. – 2007. – Vol. 177, № 1. – P. 313-28. (doi: 10.1534/genetics.107.075945)
- Read D., Nishigaki T., Manley J. L. The *Drosophila* even-skipped promoter is transcribed in a stage-specific manner in vitro and contains multiple, overlapping factor-binding sites // *Mol Cell Biol*. – 1990. – Vol. 10, № 8. – P. 4334-44.

- Read D., Butte M. J., Dernburg A. F., Frasch M., Kornberg T. B. Functional studies of the BTB domain in the *Drosophila* GAGA and Mod(mdg4) proteins // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28, № 20. – P. 3864-70.
- Ready D. F., Hanson T. E., Benzer S. Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice // *Dev Biol.* – 1976. – Vol. 53, № 2. – P. 217-40.
- Reifegerste R., Moses K. Genetics of epithelial polarity and pattern in the *Drosophila* retina // *Bioessays.* – 1999. – Vol. 21, № 4. – P. 275-85. (doi: 10.1002/(sici)1521-1878(199904)21:4<275::aid-bies3>3.0.co;2-5)
- Richardson B. E., Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2010. – Vol. 11, № 1. – P. 37-49. (doi: 10.1038/nrm2815)
- Robertson H. M., Preston C. R., Phillis R. W., Johnson-Schlitz D. M., Benz W. K., Engels W. R. A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster* // *Genetics.* – 1988. – Vol. 118, № 3. – P. 461-70.
- Robinson D. N., Cooley L. Stable intercellular bridges in development: the cytoskeleton lining the tunnel // *Trends Cell Biol.* – 1996. – Vol. 6, № 12. – P. 474-9.
- Rogozin I. B., Carmel L., Csuros M., Koonin E. V. Origin and evolution of spliceosomal introns // *Biol Direct.* – 2012. – Vol. 7. – P. 11. (doi: 10.1186/1745-6150-7-11)
- Roignant J. Y., Treisman J. E. Pattern formation in the *Drosophila* eye disc // *Int J Dev Biol.* – 2009. – Vol. 53, № 5-6. – P. 795-804. (doi: 10.1387/ijdb.072483jr)
- Rorth P. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – Vol. 93, № 22. – P. 12418-22.
- Rose A. B. Intron-mediated regulation of gene expression // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2008. – Vol. 326. – P. 277-90.
- Ruberte E., Marty T., Nellen D., Affolter M., Basler K. An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signaling in vivo // *Cell.* – 1995. – Vol. 80, № 6. – P. 889-97.
- Russo C. A., Takezaki N., Nei M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species // *Mol Biol Evol.* – 1995. – Vol. 12, № 3. – P. 391-404.
- Saibil H. R. Chaperone machines in action // *Curr Opin Struct Biol.* – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 35-42. (doi: 10.1016/j.sbi.2007.11.006)
- Salvaing J., Lopez A., Boivin A., Deutsch J. S., Peronnet F. The *Drosophila* Corto protein interacts with Polycomb-group proteins and the GAGA factor // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31, № 11. – P. 2873-82.

- Santos A. C., Lehmann R. Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond // *Curr Biol.* – 2004. – Vol. 14, № 14. – P. R578-89. (doi: 10.1016/j.cub.2004.07.018)
- Saunders A., Werner J., Andrulis E. D., Nakayama T., Hirose S., Reinberg D., Lis J. T. Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo // *Science.* – 2003. – Vol. 301, № 5636. – P. 1094-6. (doi: 10.1126/science.1085712)
- Sawamoto K., Okano H., Kobayakawa Y., Hayashi S., Mikoshiba K., Tanimura T. The function of argos in regulating cell fate decisions during *Drosophila* eye and wing vein development // *Dev Biol.* – 1994. – Vol. 164, № 1. – P. 267-76. (doi: 10.1006/dbio.1994.1197)
- Schuettengruber B., Ganapathi M., Leblanc B., Portoso M., Jaschek R., Tolhuis B., van Lohuizen M., Tanay A., Cavalli G. Functional anatomy of polycomb and trithorax chromatin landscapes in *Drosophila* embryos // *PLoS Biol.* – 2009. – Vol. 7, № 1. – P. e13. (doi: 10.1371/journal.pbio.1000013)
- Schwanhausser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control // *Nature.* – 2011. – Vol. 473, № 7347. – P. 337-42. (doi: 10.1038/nature10098)
- Schweitzer R., Howes R., Smith R., Shilo B. Z., Freeman M. Inhibition of *Drosophila* EGF receptor activation by the secreted protein Argos // *Nature.* – 1995. – Vol. 376, № 6542. – P. 699-702. (doi: 10.1038/376699a0)
- Schweitzer R., Shaharabany M., Seger R., Shilo B. Z. Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination // *Genes Dev.* – 1995. – Vol. 9, № 12. – P. 1518-29.
- Schwendemann A., Lehmann M. Pipsqueak and GAGA factor act in concert as partners at homeotic and many other loci // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99, № 20. – P. 12883-8. (doi: 10.1073/pnas.202341499)
- Schwyter D. H., Huang J. D., Dubnicoff T., Courey A. J. The decapentaplegic core promoter region plays an integral role in the spatial control of transcription // *Mol Cell Biol.* – 1995. – Vol. 15, № 7. – P. 3960-8.
- Sekelsky J. J., McKim K. S., Messina L., French R. L., Hurley W. D., Arbel T., Chin G. M., Deneen B., Force S. J., Hari K. L., Jang J. K., Laurencon A. C., Madden L. D., Matthies H. J., Milliken D. B., Page S. L., Ring A. D., Wayson S. M., Zimmerman C. C., Hawley R. S. Identification of novel *Drosophila* meiotic genes recovered in a P-element screen // *Genetics.* – 1999. – Vol. 152, № 2. – P. 529-42.
- Selman K., Wallace R. A., Sarka A., Qi X. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio* // *Journal of Morphology.* – 1993. – Vol. 218, № 2. – P. 203-224. (doi: 10.1002/jmor.1052180209)

- Seydoux G., Dunn M. A. Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* // *Development*. – 1997. – Vol. 124, № 11. – P. 2191-201.
- Shelton D. A., Stegman L., Hardison R., Miller W., Bock J. H., Slightom J. L., Goodman M., Gumucio D. L. Phylogenetic footprinting of hypersensitive site 3 of the beta-globin locus control region // *Blood*. – 1997. – Vol. 89, № 9. – P. 3457-69.
- Shi Y., Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus // *Cell*. – 2003. – Vol. 113, № 6. – P. 685-700.
- Shimajima T., Okada M., Nakayama T., Ueda H., Okawa K., Iwamatsu A., Handa H., Hirose S. *Drosophila* FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor // *Genes Dev*. – 2003. – Vol. 17, № 13. – P. 1605-16. (doi: 10.1101/gad.1086803)
- Shopland L. S., Hirayoshi K., Fernandes M., Lis J. T. HSF access to heat shock elements in vivo depends critically on promoter architecture defined by GAGA factor, TFIID, and RNA polymerase II binding sites // *Genes Dev*. – 1995. – Vol. 9, № 22. – P. 2756-69.
- Soeller W. C., Poole S. J., Kornberg T. In vitro transcription of the *Drosophila* engrailed gene // *Genes Dev*. – 1988. – Vol. 2, № 1. – P. 68-81.
- Soeller W. C., Oh C. E., Kornberg T. B. Isolation of cDNAs encoding the *Drosophila* GAGA transcription factor // *Mol Cell Biol*. – 1993. – Vol. 13, № 12. – P. 7961-70.
- Spradling A. C. Developmental genetics of oogenesis // *The development of Drosophila melanogaster* / Bate M., Martinez Arias A. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. – P. 1-70.
- Spradling A. C., Stern D., Beaton A., Rhem E. J., Lavery T., Mozden N., Misra S., Rubin G. M. The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes // *Genetics*. – 1999. – Vol. 153, № 1. – P. 135-77.
- Strutt H., Cavalli G., Paro R. Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression // *EMBO J*. – 1997. – Vol. 16, № 12. – P. 3621-32. (doi: 10.1093/emboj/16.12.3621)
- Sun J., Smith L., Armento A., Deng W. M. Regulation of the endocycle/gene amplification switch by Notch and ecdysone signaling // *J Cell Biol*. – 2008. – Vol. 182, № 5. – P. 885-96. (doi: 10.1083/jcb.200802084)
- Suter B., Romberg L. M., Steward R. Bicaudal-D, a *Drosophila* gene involved in developmental asymmetry: localized transcript accumulation in ovaries and sequence similarity to myosin heavy chain tail domains // *Genes Dev*. – 1989. – Vol. 3, № 12A. – P. 1957-68.

- Tates A. D. Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: an electron microscope study: Compendium / Proefschrift R. t. L., The Netherlands, 1971. – 162 p.
- Taylor E. B., Rutter J. Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system // *Biochem Soc Trans.* – 2011. – Vol. 39, № 5. – P. 1509-13. (doi: 10.1042/bst0391509)
- Theurkauf W. E., Alberts B. M., Jan Y. N., Jongens T. A. A central role for microtubules in the differentiation of *Drosophila* oocytes // *Development.* – 1993. – Vol. 118, № 4. – P. 1169-80.
- Tie F., Prasad-Sinha J., Birve A., Rasmuson-Lestander A., Harte P. J. A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from *Drosophila* that contains polycomblike and RPD3 // *Mol Cell Biol.* – 2003. – Vol. 23, № 9. – P. 3352-62.
- Tilney L. G., Tilney M. S., Guild G. M. Formation of actin filament bundles in the ring canals of developing *Drosophila* follicles // *J Cell Biol.* – 1996. – Vol. 133, № 1. – P. 61-74.
- Tio M., Ma C., Moses K. spitz, a *Drosophila* homolog of transforming growth factor- α , is required in the founding photoreceptor cells of the compound eye facets // *Mech Dev.* – 1994. – Vol. 48, № 1. – P. 13-23.
- Tokuyasu K. T., Peacock W. J., Hardy R. W. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process // *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* – 1972. – Vol. 124, № 4. – P. 479-506.
- Tomlinson A., Ready D. F. Neuronal differentiation in *Drosophila* ommatidium // *Dev Biol.* – 1987. – Vol. 120, № 2. – P. 366-76.
- Tomlinson A., Struhl G. Decoding vectorial information from a gradient: sequential roles of the receptors Frizzled and Notch in establishing planar polarity in the *Drosophila* eye // *Development.* – 1999. – Vol. 126, № 24. – P. 5725-38.
- Tomlinson A., Struhl G. Delta/Notch and Boss/Sevenless signals act combinatorially to specify the *Drosophila* R7 photoreceptor // *Mol Cell.* – 2001. – Vol. 7, № 3. – P. 487-95.
- Topol J., Dearolf C. R., Prakash K., Parker C. S. Synthetic oligonucleotides recreate *Drosophila* fushi tarazu zebra-stripe expression // *Genes Dev.* – 1991. – Vol. 5, № 5. – P. 855-67.
- Torres I. L., Lopez-Schier H., St Johnston D. A Notch/Delta-dependent relay mechanism establishes anterior-posterior polarity in *Drosophila* // *Dev Cell.* – 2003. – Vol. 5, № 4. – P. 547-58.
- Tsigkari K. K., Acevedo S. F., Skoulakis E. M. 14-3-3epsilon Is required for germ cell migration in *Drosophila* // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. e36702. (doi: 10.1371/journal.pone.0036702)

- Tsuda L., Nagaraj R., Zipursky S. L., Banerjee U. An EGFR/Ebi/Sno pathway promotes delta expression by inactivating Su(H)/SMRTER repression during inductive notch signaling // *Cell*. – 2002. – Vol. 110, № 5. – P. 625-37.
- Tsukiyama T., Becker P. B., Wu C. ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor // *Nature*. – 1994. – Vol. 367, № 6463. – P. 525-32. (doi: 10.1038/367525a0)
- Tsukiyama T., Daniel C., Tamkun J., Wu C. ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor // *Cell*. – 1995. – Vol. 83, № 6. – P. 1021-6.
- Twig G., Shirihai O. S. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy // *Antioxid Redox Signal*. – 2011. – Vol. 14, № 10. – P. 1939-51. (doi: 10.1089/ars.2010.3779)
- Twombly V., Blackman R. K., Jin H., Graff J. M., Padgett R. W., Gelbart W. M. The TGF-beta signaling pathway is essential for Drosophila oogenesis // *Development*. – 1996. – Vol. 122, № 5. – P. 1555-65.
- Twombly V., Bangi E., Le V., Malnic B., Singer M. A., Wharton K. A. Functional analysis of saxophone, the Drosophila gene encoding the BMP type I receptor ortholog of human ALK1/ACVRL1 and ACVR1/ALK2 // *Genetics*. – 2009. – Vol. 183, № 2. – P. 563-79, ISI-8SI. (doi: 10.1534/genetics.109.105585)
- Van Doren M., Williamson A. L., Lehmann R. Regulation of zygotic gene expression in Drosophila primordial germ cells // *Curr Biol*. – 1998. – Vol. 8, № 4. – P. 243-6.
- van Steensel B., Delrow J., Bussemaker H. J. Genomewide analysis of Drosophila GAGA factor target genes reveals context-dependent DNA binding // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2003. – Vol. 100, № 5. – P. 2580-5. (doi: 10.1073/pnas.0438000100)
- van Steensel B., Braunschweig U., Filion G. J., Chen M., van Bemmelen J. G., Ideker T. Bayesian network analysis of targeting interactions in chromatin // *Genome Res*. – 2010. – Vol. 20, № 2. – P. 190-200. (doi: 10.1101/gr.098822.109)
- Vaquero A., Espinas M. L., Azorin F., Bernues J. Functional mapping of the GAGA factor assigns its transcriptional activity to the C-terminal glutamine-rich domain // *J Biol Chem*. – 2000. – Vol. 275, № 26. – P. 19461-8. (doi: 10.1074/jbc.M000967200)
- Voas M. G., Rebay I. Signal integration during development: insights from the Drosophila eye // *Dev Dyn*. – 2004. – Vol. 229, № 1. – P. 162-75. (doi: 10.1002/dvdy.10449)
- Voos W., Rottgers K. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis // *Biochim Biophys Acta*. – 2002. – Vol. 1592, № 1. – P. 51-62.
- Wang X., Bo J., Bridges T., Dugan K. D., Pan T. C., Chodosh L. A., Montell D. J. Analysis of cell migration using whole-genome expression profiling of migratory cells in the

- Drosophila* ovary // *Dev Cell*. – 2006. – Vol. 10, № 4. – P. 483-95. (doi: 10.1016/j.devcel.2006.02.003)
- Ward E. J., Berg C. A. Juxtaposition between two cell types is necessary for dorsal appendage tube formation // *Mech Dev*. – 2005. – Vol. 122, № 2. – P. 241-55. (doi: 10.1016/j.mod.2004.10.006)
- Ward E. J., Zhou X., Riddiford L. M., Berg C. A., Ruohola-Baker H. Border of Notch activity establishes a boundary between the two dorsal appendage tube cell types // *Dev Biol*. – 2006. – Vol. 297, № 2. – P. 461-70. (doi: 10.1016/j.ydbio.2006.05.021)
- Wasserman J. D., Urban S., Freeman M. A family of rhomboid-like genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling // *Genes Dev*. – 2000. – Vol. 14, № 13. – P. 1651-63.
- Weber J. A., Taxman D. J., Lu Q., Gilmour D. S. Molecular architecture of the hsp70 promoter after deletion of the TATA box or the upstream regulation region // *Mol Cell Biol*. – 1997. – Vol. 17, № 7. – P. 3799-808.
- Wharton K. A., Thomsen G. H., Gelbart W. M. *Drosophila* 60A gene, another transforming growth factor beta family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1991. – Vol. 88, № 20. – P. 9214-8.
- Wilkins R. C., Lis J. T. Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation // *Nucleic Acids Res*. – 1997. – Vol. 25, № 20. – P. 3963-8.
- Wilkins R. C., Lis J. T. GAGA factor binding to DNA via a single trinucleotide sequence element // *Nucleic Acids Res*. – 1998. – Vol. 26, № 11. – P. 2672-8.
- Wilkins R. C., Lis J. T. DNA distortion and multimerization: novel functions of the glutamine-rich domain of GAGA factor // *J Mol Biol*. – 1999. – Vol. 285, № 2. – P. 515-25. (doi: 10.1006/jmbi.1998.2356)
- Williamson A., Lehmann R. Germ cell development in *Drosophila* // *Annu Rev Cell Dev Biol*. – 1996. – Vol. 12. – P. 365-91. (doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.365)
- Wittkopp P. J., Vaccaro K., Carroll S. B. Evolution of yellow gene regulation and pigmentation in *Drosophila* // *Curr Biol*. – 2002. – Vol. 12, № 18. – P. 1547-56.
- Wolff T., Ready D. F. The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave // *Development*. – 1991. – Vol. 113, № 3. – P. 841-50.
- Wolff T., Ready D. F. Pattern formation in the *Drosophila* retina // *The development of Drosophila melanogaster* / Bate M., Martinez Arias A. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. – P. 1277-1325.

- Wolle D., Cleard F., Aoki T., Deshpande G., Schedl P., Karch F. Functional Requirements for Fab-7 Boundary Activity in the Bithorax Complex // *Mol Cell Biol.* – 2015. – Vol. 35, № 21. – P. 3739-52. (doi: 10.1128/mcb.00456-15)
- Wu C. The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I // *Nature.* – 1980. – Vol. 286, № 5776. – P. 854-60.
- Xiao H., Sandaltzopoulos R., Wang H. M., Hamiche A., Ranallo R., Lee K. M., Fu D., Wu C. Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions // *Mol Cell.* – 2001. – Vol. 8, № 3. – P. 531-43.
- Xie T., Finelli A. L., Padgett R. W. The *Drosophila* saxophone gene: a serine-threonine kinase receptor of the TGF-beta superfamily // *Science.* – 1994. – Vol. 263, № 5154. – P. 1756-9.
- Xiong W. C., Montell C. tramtrack is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the *Drosophila* eye // *Genes Dev.* – 1993. – Vol. 7, № 6. – P. 1085-96.
- Xu T., Caron L. A., Fehon R. G., Artavanis-Tsakonas S. The involvement of the Notch locus in *Drosophila* oogenesis // *Development.* – 1992. – Vol. 115, № 4. – P. 913-22.
- Xu C., Kauffmann R. C., Zhang J., Kladny S., Carthew R. W. Overlapping activators and repressors delimit transcriptional response to receptor tyrosine kinase signals in the *Drosophila* eye // *Cell.* – 2000. – Vol. 103, № 1. – P. 87-97.
- Yakoby N., Bristow C. A., Gouzman I., Rossi M. P., Gogotsi Y., Schupbach T., Shvartsman S. Y. Systems-level questions in *Drosophila* oogenesis // *Syst Biol (Stevenage).* – 2005. – Vol. 152, № 4. – P. 276-84.
- Yakunin A., Hallenbeck P. A Luminol/Iodophenol Chemiluminescent Detection System for Western Immunoblots // *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications* / Van Dyke K. et al. – New York: Taylor & Francis, 2001. – P. 179-187.
- Yamaguchi Y., Shibata H., Handa H. Transcription elongation factors DSIF and NELF: promoter-proximal pausing and beyond // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – Vol. 1829, № 1. – P. 98-104. (doi: 10.1016/j.bbagr.2012.11.007)
- Yusoff P., Lao D. H., Ong S. H., Wong E. S., Lim J., Lo T. L., Leong H. F., Fong C. W., Guy G. R. Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 5. – P. 3195-201. (doi: 10.1074/jbc.M108368200)
- Zhang M., Jiang M., Bi Y., Zhu H., Zhou Z., Sha J. Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. e41412. (doi: 10.1371/journal.pone.0041412)
- Zuckerkandl E. Sectorial gene repression in the control of development // *Gene.* – 1999. – Vol. 238, № 1. – P. 263-76.