

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Кафедра цитологии и генетики

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СО РАН
Лаборатория генетических основ онтогенеза

профессор
Серов Олег Леонидович

ГЕНЕТКА РАЗВИТИЯ

Курс лекций
для студентов 3 курса
ФЕН НГУ

1998

Предисловие.

Предлагаемый курс «Генетика развития» формировался в течении многих лет. Первоначальный замысел курса ограничивался, если так можно выразится, чисто генетическими аспектами и преимущественно рассмотрением роли отдельных генов в развитии. Однако вскоре стало ясным, что рассмотрение генного контроля развития в отрыве от эмбриологии, данных по организации генома или молекулярных механизмов взаимодействия генов существенно обедняет понимание общих закономерностей индивидуального развития, не отражает реального прогресса в этой бурно развивающейся области биологии. Отсюда возникла необходимость найти стержень, вокруг которого можно было бы объединить экспериментальный материал смежных и несмежных областей генетики и биологии, чтобы представить наши современные знания о развитии на фоне общей картины феноменального прогресса биологии.

Одним из таких объединяющих элементов стала концепция **дифференциальной активности генов**. В отечественной литературе основы этой концепции были наиболее четко и ясно изложены в монографии Л.И.Корочкина «Взаимодействие генов в развитии», изданной в 1977 г. За прошедшие два десятилетия эта концепция получила добротное экспериментальное обоснование. В предлагаемом курсе дифференциальная активность генов рассматривается на всех уровнях: индивидуальных генов (на примере, стадио- и тканеспецифических генов), на уровне хромосом (инактивация X-хромосом млекопитающих) и родительских геномов (геномный импринтинг).

Важным элементом, позволившем автору увязать прогресс в области изучения организации эукариотического генома с проблемами индивидуального развития, был подход, который может быть выражен в виде вопросов: **«Какая доля (часть) генома осуществляет контроль развития? Существуют ли специальные гены развития и если да, то как много их?»**. Рассмотрение этих вопросов существенно расширяет рамки традиционных задач генетики развития: **изучения времени и места действия генов в онтогенезе**.

При изложении экспериментальных данных невозможно было обойтись без детального рассмотрения новых технологий манипулирования с эмбрионами клетками и генами - таких как **трансгенез, направленный мутагенез и получение генетических копий, клонирование животных**, поскольку именно разработка этих новых экспериментальных подходов обусловила прогресс в понимании главной проблемы развития - как из одной яйцеклетки возникает целый организм.

Электронный вариант курса лекций по «Генетике развития» разработан в качестве вспомогательного пособия для студентов при подготовке сдачи зачета, но ни коей мере не может заменить живого изложения материала автором. Данный курс находится на стадии разработки, поэтому часть материала еще не отражена. Однако уже опубликованные главы могут использоваться студентами и интересующимися проблемами генетики развития.

Создание электронной версии курса не было бы возможным без активного и квалифицированного участия аспирантов Ларкина Д.М и Аульченко Ю.С. Автор благодарен аспиранту Ивановой Е.В. за помощь в редактировании текста, Березикову Е.В. и Вагнеру А.Н. за помещение курса в Интернет.

Создание данного курса лекций финансировалось институтом «Открытого общества» программа «Обучение и исследования с использованием Интернет», грант I2A707 и Федеральной целевой программой «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки на 1997 - 2000г.г.»

Оглавление

ГЛАВА 2. ГЕНЫ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ

2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ	4
2.1.1. Созревание яйцеклетки дрозофилы	5
2.1.2. Ранний эмбриогенез дрозофилы	8
2.1.3. Поздний эмбриогенез дрозофилы	10
2.1.4. Личиночная стадия развития	13
2.1.5. Тотипотентность и детерминация в эмбриогенезе дрозофилы	15
2.2. ГЕННЫЙ КОНТРОЛЬ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ	31
2.2.1. Характеристика материнских генов	32
2.2.2. Роль генов сегментации в развитии	43
2.2.3. Гомеозисные гены и их роль в развитии	51
Список рекомендуемой литературы	65

ГЛАВА 2.

ГЕНЫ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ.

Дрозофила, плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*), традиционный объект генетических исследований, и вполне понятно, что этот объект не мог не привлечь внимания исследователей, изучающих генный контроль развития. Более того, именно исследование на дрозофиле действия мутаций на нормальное развитие позволило ряду авторов сформулировать представление о существовании “генов развития”, то есть генов, функцией которых является контроль развития, реализация программы развития. Однако прежде чем перейти к рассмотрению природы такого рода генов и механизмов их действия, необходимо вкратце остановиться на характеристике нормального онтогенеза дрозофилы.

2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ.

Дрозофила относится к типу членистоногих, к классу двукрылых. Она имеет **мозаичный тип организации яйца**, и детерминация развития той или иной дефинитивной структуры происходит в ранние периоды развития. Принято различать следующие стадии развития дрозофилы:

1. **Ранний эмбриогенез** - первые 2,5 - 3 часа развития от момента оплодотворения до стадии целлюляризации;
2. **Поздний эмбриогенез** - от момента целлюляризации до вылупливания

личинки (20-22 часа от момента оплодотворения);

3. **Личиночная стадия** развития начинается от момента вылупливания личинки и продолжается до стадии окукливания (120 часов). Личиночная стадия, в свою очередь, подразделяется на три периода - личинка первого (стадия I), второго (стадия II) и третьего (стадия III) возрастов, причем переход одной личиночной стадии в другую сопряжен с линькой (сменой кутикулярных образований и внешнего покрова), находящейся под контролем главного гормона линьки - экдизона;

4. **Стадия куколки** начинается с момента окукливания и продолжается 70-72 часа до момента появления имаго, взрослой особи. Переход от личиночной стадии развития к куколке осуществляется под контролем, главным образом, экдизона.

Таким образом, развитие дрозофилы от момента оплодотворения до вылета имаго осуществляется за 9 дней. Продолжительность развития дрозофилы зависит от температуры окружающей среды.

Как отмечалось выше, дрозофила имеет мозаичный тип организации яйца, при котором поляризация цитоплазмы яйца играет ключевую роль в раннем эмбриогенезе. В связи с этим необходимо остановиться на характеристике овогенеза, начиная с ранних стадий дифференцировки примордиальной половой клетки до зрелой яйцеклетки.

2.1.1. Созревание яйцеклетки дрозофилы.

Примордиальная половая (презюмтивная) половая клетка взрослой самки претерпевает 4 последовательных деления, в

начале будущей яйцеклетке, тогда как остальные 15 формируют популяцию так называемых **питающих** клеток. На рис.2.1 и 2.2 схематически представлены строение фолликула и созревание яйцеклетки. Хорошо видно, что передний полюс ооцита

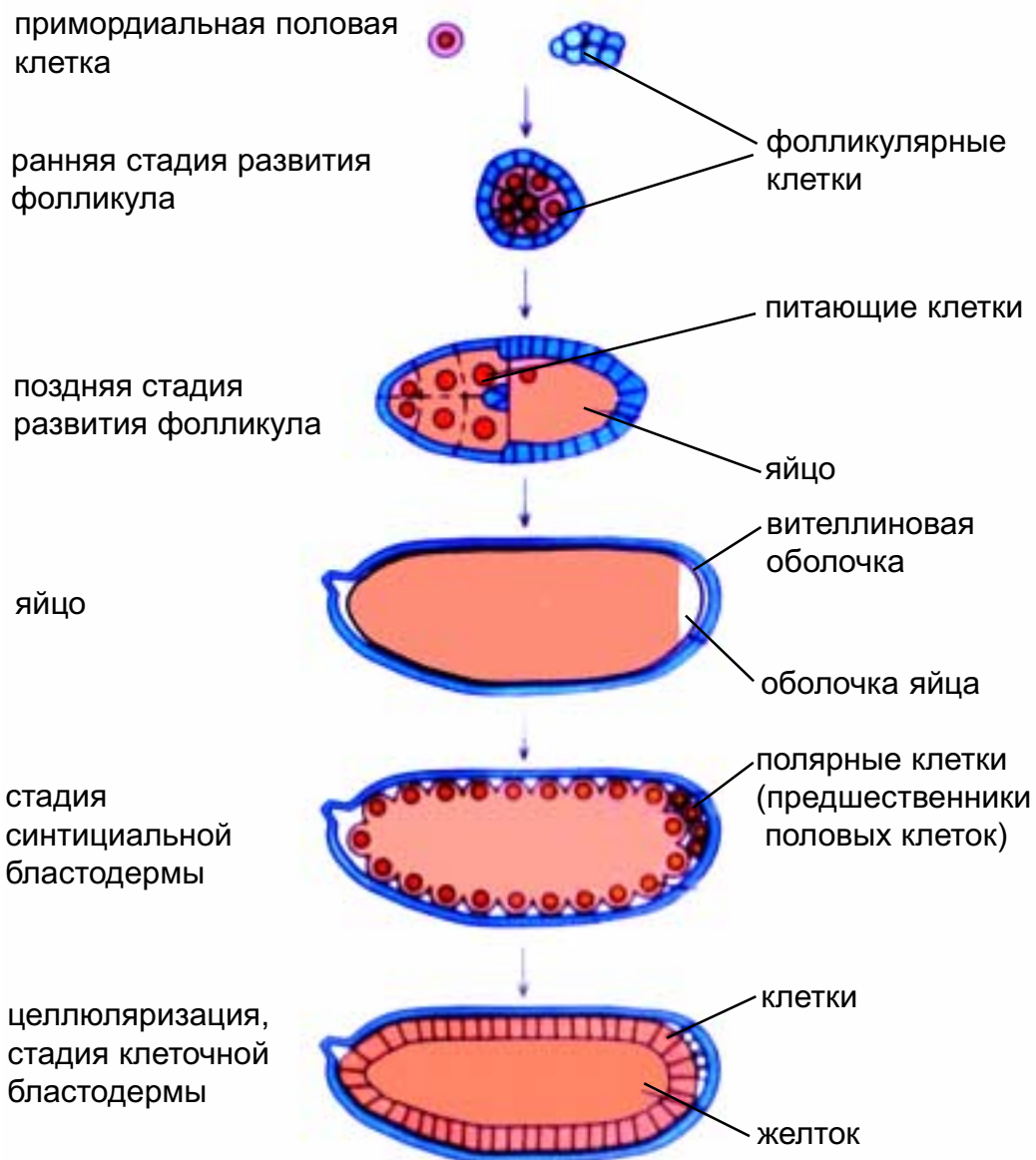


Рис.2.1. Яйцо дрозофилы состоит из примордиальной половой клетки с питающими и фолликулярными клетками, которые обеспечивают ооцит питанием и факторами, контролирующими развитие. Клеточная организация эмбриона формируется после 3-х часов с момента оплодотворения.

результате чего формируется 16 клеток. При этом следует отметить, что среди этих клеток **только одна** (как правило расположенная в центре) даст

контактирует и частично окружен питающими клетками, тогда как центральная часть и задний полюс покрыты слоем фолликулярных клеток.

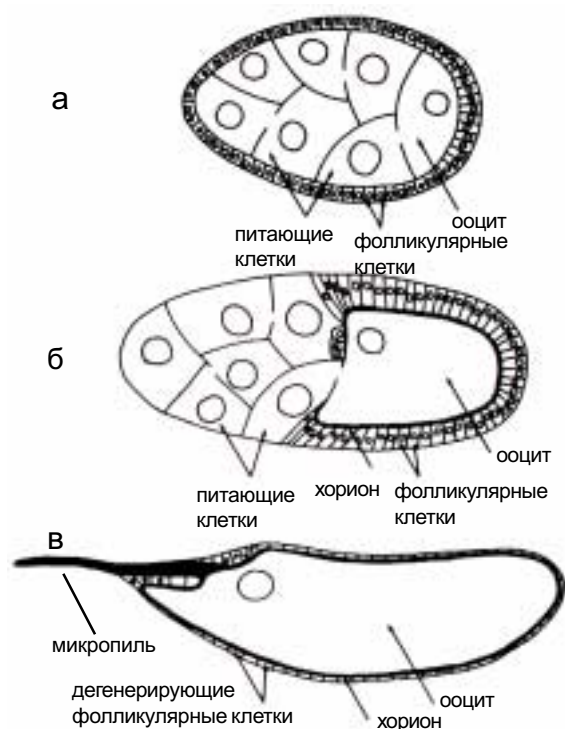


Рис.2.2. Ранняя, средняя и поздняя стадия овогенеза дрозофилы. Слева - передний полюс; вверху -дорзальная сторона яйца.

А. Яйцевая камера содержит фолликулярные клетки (соматические по происхождению), которые окружают питающие клетки и ооцит. Питающие клетки и ооцит соединены «мостиками», практически образуя подобие синцития. На этой стадии питающие клетки начинают секретировать иРНК, белки и субклеточные элементы в ооцит.

Б. Яйцевая камера становится удлинённой, фолликулярные клетки мигрируют вокруг ооцита, и начинается образование хориона.

В. На поздней стадии овогенеза питающие клетки дегенерируют и распадаются. После формирования хориона фолликулярные клетки также дегенерируют.

Фолликулярные клетки, в отличие от питающих, происходят из соматических клеток.

Функция питающих клеток, как это следует из их названия, заключается в питании созревающей яйцеклетки. Однако этим их функция не исчерпывается. Эти клетки принимают прямое, непосредственное

участие в формировании **полярности цитоплазмы ооцита**. Понятие “полярность яйца” или “полярность цитоплазмы яйца” подразумевает наличие градиентов концентраций различного рода белков и индивидуальных иРНК вдоль передне-задней и дорзально-вентральной осей.

Между созревающим ооцитом и питающими клетками имеются тесные межклеточные связи посредством так называемых “цитоплазматических мостов” (“cytoplasmic bridges”) или “кольцевых каналов” (“ring canals”). В процессе овогенеза из питающих клеток происходит перманентный транспорт белков, часто в комплексе с РНК, а также полисахаридов и липидов.

Нуклео-протеидные комплексы представляют собой ассоциации специфических иРНК (первичных транскриптов) и белков. Благодаря существованию “цитоплазматических мостов” между созревающей яйцеклеткой и питающими клетками наблюдается транспорт из последних даже субклеточных органелл, таких как рибосомы и митохондрии. Важно подчеркнуть также, что такой транспорт белков, РНК и субклеточных органелл осуществляется преимущественно через передний полюс ооцита, там где питающие клетки контактируют с ооцитом. Такого рода контакт ооцита и питающих клеток предопределяет характер его поляризации, формирование градиентов концентраций различных белков и РНК преимущественно в дорзально-заднем направлении. Что касается становления второй оси - дорзально-вентральной, то здесь

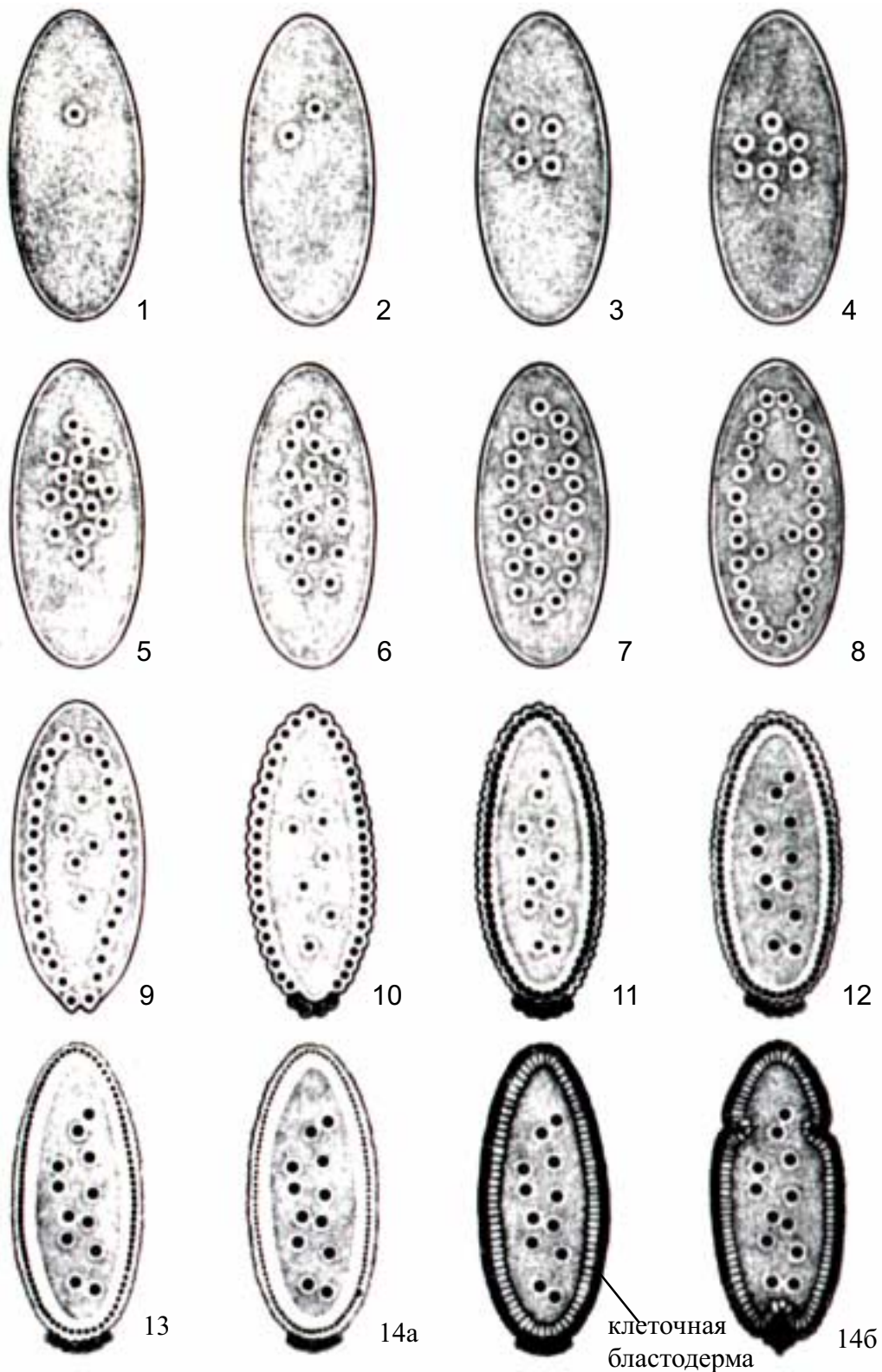


Рис.2.3. Ранние стадии эмбриогенеза дрозофилы, от момента оплодотворения до гастрюляции. Цифры показывают число делений. Каждый цикл начинается с интерфазы, а заканчивается митозом. Эмбрионы показаны в продольном положении и без виттелиновой оболочки. До 5-ого деления все ядра показаны черными кружочками, после 5-ого показана только часть ядер. Заметна свободная от клеток цитоплазма на периферии эмбриона (периплазма). (по Foe and Alberts, 1983).

ведущую роль играют контакты и транспорт белков и иРНК из фолликулярных клеток в ооцит.

2.1.2. Ранний эмбриогенез дрозофилы.

В ходе оплодотворения спермий проникает в яйцеклетку через микропиле (рис.2.2). Зрелый ооцит находится на стадии МI (мейоз-I). Ядерная оболочка разрушена и гаплоидный набор хромосом оказывается лежащим свободно в ооплазме, в передней трети яйца ближе к дорзальной его стороне. Эта структура называется **кариосфера**. Следующие фазы мейоза - два деления с образованием трех направительных телец и одного пронуклеуса - происходят после оплодотворения. При стандартных условиях от метафазы I до завершения второго мейотического деления требуется 12 мин. В течении следующих 3 мин. один из 4-х гаплоидных продуктов мейоза формирует пронуклеус. В течение этого 15-минутного периода головка спермия увеличивается в размере и превращается в мужской пронуклеус.

Первые 9 зиготические деления синхронны, и продолжительность каждого митоза примерно 10 мин. (рис.2.3). Важно отметить, что эти деления ядер не сопровождаются цитокинезом и вследствие этого ядра находятся в общей цитоплазме, образуя синцитий. После 7-го деления наблюдается миграция ядер к периферии зиготы, в перикортикальную зону (рис.2.3). После 9-го деления группа ядер (около

40) достигает заднего полюса яйца, где находится так называемая **полярная плазма (polar plasm)** или **полярная зона** (рис.2.3). Ядра, достигшие полярной плазмы, немедленно приобретают клеточную структуру и дают начало **клеткам-предшественникам зародышевого пути (germ cells)** (рис.2.3). Таким образом, полярные клетки есть первые клетки в раннем развитии дрозофилы. Между 9 и 10-м делениями, мигрирующие ядра достигают периферии яйца и начинают образовывать единый слой, выстраиваясь в перикортикальном пространстве (рис.2.4). Последующие 4-деления также синхронны, хотя и распространяются в виде волны. Таким образом, в результате 13 делений

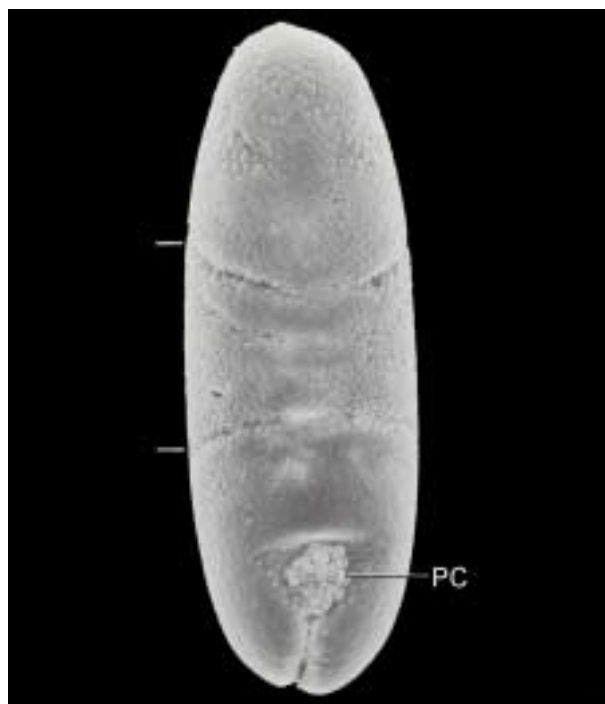


Рис.2.4. Вид с дорзальной стороны эмбриона на стадии появления зародышевого пояса («germ band»). PC - полярные клетки находятся около заднего впаивания первичной кишки.

образуется около 6000 ядер, которые находятся в перикортикальной зоне

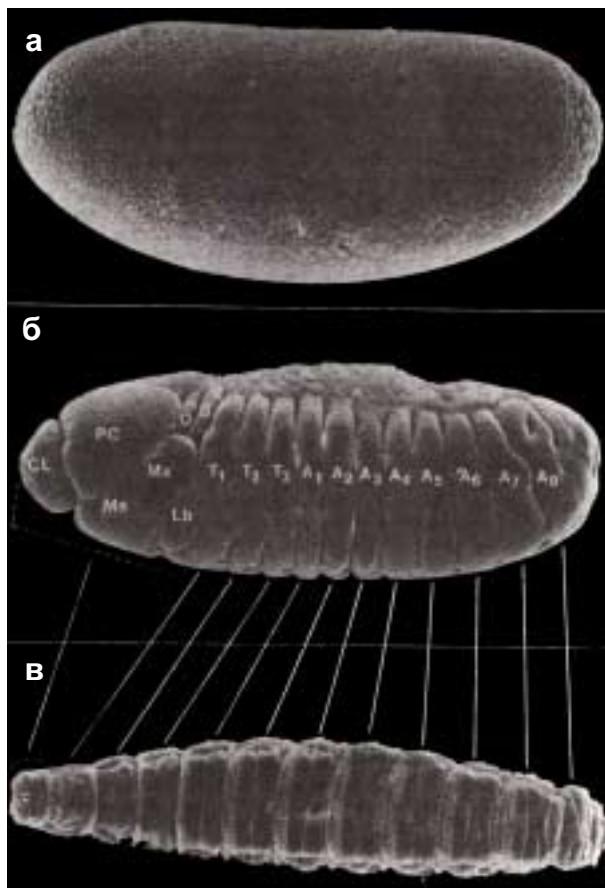


Рис. 2.5. Бластодерма (А), стадия сегментированной зародышевой полости (Б) и личинка I-ого возраста (В) *D.melanogaster*. Линиями соединены соответствующее друг другу сегменты 8-и часового эмбриона и личинки. Головы личинки и эмбриона показаны прерывистой линией. Обозначения сегментов: CL - клипеолабральный, PC - процефалический, Ma - мандибулярный, Lb - нижнегубной, O - глазной, T₁-T₃ - первый, второй и третий грудные, A₁-A₈ - от первого до восьмого брюшные, D - дорзальный валик.

эмбриона. Эта стадия развития называется **стадией синтициальной бластодермы**, поскольку все ядра продолжают находиться в единой, общей цитоплазме (рис.2.3).

В ходе интерфазы 14-го митоза происходит одно из ключевых событий раннего эмбриогенеза - **асинхронность деления ядер**, и **бластодерма приобретает клеточную организацию**. Именно после 14

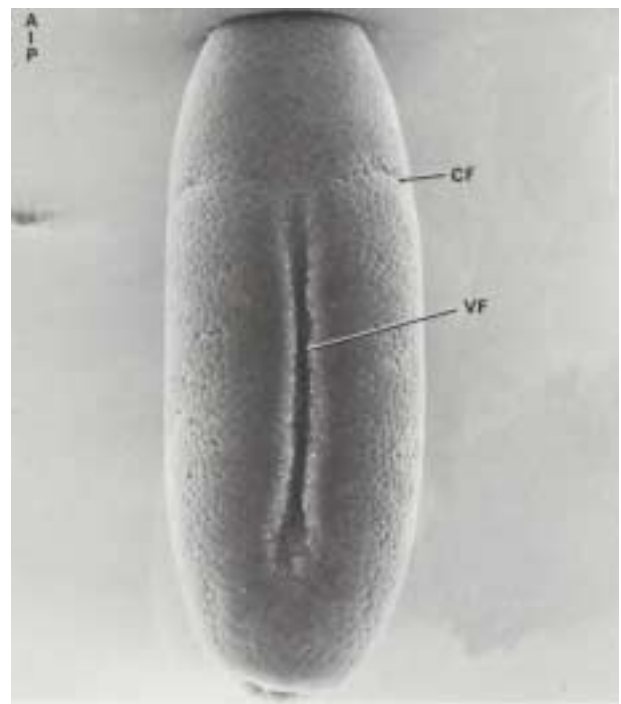


Рис.2.6. Вид с вентральной стороны эмбриона на стадии начала гастрюляции. Видна вентральная продольная борозда (VF) через которую мезодерма инвагинирует. А - передний полюс, Р - задний полюс, CF - цефалическая борозда.

деления вокруг каждого ядра образуется клеточная оболочка - стадия **целлюляризации**. Эмбрион на этой стадии развития приобретает клеточное строение - **стадия клеточной бластодермы**. Эмбрион напоминает мешок, окруженный оболочкой, состоящей из одного слоя клеток и не имеющей каких-либо морфологических ориентиров (рис.2.5). Целлюляризация означает также окончание раннего эмбриогенеза и переход эмбриона в стадию позднего эмбриогенеза.

Как видно из таблицы 2.1, продолжительность раннего эмбриогенеза дрозофилы около 2,5 часов. Существуют несколько классификаций стадий эмбриогенеза. В таблице 2.1 приведены две наиболее часто используемых номенклатуры

Таблица 2.1. Стадии эмбриогенеза дрозофилы (по Asburner, 1989)
(в сокращенном виде).

Стадия*	Стадия**	Продолжительность в мин.	Время час.мин.	Характерные признаки
1	1	25	0-0.25	1-е и 2-е деления-дробления
2	2	40	0.25-1.05	3-8 деления-дробления, «шапочка полярной цитоплазмы»
3	3	15	1.05-1.20	9-е деление-дробления, полярные клетки формируют почку
4	4	50	1.20-2.10	образование полярных клеток, синтициальная бластодерма
5	5	40	2.10-2.50	целлюризация, полярные клетки мигрируют
6	6	10	2.50-3.00	ранняя гастрюляция, инвагинация мезо- и энтодермы
7	7	10	3.00-3.10	окончание гастрюляции, инвагинация передней и задней первичной кишки
8	8 (часть)	30	3.10-3.40	сегментация
9	8 (часть)	40	3.40-4.20	дорзальные складки и исчезновение цефалической борозды
10	8 (часть)	60	4.20-5.20	
11	10 (часть)	120	5.20-7.20	образование парасегментных складок
12	10 (часть) - 11	240	7.20-9.20	полная сегментация
13	11 (часть)	60	9.20-10.20	начало инволюции головы
14	12 (часть)	60	10.20-11.20	инволюция головы
15	12 (часть)	100	11.20-13.00	
16	12 (часть)	180	13.00-16.00	мышечные сокращения
17	13-14		16.00- вылупл.	

* - стадии по Campos-Ortega and Hartenstein (1985), при 25⁰С.

** - стадии по Brownes (1975), при 22⁰С.

развития дрозофилы.

2.1.3. Поздний эмбриогенез дрозофилы.

Непосредственно по окончанию

целлюляризации клеточная бластодерма вступает в следующую стадию эмбриогенеза - **гастрюляцию**, то есть образование трех зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы. Началом гастрюляции является впячивание клеток вдоль

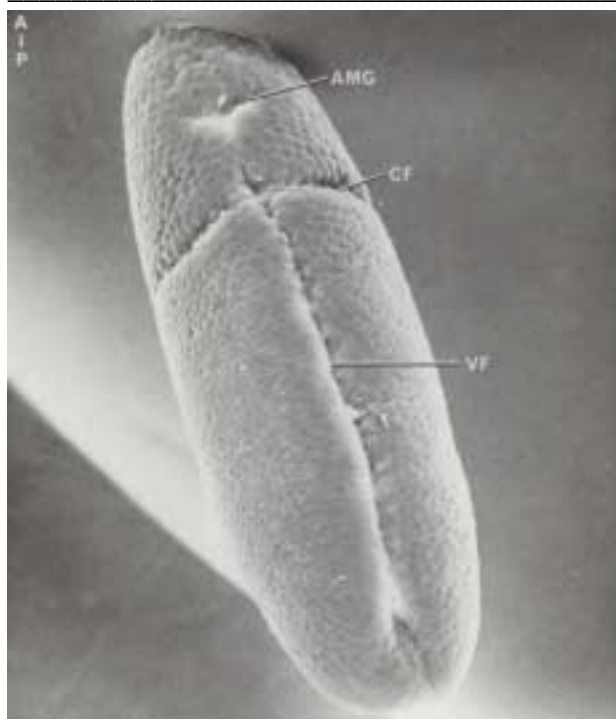


Рис.2.6а. Вид с вентральной стороны гастрюлы через 30 мин. после начала гастрюляции (предыдущий рис.2.5). VF - вентральная борозда, CF - цефалическая борозда, AMG - переднее впячивание первичной кишки.

вентральной серединой линии - формирование **мезодермальной полоски** (рис.2.6 и 2.6а). Мезодермальная полоска включает по 8-10 клеток по обе стороны вентральной серединой линии, превращаясь в **вентральную борозду**. Эта борозда практически проходит вдоль всей длины эмбриона от переднего до заднего полюсов, и когда края борозды смыкаются формируется внутренняя трубка. Этот процесс совершается в течение нескольких минут. Мезодерма остается в контакте с поверхностным слоем эктодермальных клеток посредством тонкого перешейка шириной в одну-две клетки (рис.2.7). Таким образом, в результате гастрюляции формируется мезодерма вдоль передне-задней оси эмбриона. Вскоре начинается

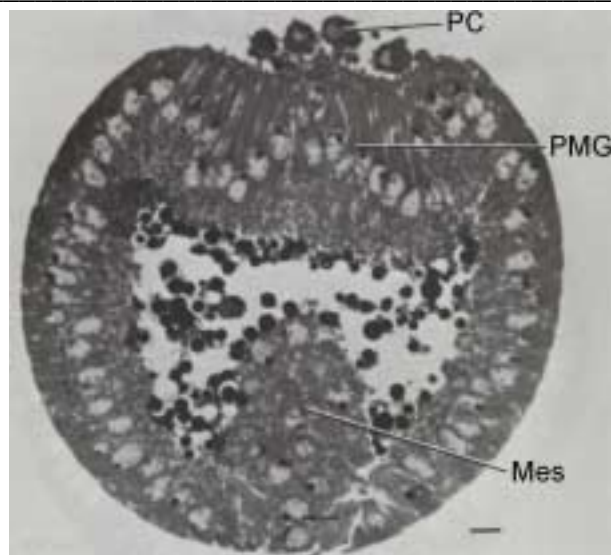


Рис. 2.7. Поперечный срез через эмбрион на ранней стадии формирования первичной кишки. Видно начало заднего впячивания (PGM) и вовлечение в этот процесс полярных клеток (PC). Mes - мезодерма.

инвагинация передней и задней частей зачатка кишки и образование личиночной кишки. Следует отметить, что передняя и задняя части личиночной кишки являются дериватами эктодермы и мезодермы, тогда как средняя является дериватом энтодермы и мезодермы. Дальнейшая дифференцировка кишки дает начало различным морфологическим структурам личинки, таким как рот, глотка, пищевод, кольцевая железа, желудок, мальпигиевы сосуды, анус и различные типы эпителиальных клеток (таблица 2.2).

Практически одновременно с образованием вентральной борозды происходит формирование **головной борозды (cephalic furrow)** на переднем конце зародыша (рис.2.6а). Эта борозда отделяет большую часть головы от туловища. Дорзальная часть головной борозды исчезает к 7-8-му часам эмбриогенеза.

Таблица 2.2. Производные первичной кишки (по Fullilove, et al., 1978)

Источник	Структура личинки
Стомодеум	рот глотка пищевод стомодеальная нервная система кольцевая железа слюнные железы (часть) двигаются через стомодеум
Передняя часть Некоторые полярные клетки и возможно клетки кишечника Задняя часть	прежелудок (часть) эпителий середнекишечной цеки эпителий средней кишки: 1. Большие клетки 2. Каликоциты 3. «железные» клетки мальпигиевые сосуды эпителий задней кишки анус

На 7-ом часу развития на другом конце начинается процесс сегментации. К 8-ому часу развития можно хорошо видеть, что имеется по меньшей мере 12 регулярных повторяющихся сегментов: три торакальных (грудных), T1 (переднегруди), T2 (среднегруди) и T3 (заднегруди), 8 абдоминальных (брюшных) (с A1 по A8) и 1 хвостовой (рис.2.5 и 2.8). В головной части эмбриона (примерно к 10 часу развития) можно видеть 6 сегментов, имеющих различную форму и как бы сливающиеся между собой: мандибулярный (Ma), максиллярный (Mx), нижнегубной (Lb), глазной (O), клипеолабральный (CL) и цефалический (PC) (рис.2.5 и 2.8). Из рис.2.5 можно видеть преобразование между сегментными структурами на поверхности эмбриона и преобразование их в сегментные структуры на теле личинки. Таким образом, эмбриогенез завершается

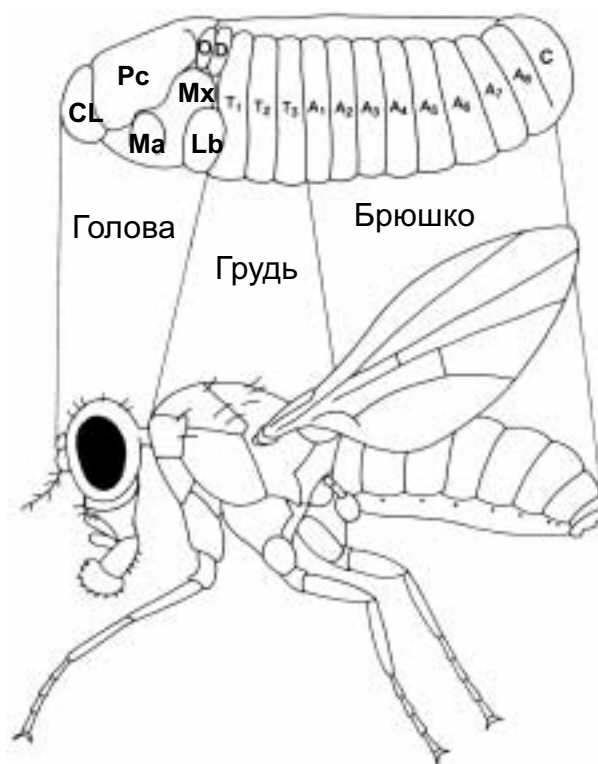


Рис. 2.8. Схема, показывающая соответствие между сегментами 8-и часового эмбриона и имаго. Обозначения сегментов те же, что и на рис. 2.5.

созданием метамерной структуры - образованием кутикулярных покровов и внутренних органов личинки.

Вылупливание личинки I-го возраста происходит через 22-24 часа от момента оплодотворения (рис.2.5). В таблице 2.1 приведены характеристики стадий эмбриогенеза дрозофилы и время протекания отдельных стадий.

2.1.4. Личиночная стадия развития.

На рис. 2.5 показана личинка I-го возраста. На переднем конце личинки находится рот с крюком (приспособление позволяющее личинке прикрепляться к субстрату), а на заднем конце анальное отверстие. Передний вентральный край каждого из 3 грудных и 8 брюшных сегментов окаймлен рядом **зубчиков (denticles)** - кутикулярных образований, хорошо видимых в поляризованном свете. Форма зубчиков различна в грудных и брюшных сегментах, что позволяет идентифицировать последние. Головные сегменты на поздних стадиях эмбриогенеза инвертируют таким образом, что голова оказывается внутри личинки, где 3 сегмента (Ma, Mx и Lb) дают начало ротовым структурам личинки. **Этот процесс называется инволюцией головы.**

Морфология личинки меняется незначительно в ходе развития, в основном увеличиваются ее линейные размеры. Конечно, это не исключает усложнение той или иной структуры. Например, можно отметить увеличение числа зубов в ротовом крюке у личинок I, II и III-го возрастов. Тем не менее именно рост характерен для личиночной стадии развития.

Необходимо, однако отметить, что в основе роста лежит не столько пролиферация и следовательно

увеличение числа клеток, сколько **полиплоидия и политенизация**. Гистологический анализ показывает, что большинство личиночных органов и тканей представлены либо полиплоидными клетками (например, мышцы, жировые тела) или клетками, имеющими политенные хромосомы (слюнные железы, мальпигиевые сосуды, эпителиальные клетки кишечника). Это результат либо эндополиплоидизации, при которой митоз не сопровождается цитокинезом, или нерасхождением хроматид (политенизация). Таким образом, при развитии личинки число клеток не увеличивается в большинстве органов и тканей, за исключением имагинальных дисков и их аналогов (гистобластов), нейробластов (клеток-предшественников нейтральных клеток имаго) и клеток гонад. Имагинальные диски, гистобласты, нейробласты и клетки зачатков гонад представлены диплоидными клетками, которые однако слабо пролиферируют.

Заслуживают особого внимания типично личиночные образования, так называемые **имагинальные диски и их аналоги в абдоминальных сегментах- гистобласты**. Роль имагинальных дисков и гистобластов исключительно велика в онтогенезе дрозофилы. Именно эти личиночные образования являются материальными источниками формирования практически всех морфологических структур имаго (за исключением нервных ганглиев).

У личинки имеется 9 имагинальных дисков: лабиальный, клипеолабральный, глазо-антенный,

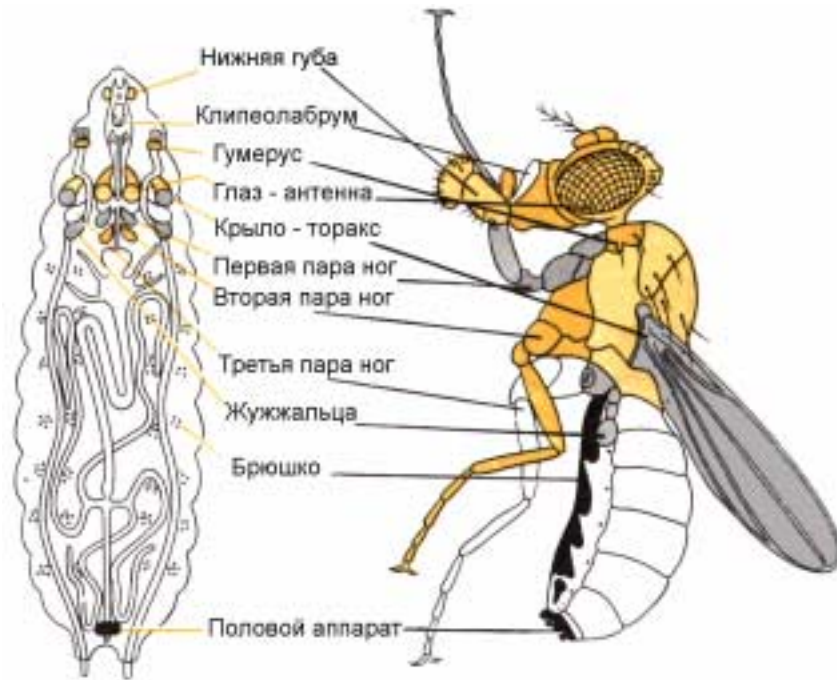


Рис.2.9. Имагинальные диски личинки *D. melanogaster* дают начало развитию различных структур на теле имаго. Абдоминальные стериты и тергиты развиваются из гистобластов (выделены в виде точек).

крыловой, галтерный, первый ножной, второй ножной, третий ножной и центральный или генитальный. Названия дисков указывают, источником каких структур взрослой мухи они являются. На рис.2.9 показано происхождение различных органов имаго из соответствующих имагинальных дисков. Например, видно, что различные ротовые структуры (“губы” (labium) и их производные) развиваются из двух дисков - лабиального и клиолабрального. Глазо-антенный диск дает начало развитию антенны, ее производных и глаза. Гистобласты в каждом из 8 брюшных сегментов дают начало различным частям имагинальной кишки, клеток гемолимфы и многих других эпителиальных клеток соответствующих структур брюшных сегментов имаго (рис.2.9).

У личинки имагинальные диски

представляют собой небольшие группы диплоидных клеток, имеющих сходную морфологию. Вероятно, впервые имагинальные клетки появляются в позднем эмбриогенезе (примерно через 10 часов после оплодотворения), но как видимые морфологические структуры (диски), отделенные от других тканей и клеток, их можно идентифицировать только со стадии личинки первого возраста. Анализ мозаиков (соматических рекомбинантов, ниже этот подход будет рассмотрен более детально) позволяет определить число клеток, из которых состоят имагинальные диски в момент их детерминации. Оказалось, что, например, галтерный диск состоит из 10 клеток, которые уже на стадии клеточной бластодермы преддетерминированы, чтобы дать начало развитию жужжальцам, а крыловой диск на этой же стадии представлен 20 клетками. Считается,

что презумптивные клетки будущих имагинальных дисков не пролиферируют в ходе эмбриогенеза; они пролиферируют на невысоком уровне у личинки до стадии окукливания. В ходе куколочной стадии (метаморфоза) происходит интенсивная пролиферация клеток во всех имагинальных дисках и их дифференцировка в дефинитивные структуры имаго. Клетки гистобластов не пролиферируют на личиночной стадии развития, но интенсивно делятся на куколочной стадии.

2.1.5. Тотипотентность и детерминация в эмбриогенезе дрозофилы.

Ядра до стадии синтициальной бластодермы являются **тотипотетными**. Такой вывод однозначно следует из экспериментов по трансплантации ядер, взятых от эмбрионов разных стадий развития, в энуклеированные яйца (неоплодотворенные яйцеклетки). Схема одного из таких экспериментов выглядит следующим образом. Донорами ядер были эмбрионы трех возрастов: 1) эмбрионы после 3-го деления дробления, когда 8 ядер находятся в центре цитоплазмы; 2) полярная зона синтициальной бластодермы после 7-го деления дробления, когда ядра впервые достигают заднего полюса; 3) латеральная сторона эмбриона на стадии синтициальной бластодермы (160 мин. после оплодотворения). Собственные ядра неоплодотворенных яйцеклеток удалялись с помощью микропипетки и затем в

энуклеированные яйца вводились донорские ядра. Все эмбрионы - доноры ядер имели генотип дикого типа, тогда как реципиентные энуклеированные яйца были генетически маркированы мутациями: *yellow* (у, желтый цвет тела), *singed* (sn, опаленные щетинки) и *lozenge* (lz^{50e} , маленькие глаза без ф а с е т о к). Большинство реконструированных яйцеклеток развивались нормально до вылупливания и личинки I-го возраста, и реже - до II- и III-го возрастов или окукливания. Таким образом, эти эксперименты показали, что донорские ядра от эмбрионов до стадии клеточной бластодермы способны обеспечить развитие реконструированных яйцеклеток до стадии личинки и даже куколки, то есть они несомненно обладали высокими потенциями. Анализ причин остановки развития реконструированных яиц показал, что процедура трансплантации и манипуляций с эмбрионами слишком травматичны и являются основной причиной гибели эмбрионов. В связи с этим, эксперименты были дополнены другим методическим приемом оценки потенциала развития тех или иных частей ранних эмбрионов. Речь идет о методе культивирования *in vivo* различных частей эмбрионов путем трансплантации их в брюшко взрослой самки. Трансплантированные таким способом эмбриональные клетки хорошо размножаются в гемолимфе брюшка реципиентной взрослой мухи. Более того, если такие эксплантанты ретрансплантировать личинкам III-го возраста (вступающих в метаморфоз)

клетки начинают дифференцироваться и давать начало дефинитивным структурам имаго. Комбинация методов пересадки ядер в энуклеированные яйца и культивирования *in vivo* разных частей дефективных эмбрионов, развившихся из реконструированных яиц позволила более полно раскрыть потенции донорских ядер. Результаты культивирования *in vivo* показали, что первичные трансплантаты, будучи перенесенными в метаморфизирующую личинку, дают начало развитию разнообразных структур имаго. Эти результаты убедительно показывают, что донорские ядра, в независимости от места их локализации в синтициальной бластодерме, обладают высоким потенциалом развития, то есть тотипотентны. В другом эксперименте по трансплантации ядер, взятых от эмбрионов на стадии ранней гастролы, также наблюдалось развитие реконструированных яиц до личиночной стадии развития. Остановившиеся в развитии реконструированные эмбрионы или личинки были использованы в качестве доноров клеток. Донорские клетки были взяты из полярной плазмы или зачатка гонад и были трансплантированы в полярную область бластодермы или в область зачатка гонад личинки (рис.2.12 (нет)). После такой трансплантации донорские клетки перемешались с клетками реципиента и участвовали в формировании гонад, в результате чего у взрослых мух развиваются мозаичные гонады. Анализ этих мозаиков показал, что они

действительно способны продуцировать 2 типа гамет, одни гаметы генотипа реципиентного эмбриона (личинки), тогда как другие имеют генотип идентичный с донорскими клетками, которые в свою очередь берут начало от реконструированных яиц (рис.2.12 (нет)). Таким образом, вывод о том, что ядра до стадии синтициальной (и даже ранней клеточной) бластодермы тотипотентны (омнипотентны) достаточно обоснован.

Однако после целлюляризации большинство клеток бластодермы утрачивают тотипотентность и становятся **предерминированными (коммитированными)** к какому-то единственному пути развития (дифференцировки). Согласно определению В.Геринга (W.Gehring) процесс дифференцировки тотипотентной клетки можно разделить на 2 фазы: **первая фаза** - программирование клетки или собственно **детерминация** к развитию по одному единственному пути из множества возможных других. В современной литературе часто используется термин **коммитирование**, практически синоним детерминации, отражающий также ограничение путей развития. **Вторая фаза** - реализация программы развития, приводящая к появлению морфологических и биохимических характеристик (признаков) специализированной клетки. Применительно к дрозофиле, обе эти фазы значительно разобщены во времени: детерминация происходит на стадии клеточной бластодермы, тогда как появление разного рода

специализированных дифференцированных клеток и морфологических структур обнаруживается только у куколки перед вылетом имаго.

Какие же факты лежат в основе вывода, что клетки на стадии бластодермы становятся детерминированными к развитию тех или иных дефинитивных структур имаго? Существует немало экспериментальных данных (основанных на разных экспериментальных подходах), подтверждающих это положение. Например, если эмбрион (маркирован мутациями: *multiple wing hair*, множественные крыловые шетинки и *ebony* (*e*, черное тело)) на стадии клеточной бластодермы (3 часа развития) разрезать на две равные части (рис.2.13), а затем отдельно обе половинки смешать с клетками целых эмбрионов, маркированных другими мутациями (*ebony* (черное тело), *white* (*w*, белые глаза) и *forked* (вилчатые крылья)) и такую смесь трансплантировать в брюшко взрослой самки, то в этом случае можно наблюдать пролиферацию трансплантированных клеток. Однако, если клетки трансплантата поместить в метаморфизирующую личинку, то можно наблюдать их дифференцировку и образование различных структур имаго (рис.2.14). Гистологический анализ трансплантантов показал, что клетки передней части бластодермы дают начало только головным (антенна, глаза и др.) и торакальным (крылья, галтеры, и ноги) структурам, тогда как клетки задней области развиваются только в структуры задней

части имаго. Сходные данные были получены в экспериментах по смешиванию клеток передних и задних частей бластодермы, взятых от разных эмбрионов, маркированных разными мутациями. Смесь таких клеток была трансплантирована и в брюшко взрослой самки для культивирования *in vivo*. После достаточно продолжительного культивирования эксплантанты извлекались из брюшка и вводились в метаморфизирующие личинки. Как отмечалось выше, такой прием стимулирует клетки к дифференцировке. Гистологический анализ эксплантантов показал, что они давали начало различным имагинальным структурам: клетки, происходящие из передних частей бластодермы, развивались только в

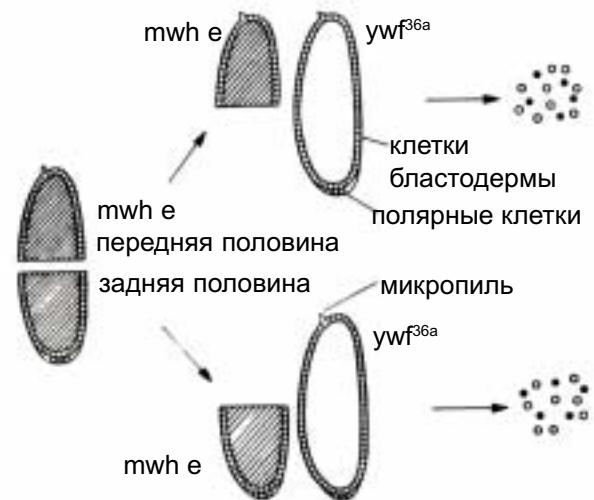


Рис.2.13. Экспериментальная процедура анализа состояния детерминации клеток разных районов бластодермы. Бластодерму генетически маркированных эмбрионов разрезали на две половины и отдельно соединили с цельными эмбрионами, несущими другие маркеры. Затем такие эмбрионы диссоциируют до однородной клеточной суспензии и культивируют *in vivo* (трансплантация в брюшко). Маркерные гены: *mwh* - *multiple wing hairs*; *e* - *ebony*; *w* - *white*; *f^{36a}* - *forked* (по Chan and Gehring, 1971).

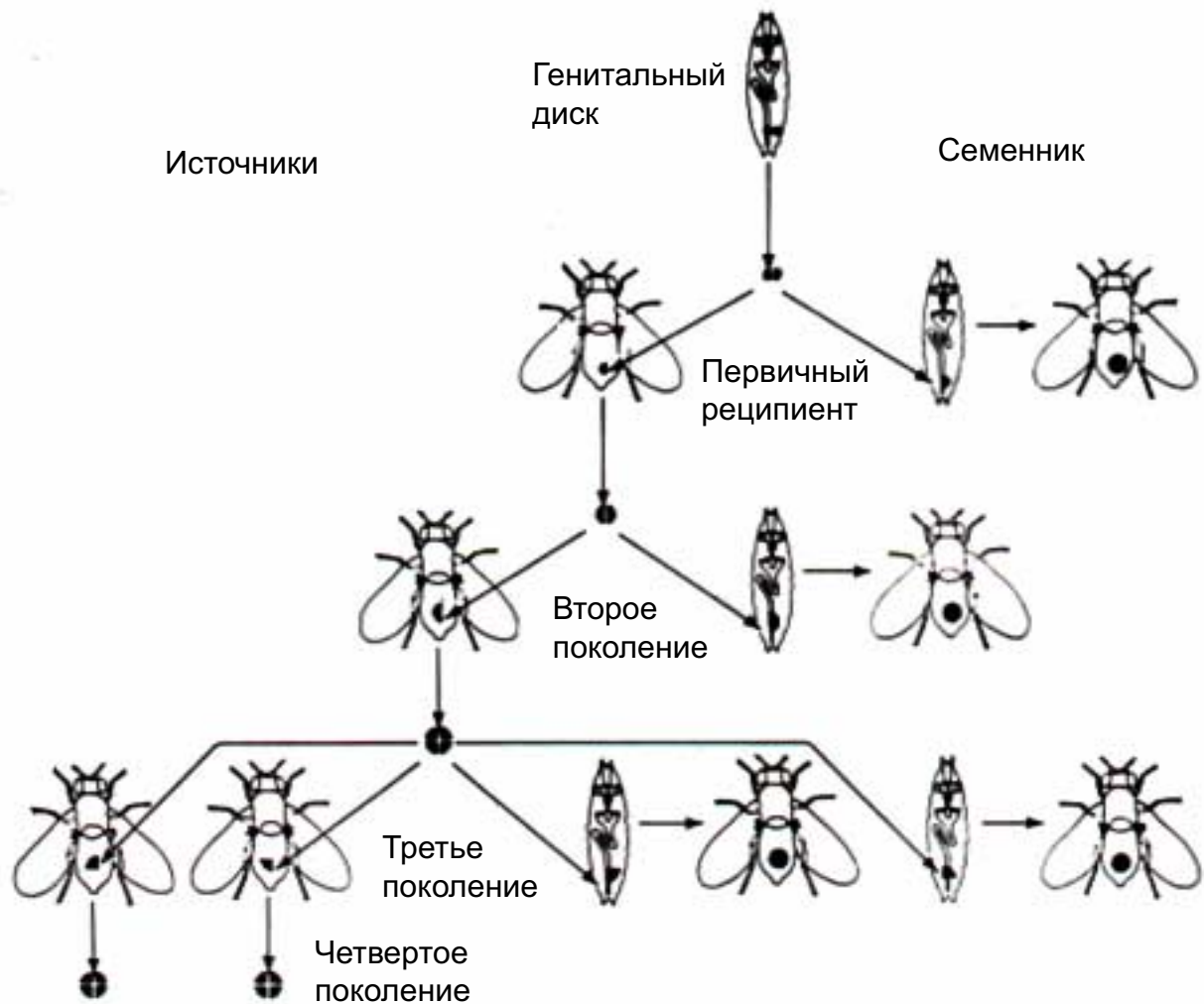


Рис.2.14. Схема культивирования *in vivo* в брюшке имаго на примере клеток генетального диска. Показана серия трансплантаций генитального диска в брюшко взрослых мух. В каждой генерации популяция клеток диска разделяется на две части; одна трансплантируется имаго, а другая - личинке. Таким образом, одна часть клеток культивируется и размножается в брюшке имаго, а другая часть клеток дифференцируется в эксплантате у личинки, формируя различные структуры (по Nadorn, 1968).

головные структуры, а из задних частей - только в структуры гонад и задние сегменты имаго. Существуют и другие приемы оценки детерминации клеток бластодермы, такие как, например, удаление или разрушение клеток в какой-либо части бластодермы. Как правило, это приводит к тому, что у имаго будет отсутствовать та или иная дефинитивная структура. Таким образом, **клетки, расположенные в разных частях бластодермы имеют индивидуальную судьбу в развитии, на этой стадии они**

предетерминированы к развитию в ту или иную дефинитивную структуру имаго.

Большой экспериментальный материал, подтверждающий это положение, был получен при исследовании генетических мозаиков. Это чисто генетический способ оценки детерминации. Известно, что эмбрионы дрозофилы, имеющие генотип XX, развиваются как самки, тогда как с генотипами XY и XO - как самцы. В лабораторных популяциях дрозофилы найдена мутация X

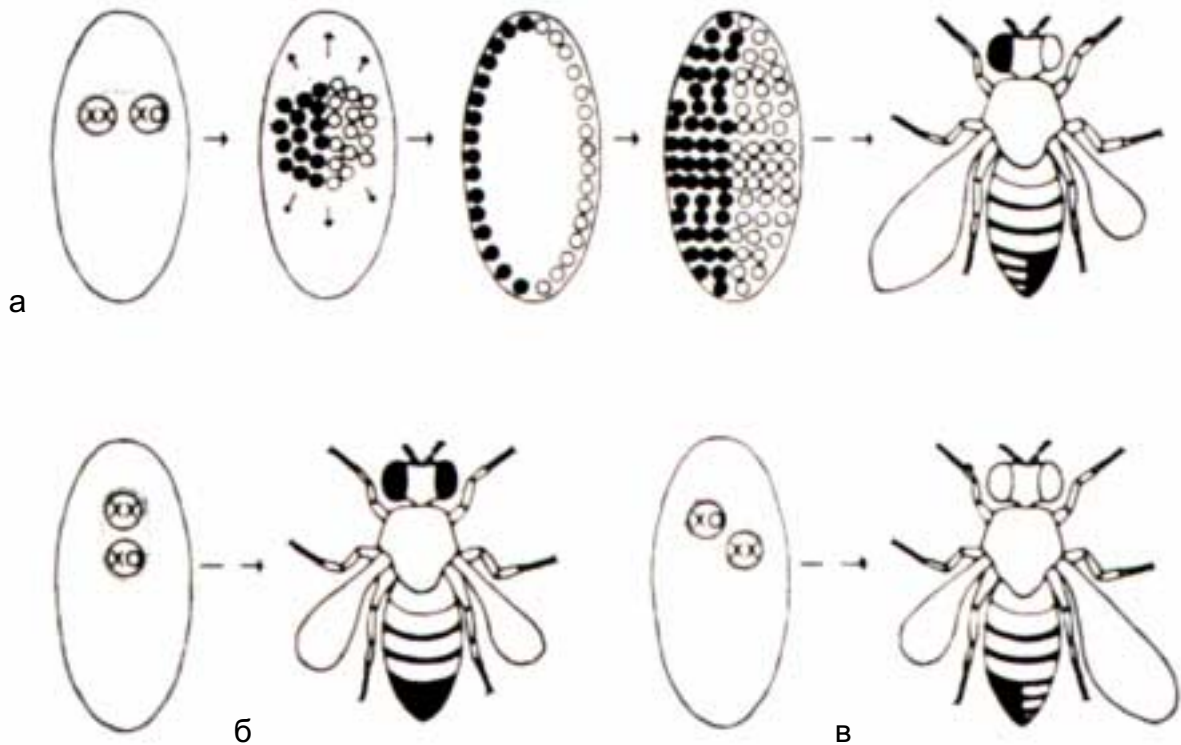


Рис.2.15. Образование гинандроморфов у *Drosophila melanogaster*. Утрата нестабильной кольцевой X-хромосомы при одном из ранних делений дробления приводит к образованию двух генотипически различных популяций ядер: XX (темные кружки) и XO (светлые кружки). Если в клеточной бластомере эти две популяции разделены по среднесагиттальной плоскости, то образуется мозаичная взрослая муха, у которой одна половина имеет мужскую, а другая - женскую морфологию. Если некольцевая X-хромосома несет рецессивные гены-маркеры, то они экспрессируются в мужской XO-половине. На это указывают укороченное крыло и белый глаз (муха в верхнем ряду). Две мухи в нижнем ряду иллюстрируют результаты утраты кольцевой X-хромосомы, за которой следует деление гинандроморфов на женскую и мужскую части либо в передне-заднем (Б), либо в косом (В) направлении (Strckberger, 1976).

хромосомы, которая определяет ее кольцевую структуру. Анализ раннего развития гетерозигот по этой мутации показал, что при первых делениях дробления эмбрионы часто теряют кольцевую X хромосому. В результате элиминации кольцевой X хромосомы у эмбриона возникает два типа ядер (а позднее и клеток), одни имеют генотип XX, тогда как другие XO, то есть такие эмбрионы мозаичны и фенотипически развиваются как гинандроморфы, тело которых представлено структурами самки и самца. Рис.2.15 иллюстрирует

схематически возможные фенотипы гинандроморфов - мозаиков. Соотношение числа клеток обеих популяций определяется стадией, на которой элиминирует кольцевая X хромосома. Если ее потеря происходит после 1-го деления дробления, то взрослая муха будет иметь примерно равное число клеток женского и мужского типов. Если же ее потеря произошла на более поздней стадии развития, то доля клеток с мужским фенотипом (и соответственно структур на теле имаго) будет меньше по

сравнению с клетками женского типа. Визуализация клеточных клонов женского и мужского типов облегчается введением мутаций. Для этой цели используют рецессивные видимые мутации, например, *yellow* или/и *white*, введенные в нормальную X хромосому. В этом случае, потеря кольцевой X хромосомы сопровождается проявлением мутантного фенотипа в клетках XO, и тем самым, появляется возможность дискриминировать “женскую” и “мужскую” популяции в развитии мозаиков (рис.2.15).

Стертевант (A.Sturtevant) был пионером использования гинандроморфов для построения карты презумптивных зачатков структур взрослой мухи путем количественной оценки частоты, с которой появляются два органа с разнополюм фенотипом. Дальнейшее развитие этот подход получил благодаря работам Антонио Гарсиа-Белидо (Antonio Gracia-Belido) и Джона Мерриама (John Merriam), которые построили детальную “карту судьбы” клеточной бластодермы, то есть установили границы презумптивных зачатков на поверхности клеточной бластодермы, из которых развиваются различные дефинитивные структуры имаго. Они ввели меру физической близости на карте бластодермы презумптивных зачатков органов имаго (рис.2.16). Например, из экспериментальных данных следует, что у 10% проанализированных гинандроморфов первая и вторая пара ног имеют разнополюм фенотип, одна мужской, а другая женский, или наоборот. На “карте судьбы” это будет

соответствовать расстоянию между зачатками для первой и второй пар ног - **10 стертам** (рис.2.16). На рис.2.17 представлены суммарные данные по картированию презумптивных зачатков имагинальных органов на поверхности бластодермы. Хорошо видно сходство с организацией имаго вдоль передне-задней оси.

В настоящее время мало что известно о природе детерминации (коммитирования). Это одна из центральных проблем биологии развития. Роль отдельных факторов в становлении детерминации выявлена в экспериментах с пересадками ядер и цитоплазмы эмбрионов и анализе развития мозаиков.

Несомненно, в некоторых случаях, в детерминации существенную роль играет ооплазма (цитоплазма яйца). В качестве иллюстрации можно привести результаты опытов по микроинъекции цитоплазмы из заднего полюса синтициальной бластодермы в дорзальную или переднюю области другого эмбриона на этой же стадии развития (рис.2.17a). Как отмечалось выше, в заднем полюсе находится полярная плазма, место закладки будущих половых клеток. Эмбрионы - доноры цитоплазмы имели два маркера, доминантные мутации *Bar* (B) и *Bar^s* (B^s), в то время как эмбрионы-реципиенты несли две рецессивные мутации *multiple wing hair* и *ebony* в гомозиготном состоянии (рис.2.17a). На стадии клеточной бластодермы клетки, образовавшиеся на месте инъекции цитоплазмы (ооплазмы), были изъяты из реципиентных эмбрионов и ретрансплантированы

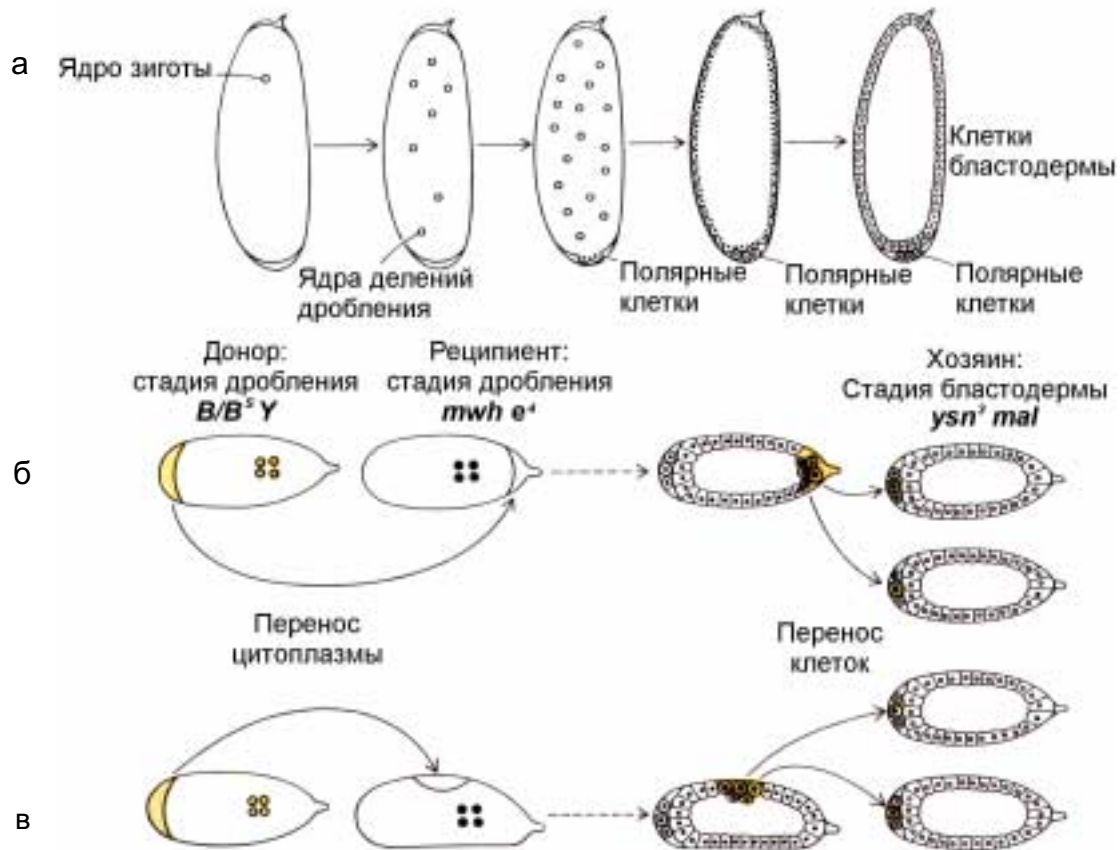


Рис. 2.17а. А. Полярные клетки в заднем полюсе эмбриона образуются до стадии клеточной бластодермы (после 10-11 деления-дробления) (Б и В). Присутствие детерминант полярных клеток в заднем полюсе эмбриона можно показать путем трансплантации ооплазмы из этой зоны в другие части зародыша, где они обычно не образуются (например, как на рисунке трансплантировать в район переднего полюса (Б), или дорзальную часть эмбриона (В)). Донором цитоплазмы (ооплазмы) были эмбрионы с X и Y хромосомами, маркированными доминантными мутациями *Var* (B и B^s). Яйца-реципиенты взяты из линии, гомозиготной по мутациям 3-й хромосомы: *multiple wing hair* (*mwh*) (множественные щетинки на крыльях) и *ebony* (*e*⁴) (черный цвет). Трансплантированная полярная ооплазма индуцирует образование полярных клеток в эктопическом месте, в переднем полюсе. Функциональную способность индуцированных полярных клеток можно выявить повторной трансплантацией этих клеток в задний полюс эмбрионов, маркированных рецессивными мутациями *yellow* (*y*) (желтый цвет тела), *singed* (*sn*³) (опаленные щетинки) и *maroonlive* (*mal*) (коричневый цвет глаз). Часть гамет, образуемых взрослыми мухами, развившимися из таких эмбрионов, несет маркеры *mwh e*⁴, а не *y sn*³ *mal*. Следовательно, индуцированные полярные клетки, генотип которых соответствует генотипу эмбрионов-реципиентов ооплазмы, являются истинными полярными клетками.

По мнению В.Фое (V.E.Foe), критическим моментом в раннем эмбриогенезе дрозофилы является асинхронность деления клеток эмбриона. Известно, что первые 13 делений дробления протекают синхронно, хотя последние 12-е и 13-е

проходят в виде “волны” вдоль передне-задней оси (рис.2.18). Затем наблюдается ярко выраженная асинхронность вхождения в 14-й митоз клеток различных частей бластодермы. Важно подчеркнуть, что происходит это за счет удлинения интерфазы. На

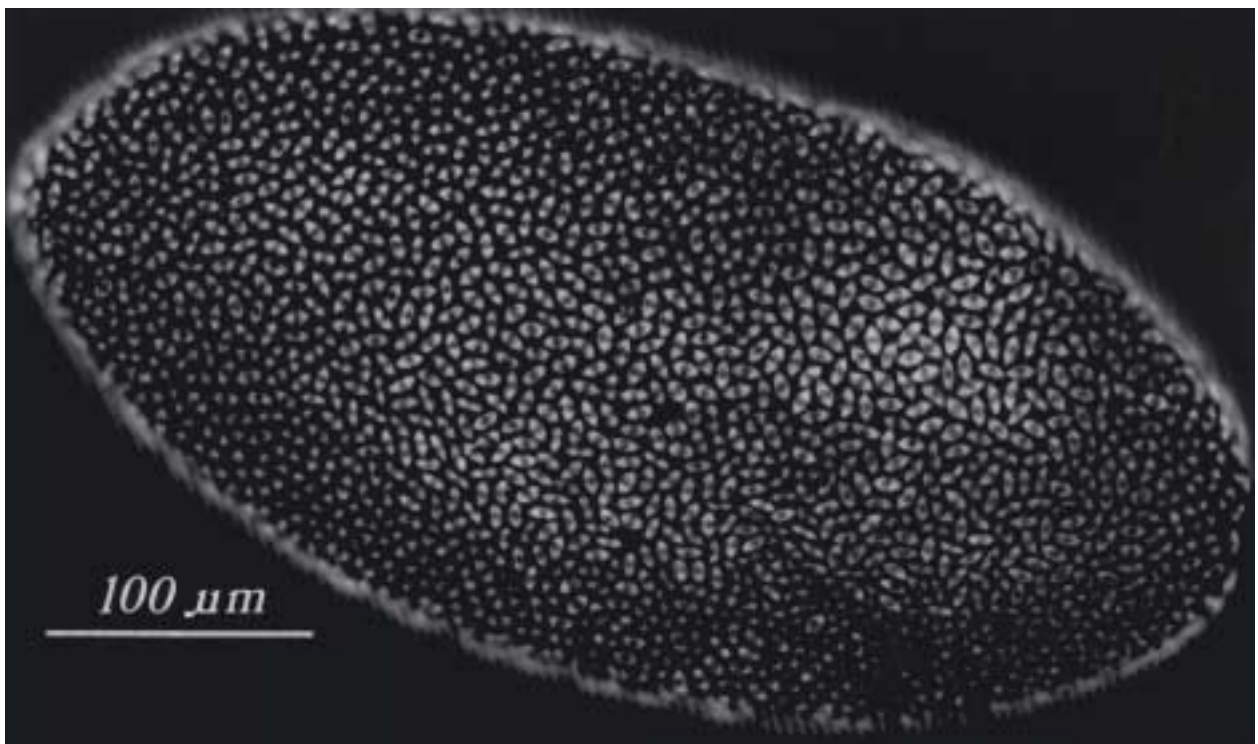


Рис. 2.18. Фиксированный эмбрион на стадии 13-ого деления, за 5 мин. до интерфазы 14-ого деления. Иммуно-флуоресцентная окраска с помощью антител против тубулина. Хорошо видно, что ядра синтициальной бластодермы делятся синхронно, все клетки находятся на стадии метафазы или начала анафазы.

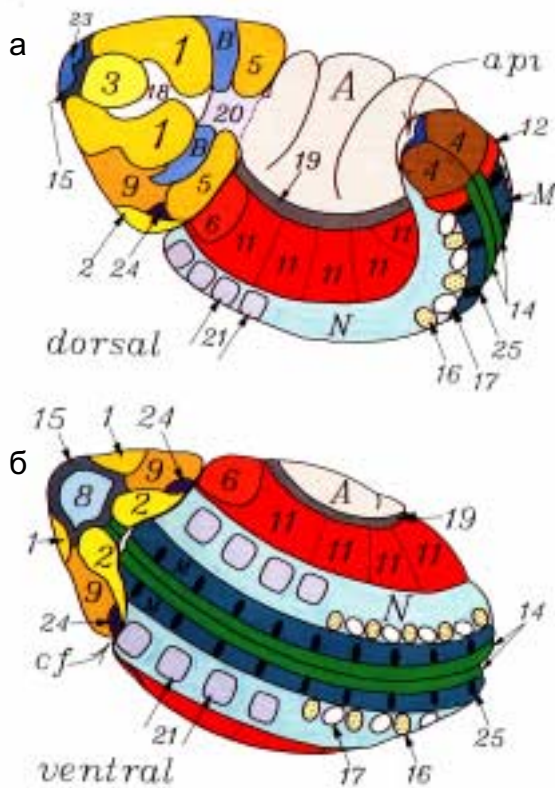


Рис.2.19. Митотические домены схематически спроецированные на эмбрион с дорзальной (А) и вентральной (Б) стороны. Головной конец слева. Различным цветом окрашены митотические домены. Цифры обозначают домены с синхронно делящимися клетками в соответствии с порядком вхождения их в митоз. N и M выделены домены, в которых клетки делятся менее синхронно, чем в пронумерованных доменах. А и В отмечены два домена, в которых клетки не делятся.

рис.2.19 показаны районы бластодермы, названные Фое “митотическими доменами”, в которых

14-й митоз протекает синхронно. Ею идентифицировано 25 таких доменов. На рис.2.20 показано время вступления каждого домена в 14-й митоз. Рис.2.21 иллюстрирует асинхронность деления в разных районах бластодермы и одновременно четкую синхронность внутри каждого домена. Более того, как видно из рис.2.22 в каждом домене можно наблюдать определенную ориентацию

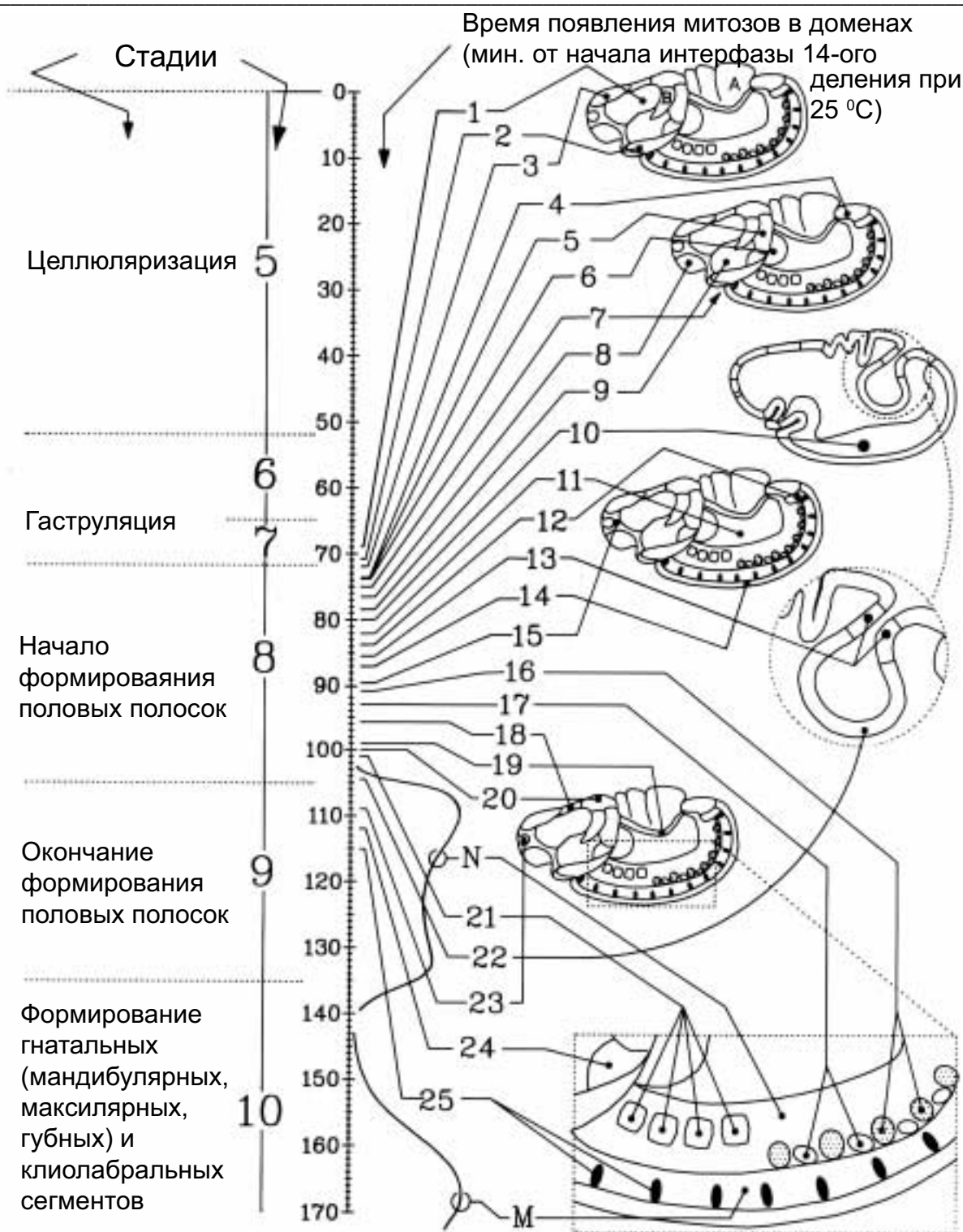


Рис.2.20. Графическое изображение разных стадий эмбриогенеза дрозофилы (слева указаны стадии с 5-ой по 10-ую и основные морфологические изменения, связанные с ними; справа схематически показаны эмбрионы в различных проекциях на этих стадиях) и «время появления митозов в митотических доменах» (временная шкала в центре дана в минутах от начала интерфазы 14-ого цикла деления). От временной шкалы проведены линии (с номером домена) к конкретному «митотическому домену» на поверхности эмбриона (по Фое, 1989)

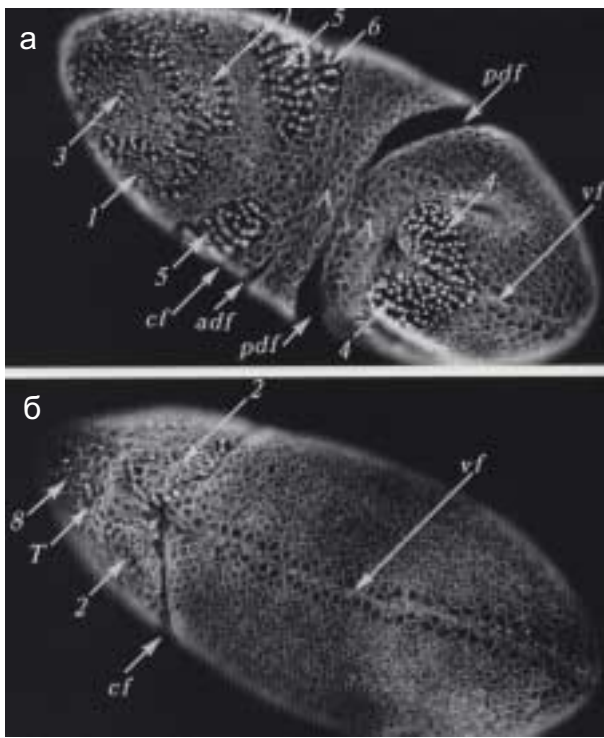


Рис 2.21. Вид эмбриона с дорзальной (А), вентральной (Б) сторон на 75-ой мин. начала интерфазы 14-ого деления. Большинство клеток домена 2 находятся на стадии телофазы, как и клетки в центре доменов 1 и 3. Клетки доменов 4,5,6 входят в метафазу, а небольшое число клеток доменов 8 и 9 находятся в профазе. Cf - цефалическая складка, pdf - задняя дорзальная складка, pc - полярные клетки, ar1 - амниопрктодеальная инвагинация.

экваториальных пластинок относительно передне-задней оси эмбриона. Учитывая, что асинхронность деления клеток бластодермы совпадает во времени с целлюляризацией и утратой клетками тотипотентности, М.Фое полагает, что эти явления каким-то образом взаимосвязаны. Даже при беглом взгляде, расположение “митотических доменов” на поверхности бластодермы удивительным образом совпадает с ее сегментацией и расположением зачатков будущих дефинитивных структур личинки и имаго. Более того, именно в этот период наблюдается

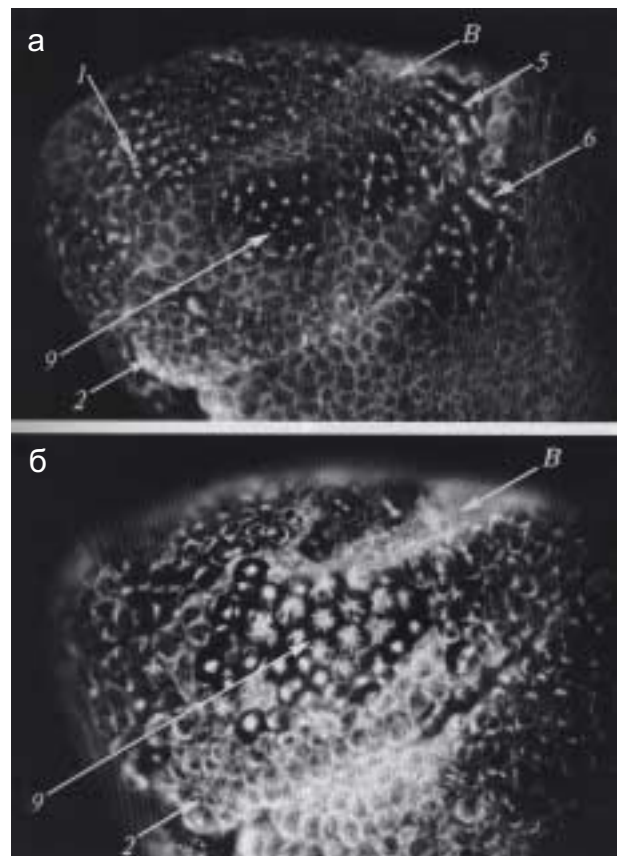


Рис.2.22. Радиально-расположенные митозы в домене 9 на 75 мин. (А) и 85 мин (Б) вхождения в 14-е деление. А - клетки в центре домена 9 входят в профазу. В - большинство клеток в анафазе. Анафазные клетки ориентированы под прямым углом к клеткам прилежащих доменов (сравни домен 9 в Б с доменами 5, 6 в А). Клетки домена 2 уже поделились. Клетки домена В неделиющиеся.

активация многих зиготических генов, что контрастирует с предшествующим периодом, когда имеет место экспрессия единичных зиготических генов. Само по себе представление о связи репликации и генной экспрессии не ново, тогда как постулируемая связь утраты тотипотентности (коммитирование) и репликации не имеет еще надежного экспериментального обоснования, и требуются дополнительные исследования, чтобы внести ясность в решение этом интересном вопросе.

Как отмечалось выше, на

личиночной стадии развития имагинальные диски представлены недифференцированными клетками, которые предетерминированы дать начало тем или иным структурам взрослой мухи. В настоящее время мало что известно о ранних этапах формирования имагинальных дисков. На стадии личинки I-го возраста клетки

очень сложным морфологическим структурам имаго (ноги, крылья, различные части головы и т.д.), которые состоят из разного типа тканей и дифференцированных клеток - производных 2-х или 3-х зародышевых листков. Опыты по трансплантации разных частей одного диска или по локальному разрушению его клеток (с

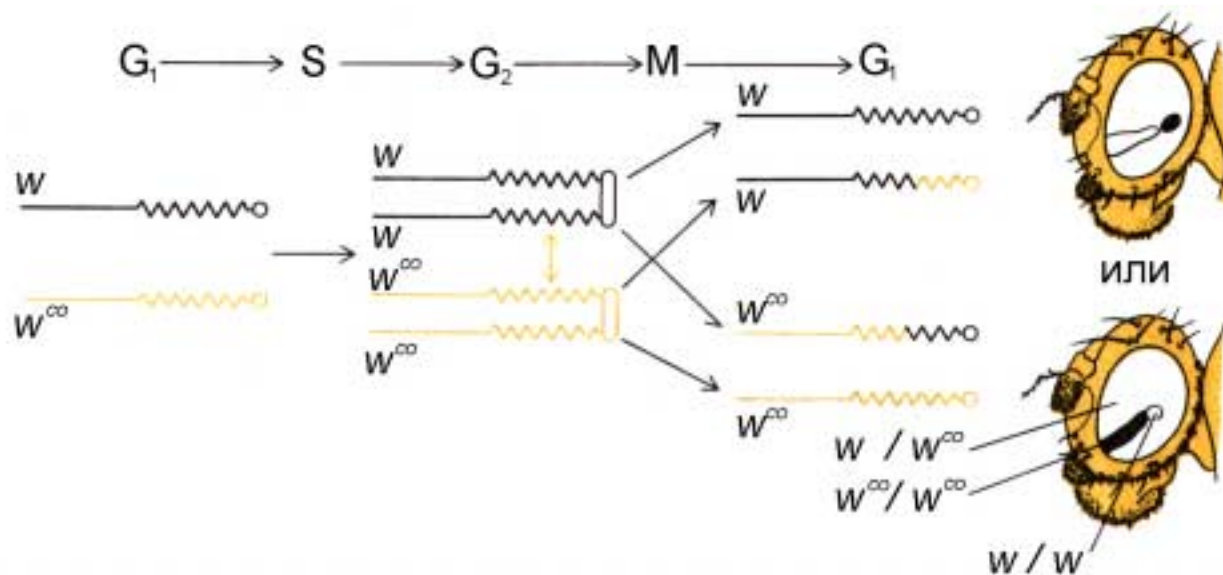


Рис.2.23. Митотическая рекомбинация в X-хромосоме *D. melanogaster*. Когда митотическая рекомбинация происходит в клетке глазного имагинального диска, нормальное расхождение хромосом в митозе приводит к развитию глаза с «парными пятнами». Аллели *w* и *w^{co}* принадлежат локусу *white*; глаза особи *w/w^{co}* имеют темно-красный цвет. Заметные различия в форме и размере пятен в задней и передней частях глаза свидетельствуют о влиянии положения клеток на их пролиферацию в процессе развития.

имагинальных дисков имеют сходную морфологию, и даже применение электронной микроскопии не позволяет выявить каких-либо морфологических признаков, позволивших бы дискриминировать разные части или индивидуальные клетки индивидуального диска. Несмотря на внешнее сходство клеток имагинальных дисков, пути их дифференцировки существенно различаются. В какой-то мере это можно было ожидать, поскольку индивидуальные диски дают начало

помощью тонкого пучка ультрафиолетового света) показали, что в первом случае зачастую из разных фрагментов одного диска развиваются разные структуры имаго и, следовательно, разные части одного диска имеют разные потенциалы развития. Во втором случае локальное разрушение клеток в одном диске приводило к тому, что у имаго не развивалась та или иная часть органа.

Сходные результаты были получены при анализе развития мозаичных эмбрионов, у которых была

индуцирована соматическая рекомбинация с помощью рентгеновского облучения. На рис.2.23 показана схема эксперимента по получения химерных мух посредством индукции соматической рекомбинации в X-хромосоме в глазном имагинальном диске. Эмбрионы гетерозиготные, например, по мутациям white (белые глаза) и white^{co} (кобальтовые глаза) были подвергнуты рентгеновскому облучению на личиночной стадии. В результате соматической рекомбинации (происходит в G₂) возникают 2 клон клеток гомозиготные по гену w и w^{co}, и как следствие у взрослой мухи возникают “парные пятна” белые и кобальтовые на темно-красном фоне окраски глаза. Размеры пятен зависят от стадии развития, на которой произошла рекомбинация; чем раньше произошло это событие, тем больше будут размеры пятен (клонов). Поскольку соматическая рекомбинация - событие редкое, то можно сделать вывод, что наблюдаемые “парные” пятна происходят из единственной презумптивной клетки. Анализ распределения “парных пятен” позволил сделать вывод, что глазоантенный диск представлен смесью клеток, которые предерминированы к дифференцировке в различные типы клеток и тканей, в частности, глаза и антенны развиваются из разных клеток этого диска.

Существует и другой экспериментальный подход, позволяющий выявить гетерогенность клеток как внутри индивидуального диска, так и между клетками,

принадлежащими к разным дискам. Метод заключается в смешивании в суспензии, например, клеток разных имагинальных дисков, предварительно меченых флюоресцентными красителями. Эти эксперименты показали, что клетки, принадлежащие к одному диску легко распознают друг друга и образуют ассоциации (агрегаты), не смешиваясь с клетками другого диска. Сходные результаты были получены в опытах по микроинъекциям красителей в клетки внешнего слоя диска. В этом случае краситель распределяется только среди клеток поверхностного слоя диска и не проникает в клетки, расположенные внутри диска. Результаты этих опытов показывают, что между клетками индивидуального диска существуют тесные контакты.

В настоящее время многие полагают, что специализация клеток внутри индивидуального диска происходит по типу прогрессирующей **компарментализации, формирования поликлонов**. На рис.2.24 схематически показана компарментализация разных частей презумптивного зачатка 2-го торакального сегмента, из которого разовьются вторая пара ног, крылья и структуры среднегруди. Согласно этой схеме, первоначально однородная группа клеток подразделяется на две группы вдоль передне-задней оси - поликлоны А и Р. Затем происходит сегрегация поликлонов, которые дадут начало развитию ног и крыльев. Далее, в каждом из дисков происходит компарментализация и выделение поликлонов вдоль дорзально-вентральной оси и, наконец, клетки

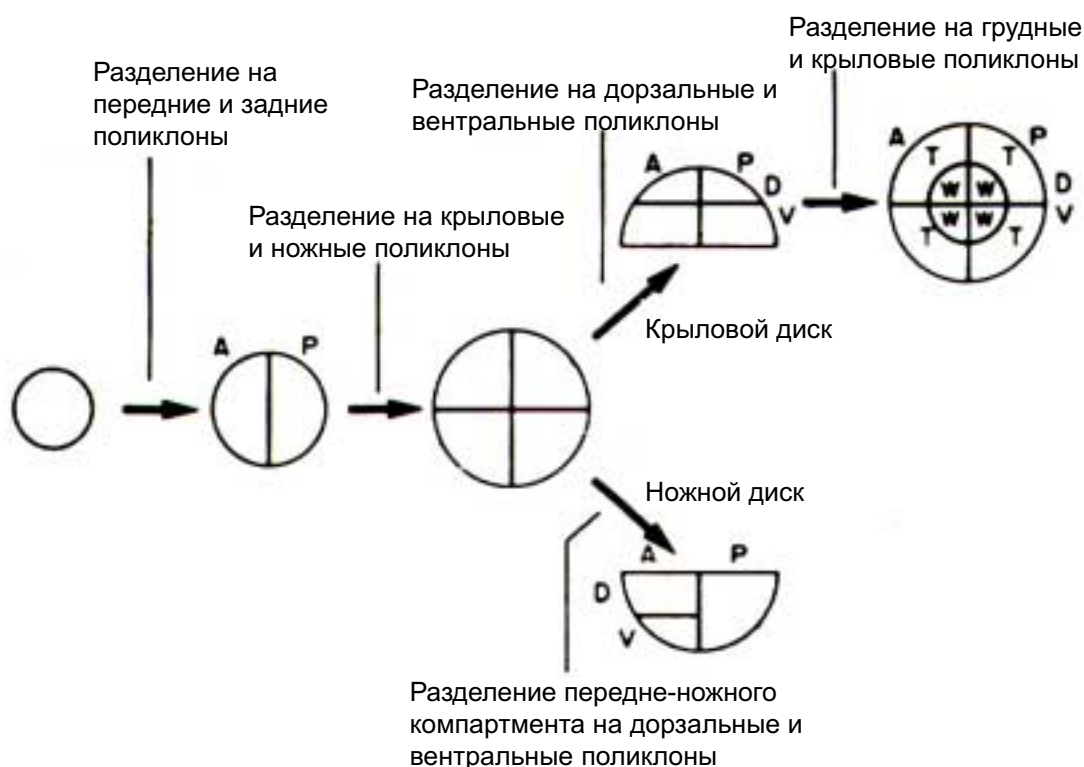


Рис.2.24. Способ компартиментализации структур среднегруды у *D. melanogaster* (данные Morata и Laurence, 1977). А - передняя часть; Р - задняя часть; D - дорзальная сторона; V - вентральная сторона; Т - грудь; W - крыловая пластинка.

внешнего и внутреннего слоев в крыловом диске становятся различным образом преддетерминированными, в результате чего они дают начало развитию различных частей среднегруды: хитиновой структуры самой среднегруды, крыльев и более мелких структур таких как щетинки или ворсинки. В ходе компартиментализации потенциалы индивидуальных компартментов (поликлонов) снижаются, происходит прогрессивное ограничение их возможностей давать развитие структуры как целого (среднегруды, ног и крыльев). Иными словами, в однородной первоначально группе клеток - предшественников (презюмтивных клеток) происходит формирование разных клонов клеток, преддетерминированных к развитию

какой-то частной структуры, и происходит это поэтапно путем увеличения числа этих компартментов (поликлонов).

В связи с явлением ранней детерминации презюмтивных клеток бластодермы и в последующем клеток имагинальных дисков, возникает вопрос: насколько стабильна детерминация в ходе пролиферации клеток-предшественников? Способна ли запрограммированная клетка, присущее ей уникальное состояние детерминации, передать в дочерние клетки? Выше был описан прием культивирования клеток в брюшке взрослой самки. Такой способ культивирования *in vivo* (в брюшке имаго) обеспечивает условия для пролиферации клеток, но при этом дифференцировка не происходит.

Дифференцировка таких клеток легко индуцируется переносом клеток в метаморфизирующую личинку. Опыты по длительному культивированию клеток генитального диска в брюшке имаго показали, что несмотря на многолетнее их культивирование (более 70 пассажей), как только такие клетки были трансплантированы личинкам входящим в метаморфоз, наблюдалась дифференцировка клеток в точном соответствии с их программой, детерминацией, давая начало развитию анальной пластинки, половым придаткам, семеизвергательному каналу или половым железам. Тем не менее, иногда наследование такой детерминации утрачивается в ходе культивирования. Например, часть клеток зачатка анальной пластинки может дать начало развитию ноги, антенне или глазу. Иными словами, презумптивные клетки генитального диска дифференцируются в структуры, которые в нормальных условиях развиваются из других имагинальных дисков. Такое явление получило название **трансдетерминации**. По своей сути, трансдетерминация означает смену программы развития, смену детерминации. Важно при этом отметить, что это не хаотическое случайное отклонение от первоначальной детерминации, а своего рода переключение на другую, альтернативную программу развития, свойственную в норме другой группе презумптивных клеток. **Единственное условие для нового раунда трансдетерминации - необходимость перманентной пролиферации**

клеток. Естественно, встает вопрос, возникают ли трансдетерминированные клетки в самом тестируемом пересаженном имагинальном диске, или же это клетки, которые мигрируют в него из реципиентного организма? Для того, чтобы дискриминировать клетки собственно имагинального диска от клеток реципиента, достаточно использовать генетические маркеры. Например, имагинальный диск взят от личинки, имеющей генотип *ebony*, а реципиент несет другую мутацию - *yellow*. В этом случае, все клетки дисков реципиента дифференцируются в желтые хитиновые структуры, тогда как клетки тестируемого диска формируют черные структуры и, таким образом, не представляет большого труда идентифицировать дериваты имагинальных дисков реципиента и тестируемого имагинального диска. Сложнее исключить возможность примеси клеток других имагинальных дисков при трансплантации клеток тестируемого диска. Тем не менее использование маркирования клеток с помощью соматического кроссинговера позволяет надежно дискриминировать контаминацию клетками других дисков от трансдетерминации, произошедшей в клетках тестируемого диска. В качестве примера можно разобрать результаты экспериментов с культивированием глазо-антенного диска. Донорами тестируемого имагинального диска были двойные гетерозиготы по генам *singed* и *yellow*. Личинки были подвергнуты рентгеновскому облучению, которое индуцировало соматический

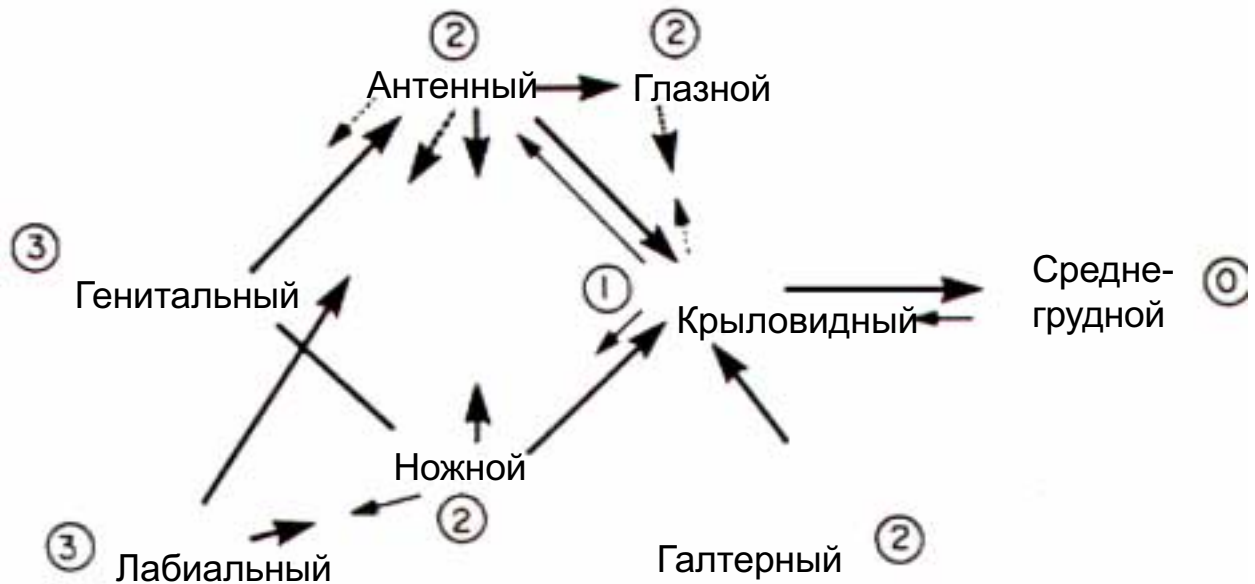


Рис.2.25. Пути трансдетерминации у дрозофилы. Длина стрелок пропорциональна частоте трансдетерминации. Стрелки, изображенные точками, указывают либо на исключительную редкость такого события, либо недостаточную доказанность. Цифры в кружочках показывают минимум шагов (этапов), необходимых, чтобы данный иммагинальный диск развился по типу среднегрудного (по Hadorn, 1978).

кроссинговер, в результате чего возникли клетки двойные гомозиготы по мутантным генам и двойные гомозиготы по аллелям дикого типа. Потомки таких клеток после дифференцировки были легко узнаваемы по цвету и форме щетинок. Соматический кроссинговер - явление редкое, сравнимое с частотой мутации. Из меченных таким образом клеток глазо-антенного диска при трансплантации *in vivo* развивались как нормальные, так и трансдетерминированные структуры (ноги, щупики и т.д.). Это исключает возможность примеси клеток из других иммагинальных дисков.

Изменение программы развития, трансдетерминация, в свою очередь достаточно стабильно передается в клеточных поколениях до следующего акта трансдетерминации. Таким образом, на вопрос «какова стабильность состояния

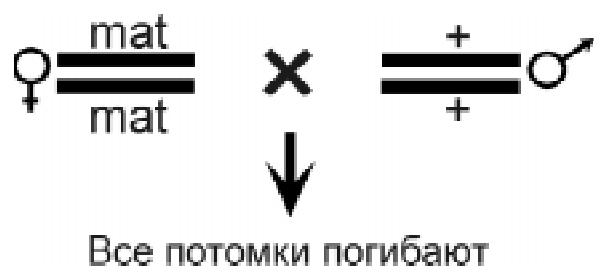
детерминации?» можно ответить, что это состояние исключительно стабильно, но не абсолютно. С частотой не намного выше чем мутационная, возможна смена детерминации на один из альтернативных путей дифференцировки.

Многочисленные эксперименты по трансдетерминации выявили также интересный феномен, который можно определить как **канализированность процесса трансдетерминации**. На рис.2.25 схематически показаны «пути трансдетерминации», то есть изменения программы развития иммагинальных дисков. Из рис.2.25 следует, что, например, генитальный диск может развиваться по типу глазо-антенного или ножного, но в то же время оба последних диска никогда не трансдетерминируют в генитальный. Иная ситуация складывается при трансдетерминации крылового диска.

Из рис.2.25 видно, что его клетки способны иногда развиваться в среднегрудь, тогда как обратный процесс происходит значительно реже. С другой стороны, клетки ножного и галтерного дисков способны к трансдетерминации по пути крылового диска, тогда как крыловой диск редко развивается по типу ножного и никогда - по типу галтерного. Согласно рис.2.25, необходимо несколько актов трансдетерминации, чтобы генитальный диск приобрел способность развиваться по типу среднегрудного. Такой путь включает 3 акта трансдетерминации, причем в определенной последовательности: первый акт трансдетерминации по пути антенного, затем крылового и, наконец, среднегрудного диска. Иными словами, **именно канализация трансдетерминации** в этом случае исключает “прямую” трансдетерминацию генитального диска в среднегрудной.

2.2. ГЕННЫЙ КОНТРОЛЬ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ.

Одним из подходов к поиску и идентификации генов, контролирующих развитие, является



анализ мутаций. Изучение 450 летальных мутаций, сцепленных с полом, показало, что остановка развития наблюдалась в 22% случаев на эмбриональной стадии, в 52% - на личиночной стадии и в 26% - на стадии куколки. Другая важная характеристика этих изученных мутаций связана с особенностями их наследования; более двух третей мутаций проявляли материнский эффект. Принципиальная схема выявления материнского эффекта любой мутации связана с 2-мя типами скрещиваний (рис.2.26).

Фенотипическое проявление мутаций материнских генов выражается в **женской стерильности (female sterile)**, то есть они не имеют какого-либо эффекта на мать, но необходимы для развития потомков, эмбрионов. Самки, несущие такие мутации, нормально откладывают яйца, но эмбрионы погибают на ранних стадиях развития. Общим свойством всех материнских генов является то, что они экспрессируются **перед оплодотворением**, хотя их продукты могут действовать как в ходе овогенеза, так и после оплодотворения, благодаря тому, что они могут сохраняться длительное время в цитоплазме и тем самым оказывать свое действие много

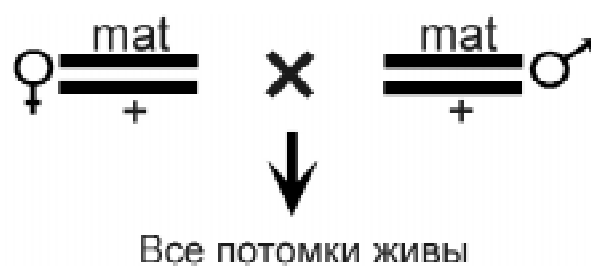


Рис.2.26. Передача летальной мутации, наследуемой по материнскому типу. Гомозиготность по гену *mat* (*mat/mat*) сама по себе не летальна, если материнская особь была гетерозиготна по этому гену (*mat/+*). Если же материнская особь была гомозиготна (*mat/mat*), то все потомки гибнут независимо от их генотипа.

позднее. Согласно Lewin (1994), гены с материнским эффектом делятся на **2 класса** в зависимости от места их экспрессии: гены, которые экспрессируются в соматических клетках матери, но имеют эффект на развитие яйца, называются **материнскими соматическими генами (“maternal somatic genes”)**, тогда как гены, которые экспрессируются в клетках зародышевого пути, называются **материнскими генами зародышевого пути (“maternal germline genes”)**. Первая группа генов экспрессируется в фолликулярных клетках (типичные соматические клетки) и принимает участие в формировании дорзально-вентральной оси эмбриона (см. ниже). Вторая группа генов активна в созревающем ооците или питающих клетках (клетки имеющие общее происхождение из презумптивного зачатка половых клеток, см. выше) и ответственна, в частности, за формирование передне-задней оси эмбриона.

В настоящее время все гены, контролирующие развитие дрозофилы, принято делить на 3 группы по их фенотипическому эффекту на развитие:

- 1. гены материнского эффекта или материнские гены**, главная функция которых контроль формирования полярности яйца (позиционной информации) и становление его пространственных координат;
- 2. гены сегментации**, которые определяют число и полярность сегментов эмбриона путем прочитывания позиционной информации и перевода ее в специфический паттерн сегментации;

3. гомеозисные гены, которые определяют сущность сегментов, характер и направление их дифференцировки.

2.2.1. Характеристика материнских генов.

Первая пространственная координата яйца, передне-задняя ось, формируется в процессе овогенеза путем поляризации цитоплазмы. Предполагается, что около 30 генов принимают участие в ее становлении. Следует иметь в виду, что индивидуальный вклад этих генов этот процесс различен, и потому ниже будут рассмотрены эффекты наиболее важных генов, ответственных за становление этой позиционной информации.

В настоящее время установлено, что **ген bicoid (bcd) играет решающую роль в формировании переднего полюса яйца и, тем самым, передне-задней оси**, что, в свою очередь, определяет развитие передних структур личинки и имаго - головы и груди. Мутации гена bicoid имеют летальный эффект, остановка развития происходит на стадии личинки. Морфологически мутантные личинки выглядят как симметричное образование, у которого передняя и задняя части представлены только абдоминальными сегментами с 5-го по 8-й, расположенными как зеркальное отображение. Мутантные личинки лишены головы и груди, а все органы, развивающиеся из задних абдоминальных сегментов, дублированы. Видимые отклонения от нормального развития у мутантных

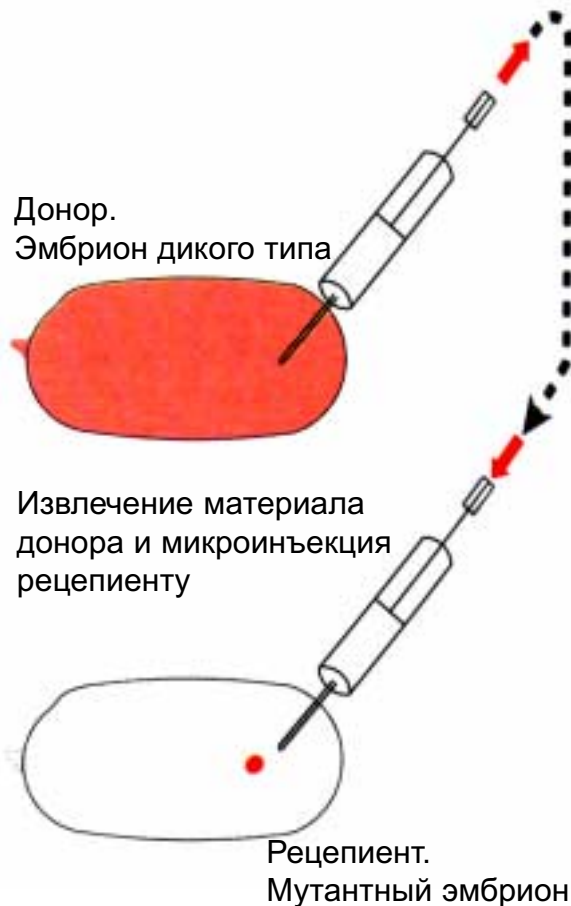


Рис.2.27. Коррекция мутантного фенотипа может быть осуществлена с помощью инъекции цитоплазмы, взятой от эмбрионов дикого типа.

эмбрионов начинаются со стадии гаструляции, когда наблюдается впячивание первичной кишки не только в задней части эмбриона, но и в передней. Важно отметить, что возможна коррекция мутантного фенотипа с помощью микроинъекций цитоплазмы, взятой из переднего полюса яйцеклеток дикого типа. Такая микроинъекция цитоплазмы в область переднего полюса мутантных яйцеклеток обеспечивает нормальное развитие мутантных эмбрионов. Схема такого эксперимента представлена на рис.2.27. Важно и то, что инъекции цитоплазмы, взятой из других частей цитоплазмы нормальных яиц, не вызывают коррекции развития

мутантов по гену *bicoid*. Эти данные показывают, что существует градиент этого морфогена в цитоплазме яйца с наивысшей его концентрацией в переднем полюсе. Под термином **“морфоген”** понимается такая **субстанция, локальная концентрация которой определяет судьбу или направление развития расположенных рядом с ним районов.**

Ген *bicoid* экспрессируется в ходе овогенеза в питающих клетках и затем его первичные транскрипты поступают в передний полюс яйца, в зону контакта питающих клеток и созревающего ооцита. Такой контакт питающих клеток с передним полюсом яйца предопределяет направление транспорта первичных транскриптов гена *bcd* непосредственно в передний полюс. В пользу такого предположения говорит тот факт, что мутантные яйца по гену *dicerphalic* имеют два микропиля, один в переднем конце, а другой в заднем, то есть наблюдается дупликация передних структур. При мутации *dicerphalic* питающие клетки разделяются на две группы и располагаются у обоих полюсов созревающего ооцита, тем самым создаются условия для транспорта транскриптов гена *bcd* в оба полюса яйца. Эффект мутации сравним с описанным выше эффектом микроинъекций цитоплазмы из переднего полюса в район заднего полюса, что индуцирует образование передних структур.

При нормальном развитии иРНК гена *bicoid* “заякоривается” на эндоплазматическом ретикулуме только в переднем полюсе. На рис.2.28

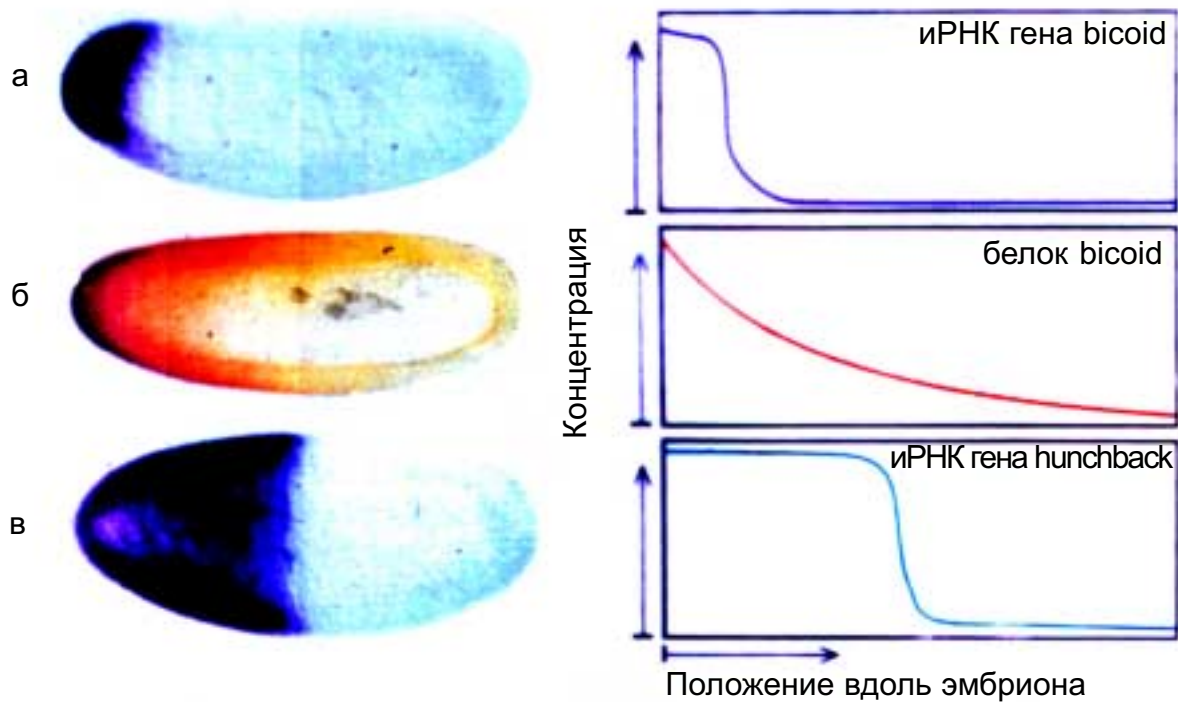


Рис.2.28. В только что отложенном яйце дрозофилы транскрипты гена *bicoid* находятся в переднем полюсе (А, слева). Через 2 часа после оплодотворения белок *bicoid* создает градиент в передне-заднем направлении (Б, слева). Белок *bicoid* только при определенной пороговой концентрации способен активировать ген *hunchback*, и потому ген *hunchback* активен только в половине эмбриона, прилежащей к переднему полюсу (В). Справа графическое изображение градиентов иРНК и белка *bicoid* и гена *hunchback*.

показаны результаты экспериментов по *in situ* гибридизации специфического зонда с иРНК гена *bicoid* в зрелой яйцеклетке. Хорошо видно, что транскрипты этого гена локализируются в очень узкой зоне переднего полюса. Предполагается, что такое локальное “заякоривание” осуществляется благодаря специфическому связыванию с белком, кодируемым геном *swallow* (*swa*). Мутации гена *swa* вызывают изменение локализации транскриптов гена *bcd*, так что зона их распределения выходит за пределы переднего полюса (рис.2.29). В настоящее время идентифицировано по-меньшей мере еще 2 гена, ответственных за транспорт и правильную локализацию первичных транскриптов гена *bcd*. На рис. 2.29

показаны эффекты мутаций трех генов: *exuperantia*, *swallow*, *staufen* на распределение транскриптов гена *bcd* в цитоплазме яйца дрозофилы. По-видимому 3' нетранслируемый район транскрипта гена *bicoid* также ответствен за специфическое “заякоривание” продукта этого гена в переднем полюсе.

Трансляция иРНК гена *bicoid* начинается вскоре после оплодотворения. Одновременно формируется градиент концентрации белка *bicoid* в передне-заднем направлении. На рис.2.28 показано распределение этого белка в цитоплазме яйца после 7-го деления дробления, и он сохраняется до стадии синтициальной бластодермы. На параметры градиента влияет число

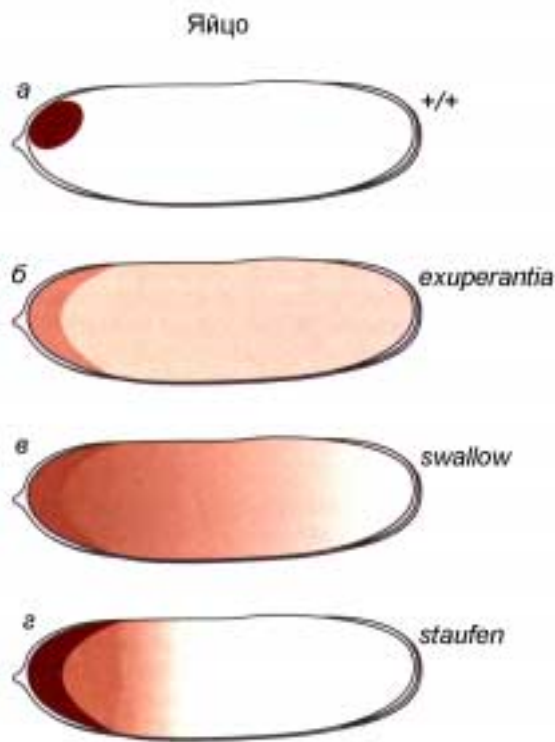


Рис.2.29. Схематическое изображение распределения первичных транскриптов гена *bicoid* в нормальном яйце (а), и мутантах по генам *exuperantia* (б), *swallow* (в) и *staufer* (г). Передний полюс слева, а задний справа.

копий гена *bcd*; увеличение числа копий повышает градиент (он становится круче) и вызывает расширение зоны формирования передних сегментов и, наоборот, снижение числа копий ослабляет его, что сопровождается увеличением зоны постериорных сегментов в переднем направлении. Таким образом, белок *bicoid* ведет себя как типичный морфоген, который в зависимости от его концентрации определяет формирование морфологических структур вдоль передне-задней оси.

Важным свойством белка *bicoid* является его способность связываться с ДНК, то есть это ядерный белок, который опознает специфические последовательности ДНК и связывается с ними. Ген *bcd* содержит

гомеобокс-содержащую последовательность сходную с таковой гена *paired* (*prd*) (ген *prd* принадлежит к группе генов сегментации). Более подробно регулирующая функция гена *bicoid* как транскрипционного фактора будет рассмотрена ниже.

За формирование заднего полюса эмбриона ответственна довольно большая группа генов (не менее 10), однако, продукты лишь некоторых из них обладают морфогенными свойствами. Мутации всех генов “задней группы” имеют сходство в своем фенотическом проявлении; мутации этих генов нарушают развитие структур из абдоминальных сегментов при абсолютно нормальном развитии головных и торакальных сегментов. Иными словами, эффект мутаций этих генов явно противоположен действию генов *bcd*, *swa* и *exu*, контролирующих становление переднего полюса.

Несомненно, ген *nanos* один из ключевых материнских генов, ответственных за формирование задней координаты яйца. Он экспрессируется в питающих клетках, а затем его иРНК транспортируется в задний полюс яйца, проходя через всю цитоплазму яйца в передне-заднем направлении. Транскрипты гена *nanos* локализуются исключительно в заднем полюсе яйца и у эмбрионов на ранних стадиях развития (рис.2.30). Трансляция иРНК гена *nanos* начинается вскоре после оплодотворения, и синтезированный белок, диффундируя, все же остается в пределах задней части эмбриона с наивысшей концентрацией в области локализации иРНК (рис.2.30).

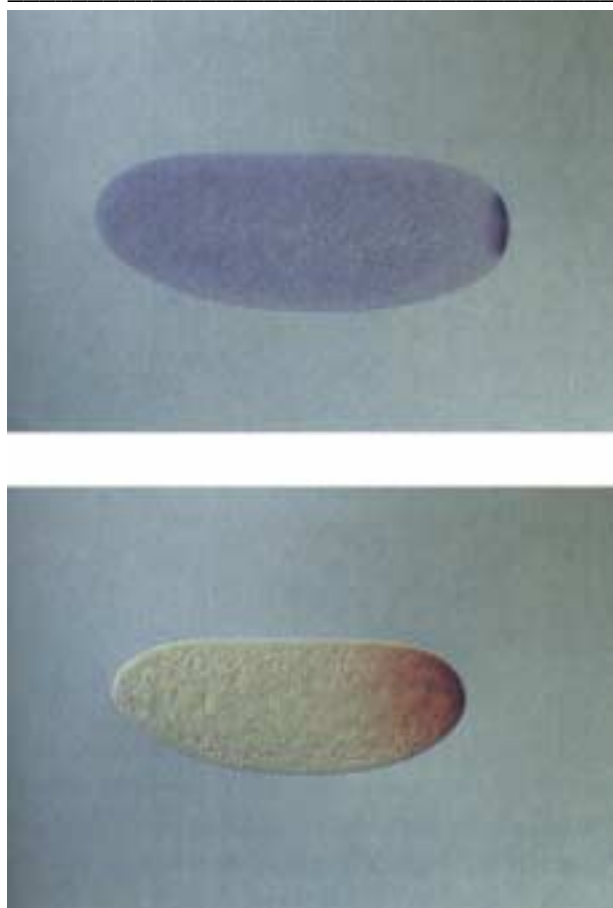


Рис.2.30. Первичные транскрипты гена *panos*, они локализируются в заднем полюсе эмбриона. Верхний рисунок показывает распределение транскриптов методом гибридизации *in situ* у эмбриона на стадии 3-го деления-дробления. На нижнем рисунке показано распределение белка (с помощью меченых антител) *panos* у эмбриона после 8-го деления дробления.

Имеются бесспорные экспериментальные данные, позволяющие сделать вывод, **что белок *panos* является истинным морфогеном.** Это следует из опытов по инъекции цитоплазмы из заднего полюса нормальных яиц в цитоплазму задней части мутантных эмбрионов. В этих экспериментах наблюдалось нормальное развитие мутантных эмбрионов, причем не только по гену *panos*, но и другим генам, контролирующим образование абдоминальных сегментов. Более того,

коррекция мутаций имеет место несмотря на то, что донорами цитоплазмы были мутантные эмбрионы (например, по гену *rumilio*), за исключением мутантов по самому гену *panos*. Эти данные можно интерпретировать как то, что другие гены играют второстепенную роль в формировании заднего полюса, возможно участвуя лишь в регуляции транспорта или “заякоривания” продуктов гена *panos*. Такая функция приписывается гену *rumilio*. Морфогенная активность иРНК гена *panos* была показана в опытах по ее микроинъекции в другие участки цитоплазмы яйца. Такие инъекции индуцировали образование абдоминальных структур в эктопических местах личинки.

В отличие от переднего полюса, который содержит единственный морфоген *bicoid*, в заднем полюсе присутствует, по меньшей мере, два; один - упомянутый выше *panos*, ответственный за контроль развития абдоминальных структур, и второй (до сих пор неидентифицированный)-ответственный за развитие полярных клеток, дающих начало развитию гонад. Мутации генов *saruccino*, *spire*, *staufer*, *oscar*, *vasa*, *valois* и *tudor* нарушают развитие как абдоминальных структур, так и формирование полярных клеток, тогда как *panos* и *rumilio* - только абдоминальных структур. Многие исследователи полагают, что при формировании полярных клеток происходят последовательные взаимодействия между этими генами (рис.2.31). Так, например, активность генов *spire* и *saruccino* необходима,

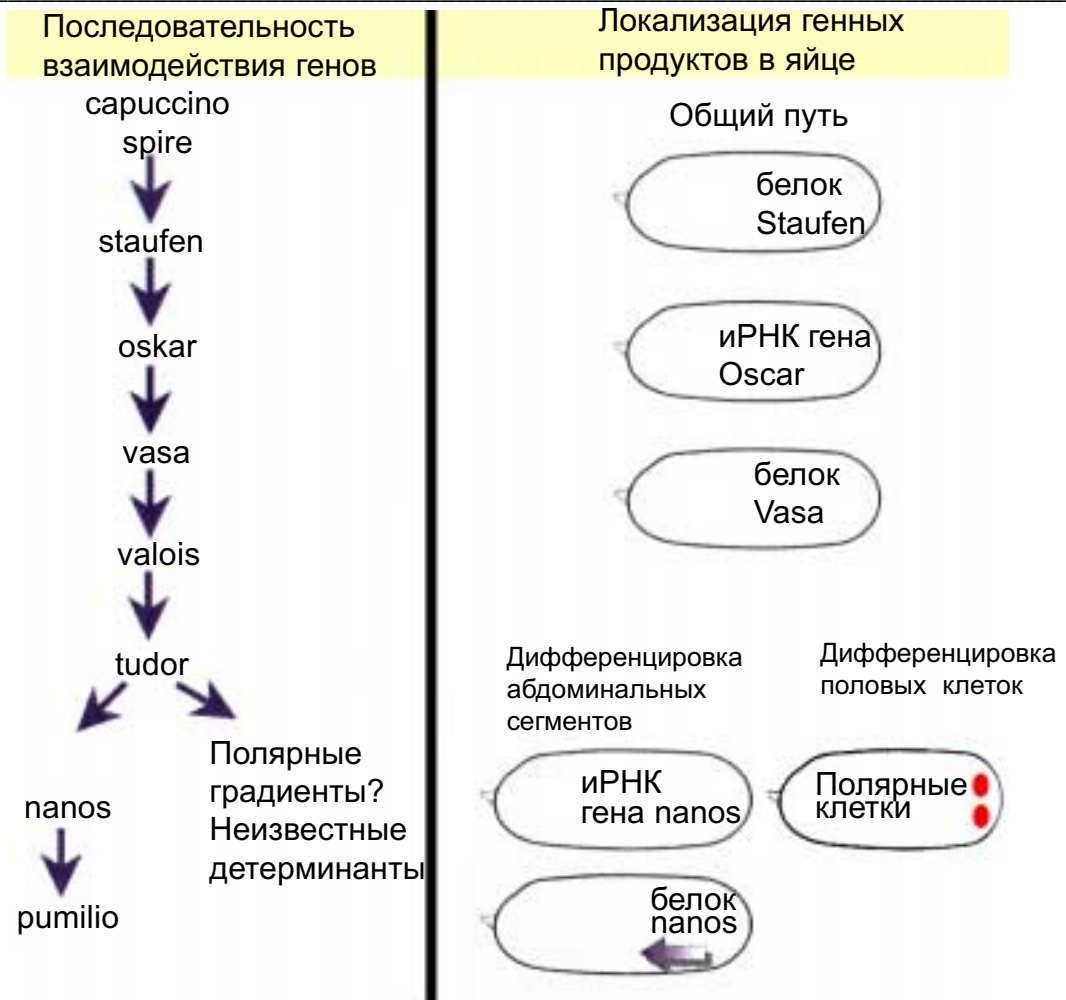


Рис.2.31. Схема взаимодействия генов, формирующих задний полюс, на основе которого в дальнейшем развиваются абдоминальные структуры и гонады имаго.

чтобы локализация белка Staufen (продукт гена *staufen*) была только в заднем полюсе. В свою очередь Staufen белок контролирует локализацию иРНК гена *oskar*, как предполагается через образование комплекса белка Staufen с иРНК гена *oskar*, образование которого происходит при участии гена *vasa*. Ген *vasa* кодирует РНК-связывающий белок. В случае избыточной экспрессии гена *oskar* или локализации его иРНК вне заднего полюса, наблюдается эктопическое образование полового зачатка. Однако при этом необходима активность генов *vasa* и *tudor* (рис.2.31). Это предполагает, что гены *caruccino*, *spire* и *staufen* определяют лишь

пространственную локализацию иРНК гена *oskar*, тем самым выступают как первые звенья цепочки взаимодействия генов в формировании полового зачатка (рис.2.31). Функция генов *tudor* и *valois* неизвестны.

Как полагает Nüsslein-Folhardt, ген *torso-like* играет также существенную роль в формировании передне-задней оси эмбриона и, возможно, обладает функцией морфогена. Интересно, что согласно ее данным, первичные транскрипты этого гена локализуются как в переднем, так и в заднем полюсах эмбриона (рис.2.32). Однако функция этого гена не выяснена еще до конца, поскольку не идентифицирован белковый продукт

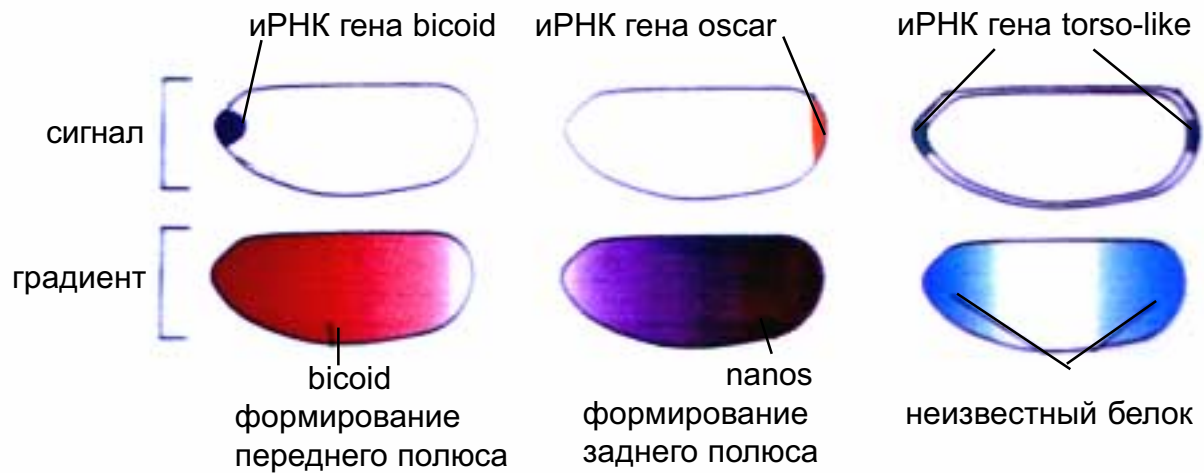


Рис.2.32. Три системы материнских генов организуют передне-заднюю ось эмбриона путем формирования градиентов транскриптов генов bicoid, oscar, torso-like. В свою очередь при трансляции иРНК этих генов создаются градиенты 4-х белков, что дает начало первому «разделению» эмбриона.

этого гена.

Суммируя данные о роли генов материнского эффекта в становлении передне-задней оси эмбриона, можно заметить, что небольшое число ключевых генов (вероятно, не более 4-х) ответственны за этот первый этап раннего развития - формирование позиционной информации.

Становление второй оси

эмбриона - дорзально-вентральной - осуществляется в период от момента оплодотворения до стадии клеточной бластодермы, то есть более растянуто во времени, нежели формирование передне-задней оси. На морфологическом уровне становление этой оси определяет развитие вентральных структур, основой которых является мезодерма и

Таблица 2.3. Гены дорзализации *D. melanogaster* (Anderson and Nüsslein-Volhard, 1984)

Локусы, контролирующие процесс гаструляции	Локализация на генетической или цитогенетической карте	Коррекция мутантных фенотипов с помощью инъекции	
		цитоплазмы	РНК
gastrulation defective	11A 1-7	-	н.о.
dorsal	36C	+	-
nudel	3-17	н.о*	н.о.
tube	3-47	+	+
pipe	3-47	-	н.о.
snake	87D10-12	+	+
easter	88EF	+	+
Toll	97D	+	+
spätzle	97E	+	+
pelle	97F	+	+

*н.о. - не определялась.

нейроэктодерма. Дорзально-вентральная ось формируется при участии не менее 10 материнских генов (Таблица 2.3).

Большинство из этих генов рецессивные, и только ген Toll

этих мутаций наблюдается на стадии гаструляции, поскольку не формируется вентральная борозда и переднее впячивание кишки. Важно отметить, что инъекции цитоплазмы, полученной от эмбрионов дикого типа,

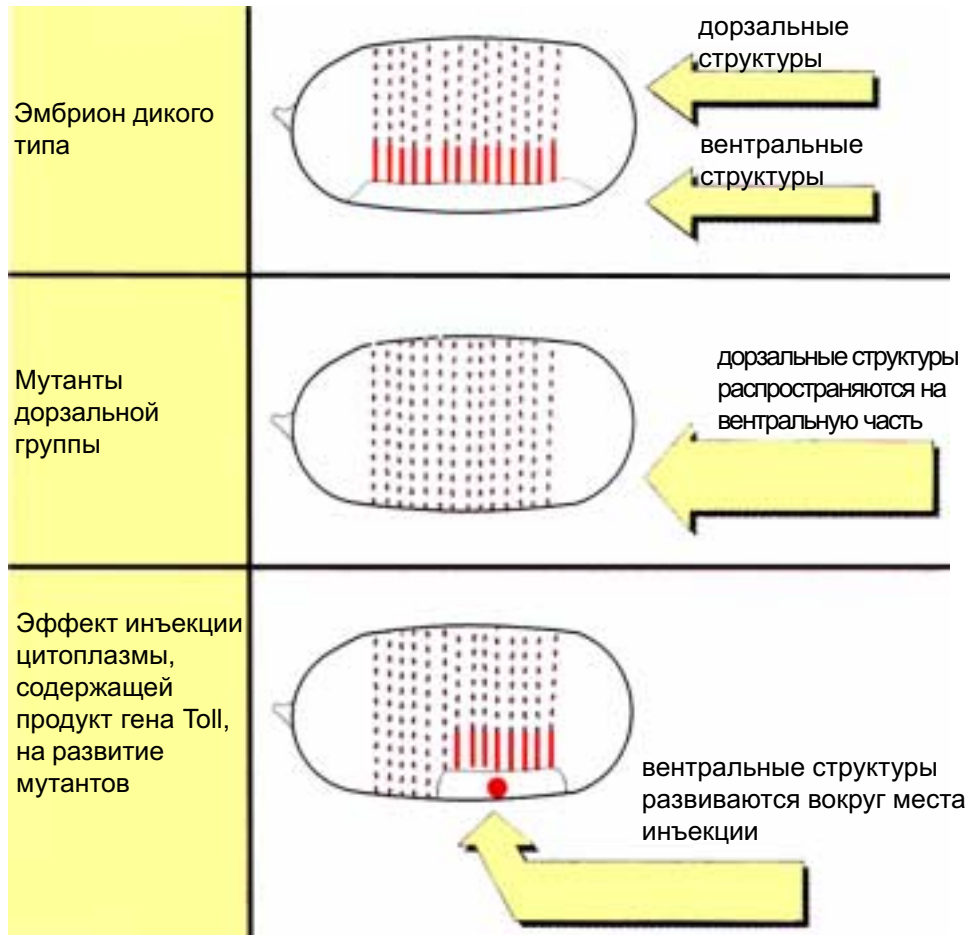


Рис2.33. У эмбрионов дрозофилы дикого типа дорзальные и вентральные структуры отчетливо различаются. Мутации по генам дорзальной группы препятствуют появлению вентральных структур, то есть происходит дорзализация вентральной стороны. Вентральные структуры могут быть восстановлены у мутантов посредством инъекции цитоплазмы от эмбрионов дикого типа, содержащих продукт гена Toll.

доминантный. Данная группа генов распределена равномерно по геному, и не наблюдается тенденции к их кластеризации (Таблица 2.3).

Мутации любого гена из этой группы вызывают нарушение формирования вентральных структур, и вместо них развиваются дорзальные - **феномен, называемый дорзализацией.** Видимое проявление

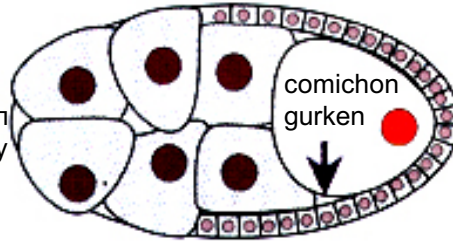
в той или иной мере способны корректировать эффект большинства мутаций (Таблица 2.3). Например, у мутантов по гену snake, такая инъекция полностью нормализует развитие. В случае мутации по гену Toll коррекция мутантного фенотипа с помощью инъекций зависит от места инъекции: если она сделана в вентральную область - развитие

полностью нормализуется, инъекции в дорзальную область эмбриона не оказывают корректирующего эффекта (рис.2.33).”Спасение” мутантов по гену *pelle* возможно только в случае,

когда донором цитоплазмы служат эмбрионы, находящиеся на ранних стадиях развития до стадии поздней бластодермы. Предполагается, что на стадии бластодермы градиент иРНК

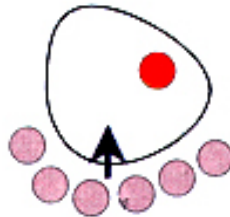
До оплодотворения

Гены в ооците посылают неидентифицированный сигнал фолликулярным клеткам к белку рецептору гена *torpedo*

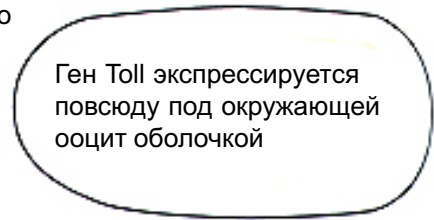


torpedo

Pipe, *nudel*, *windbeutel* в фолликулярных клетках посылают сигнал на вентральную сторону ооцита



Ген *Toll* экспрессируется повсюду под окружающей ооцит оболочкой

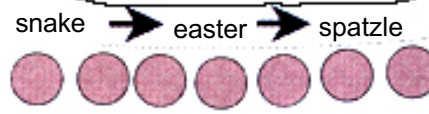


После оплодотворения

Перивителлиновое пространство



Гены *snake*, *easter* кодируют протеазы, которые способны активировать белок *spatzle*

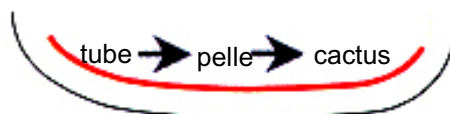


Фолликулярные клетки

Ген *spatzle* активирует белок *Toll* на вентральной стороне



Ген *Toll* действует через ген *tube* (функция неизвестна) и активирует ген *pelle*, кодирующий киназу, которая фосфорилирует белок *cactus*



Белок *cactus* высвобождает белок *dorsal*, который затем попадает в ядро

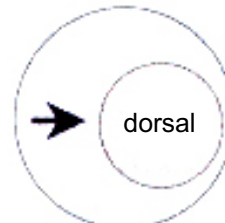


Рис.2.34. Становление дорзально-вентральной оси эмбриона происходит благодаря взаимодействию между фолликулярными клетками и ооцитом. Природа сигнала, который ответственен за появление белка *spatzle* на вентральной стороне, неизвестна, но затем *spatzle* связывается с белком *Toll*, что активирует этот морфоген. Цепь взаимодействия генов заканчивается тем, что транскрибируемый фактор *dorsal* достигает ядер.

гена *pelle* исчерпывается. Как следует из таблицы 2.3, инъекции суммарной РНК, или поли-А⁺РНК, выделенных из эмбрионов дикого типа, также способны нормализовать развитие мутантов.

Большинство генов этой группы экспрессируются в фолликулярных клетках и участвуют в сложных взаимодействиях фолликулярных клеток с созревающим ооцитом. Результатом такого взаимодействия является активация цепи молекулярных событий на вентральной стороне ооцита (рис.2.34). Взаимодействия фолликулярных клеток с ооцитом осложняются эффектами генов, которые контролируют формирование фолликулярных клеток самих по себе. Мутации таких генов, нарушающие развитие фолликулярных клеток, опосредовано через этот механизм вызывают также нарушение формирования дорзально-вентральной оси.

В настоящее время известно, что материнские гены *pipe*, *nudel* и *windbeutel* экспрессируются в фолликулярных клетках. Затем, неизвестным до сих пор образом, продукты этих генов участвуют в образовании сигнала, который поступает с вентральной стороны в яйцеклетку после ее оплодотворения (рис.2.34). Этот сигнал вызывает активацию серии протеолитических процессов на поверхности яйца. Показано, что продукт гена *snake* расщепляет белковый продукт гена *easter*, который в свою очередь активируется чтобы осуществить частичный протеолиз белка,

кодируемого геном *spatzle* (рис.2.34). Активированный благодаря частичному протеолизу, белок *spatzle* превращается в лиганд для рецептора, кодируемого геном *Toll* (рис.2.34). Ген *Toll* играет ключевую роль в дальнейшей передаче сигнала внутрь яйца. Белковый продукт гена *Toll* распределен по всей цитоплазме эмбриона. В то же время, по характеру своего действия такое равномерное распределение должно быть преобразовано в градиент с морфогенными свойствами. Как это достигается остается невыясненным. Тем не менее связывание лиганда есть абсолютно необходимое условие для формирования дорзально-вентральной оси. Процесс начинается на вентральной стороне эмбриона в перивителлиновом пространстве, то есть наиболее наружном слое (рис.2.34). Белок *spatzle* после частичного протеолиза либо остается фиксированным в перивителлиновом пространстве, либо очень быстро связывается с белком *Toll*. При этом важно отметить, что белок *Toll* активируется только на вентральной стороне эмбриона (рис.2.34). Как отмечалось выше, большинство мутаций гена *Toll* (тип “loss of function”) вызывает дорзализацию вентральной стороны эмбриона вследствие того, что рецептор не может быть активирован. Существует однако и противоположный эффект мутации гена *Toll*. Доминантная мутация *Toll^d* (тип “gain-of-function”) вызывает вентрализацию дорзальной стороны эмбриона. Такой необычный эффект связан с тем, что при мутации *Toll^d* происходит конститутивный синтез

белкового продукта. Эффект Toll осуществляется через взаимодействие с продуктами генов *tube* и *pelle*. Функция гена *tube* неизвестна, тогда как установлено, что ген *pelle* кодирует киназу (рис.2.34). “Мишенью” (the target) для этой киназы является белковый продукт гена *cactus*, который является регулятором транскрипционного фактора, кодируемого геном *dorsal* (рис.2.34). Не исключается также, что киназа (продукт гена *pelle*) может связываться непосредственно с транскрипционным фактором. **Продукты генов *dorsal* и *cactus* образуют взаимодействующую пару (“an interacting pair”)** белков, которая имеют значительное сходство с другой парой, транскрипционного фактора NF- κ B и его регулятора I κ B. NF κ B состоит из 2-х субъединиц (сходных по структуре), которые связываются в цитоплазме с I κ B. Когда происходит фосфорилирование I κ B, из комплекса освобождается NF κ B, который затем направляется в ядро, где функционирует как транскрипционный фактор генов, промоторы которых имеют так называемый мотив κ B. Многие исследователи полагают, что белок *cactus* регулирует *dorsal* тем же самым способом, как I κ B регулирует NF κ B, то есть комплекс *cactus-dorsal* неактивен в цитоплазме до тех пор, пока не произойдет фосфорилирование *cactus*, после чего освободившийся *dorsal* попадает в ядро. Таким образом, благодаря активации Toll устанавливается, в конце концов, градиент белка *dorsal* в ядрах эмбриона в вентрально-дорзальном направлении; на вентральной стороне *dorsal* локализуется в ядре, тогда как на



Рис.2.35. Белок *dorsal* образует градиент от вентральной к дорзальной стороне эмбриона. На вентральной стороне (внизу) белок находится в ядрах, на дорзальной стороне (вверху) ядра лишены этого белка, но он находится в цитоплазме.

дорзальной стороне - в цитоплазме. Этот градиент формируется на стадии синтициальной бластодермы и становится отчетливым в момент перехода синтициальной к клеточной бластодерме (рис.2.35). Таким образом, своеобразие дорзально-вентрального градиента состоит в том, что белок *dorsal* присутствует во всех клетках бластодермы, но на вентральной стороне он локализуется в ядрах клеток, тогда как на дорзальной стороне - в цитоплазме. Ген *dorsal* может выступать в роли как позитивного, так и негативного регулятора генной активности. Белок

dorsal способен активировать гены twist и snail, которые необходимы для развития вентральных структур, в то же время он подавляет транскрипцию генов decapentaplegic (dpp) и zen (zen), которые необходимы для развития дорзальных структур. Показано, что гены zen и dpp экспрессируются лишь на 40% на дорзальной стороне бластодермы. Продукт гена dpp является членом семейства ростовых факторов типа TGF β и контролируется геном dorsal так, что этот белок секретируется клетками только на дорзальной стороне. Белок dpp выступает в роли морфогена и детерминирует формирование дорзальных структур.

Суммируя данные по действию материнских генов, следует выделить их важнейшую функцию - **установление передне-задней и дорзально-вентральной осей эмбриона через формирование градиентов**, то есть действие этих генов детерминирует формирование пространственных координат эмбриона и градиенты, которые можно рассматривать как “запись” позиционной информации. В свою очередь, позиционная информация считывается зиготическими генами, среди которых **первыми активируются гены сегментации**.

2.2.2. Роль генов сегментации в развитии.

Согласно классификации генов, описанной выше, гены сегментации контролируют число и полярность сегментов. Существует, по меньшей мере, 2 типа терминов, обозначающих

полярность сегмента: согласно одному внутри одного сегмента можно выделить передний и задний компартменты (рис.2.36). Например, торакальный сегмент Т3 состоит из передней части А и задней Р или Т3А и Т3Р (рис.2.36). Такая картина сегментов более характерна для более поздних стадий развития (примерно к 10 часу). На начальных стадиях сегментации (на стадии гастрюляции) используют термин **парасегменты** со своей системой нумерации для обозначения первых морфологических признаков метамерии (рис.2.36). Например, те же части сегмента Т3 (Т3А и Т3Р) по этой номенклатуре будут обозначаться как парасегмент 4 или парасегмент 8, состоящий из двух компартментов А2Р и А3А (рис.2.36). К 4-5 часу развития эмбриона, когда только намечаются первые борозды на его поверхности, можно видеть формирование парасегментов. К 9 часам развития, когда сегменты хорошо выражены как морфологические структуры, можно заметить, что передняя часть (компартмент А) развивается из одного парасегмента, тогда как задний компартмент из последующего парасегмента. В соответствии с этим, происходит как бы “преобразование” (конечно условное, чисто терминологическое) пар Р-А из 2-х парасегментов в А-Р пару одного сегмента (рис.2.36).

В настоящее время установлено, что не менее 30 генов ответственны за процесс сегментации. В таблице 2.4 приведен список генов сегментации и эффекты мутаций этих генов в развитии.

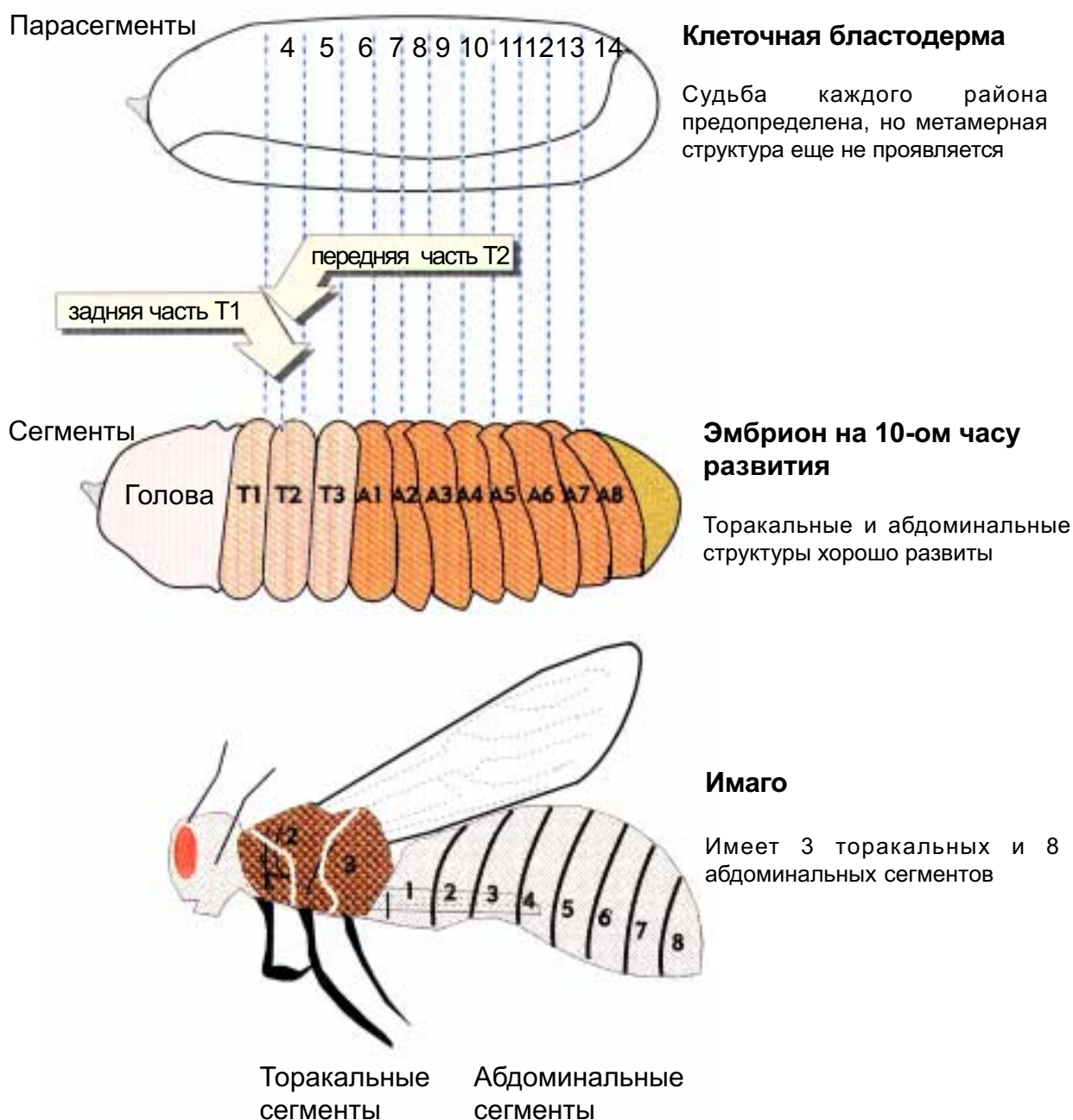


Рис.2.36. Развитие дрозофилы проходит через стадию компартиментализации, что приводит к образованию парасегментов и сегментов.

Большинство генов сегментации рецессивные. Принято разделять все гены сегментации на 3 большие группы:

1. Группа “gap” генов, мутации которых характеризуются совместным “выпадением” нескольких прилежащих друг к другу сегментов (рис.2.37). Например, при мутации гена Krüppel (Kr) у эмбрионов отсутствуют

все торакальные и первые 5 абдоминальных (с A1 по A5), но нормально развиваются A6, A7 и A8. У мутантных эмбрионов по гену hunchback отсутствуют T1 и T2 сегменты при нормальном развитии остальных.

2. Группа генов “pair-rule”, мутации которых вызывают полное нарушение развития сегмента (ов), но оно следует

Таблица 2.4. Гены сегментации *D. melanogaster* (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Lewin 1995)

Класс	Локус	Позиция на генетической карте
Класс 1. Мутации полярности сегмента	fused (fu) wingless (wg) patch (pat) gooseberry (gsb) hedgehog (hh) cubitus interruptus (ci ^D)	1-59.5 2-30 2-55 2-104 3-90 4-0
Класс 2. Мутации pair-rule	hairy (h) runt (run) odd-skipped (odd) paired (prd) even-skipped (eve) engrailed (en) barrel (brr)	1-65 2-8 2-45 2-55 2-62 3-27
Класс 3. гар-мутации	Krüppel (Kr) knirps (kni) hunchback (hb) giant (gn)	2-107.6 3-47 3-48

правилу, согласно которому выпадение происходит либо четных или нечетных сегментов (рис.2.37). Например, у мутантов по гену *even-skipped* нормально развиваются сегменты: T2, A1, A3, A5, и A7, но отсутствуют нечетные торакальные и четные абдоминальные сегменты (рис.2.37).

3. Группа генов, контролирующих полярность сегментов. У мутантов этой группы генов число сегментов неизменено, но у них происходит замещение внутри одного сегмента одного компартмента другим, в результате чего формируется “зеркальная полярность” (рис.2.37).

Гены сегментации являются первыми зиготическими генами, которые экспрессируются на стадии синцитиальной бластодермы,

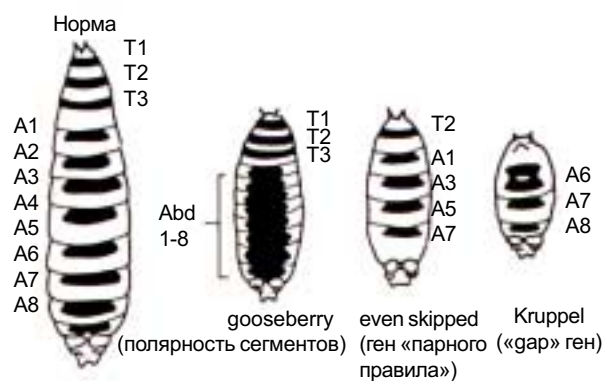


Рис.2.37. Мутации, вызывающие изменение числа и полярности сегментов у дрозофилы (по Nuslein-Volhard and Wreschans, 1980).

примерно за 2 деления до целлюляризации. Важно подчеркнуть также, что 3 группы генов сегментации экспрессируются последовательно, первыми активируются “гар” гены, затем группа “pair-rule” и, наконец, гены полярности сегментов (рис.2.38). “Gar” гены “прочитывают”



Рис.2.38. Взаимодействие материнских генов и генов сегментации в разных частях эмбриона.

позиционную информацию, подготовленную материнскими генами, и делят эмбрион на 4 части, гены “pair-rule” активируются несколько позднее “gap” генами и делят эмбрион на 7 “парных” сегментов, а гены полярности определяют границы индивидуальных сегментов к 15-ому делению (рис.2.38). Большинство “gap” и “pair-rule” генов кодируют ядерные белки, которые функционируют как транскрипционные факторы, выполняющие роль либо активаторов, либо репрессоров. Иногда обе функции совмещаются у одного белка, то есть он выступает как активатор для одного гена-мишени, но как репрессор - для

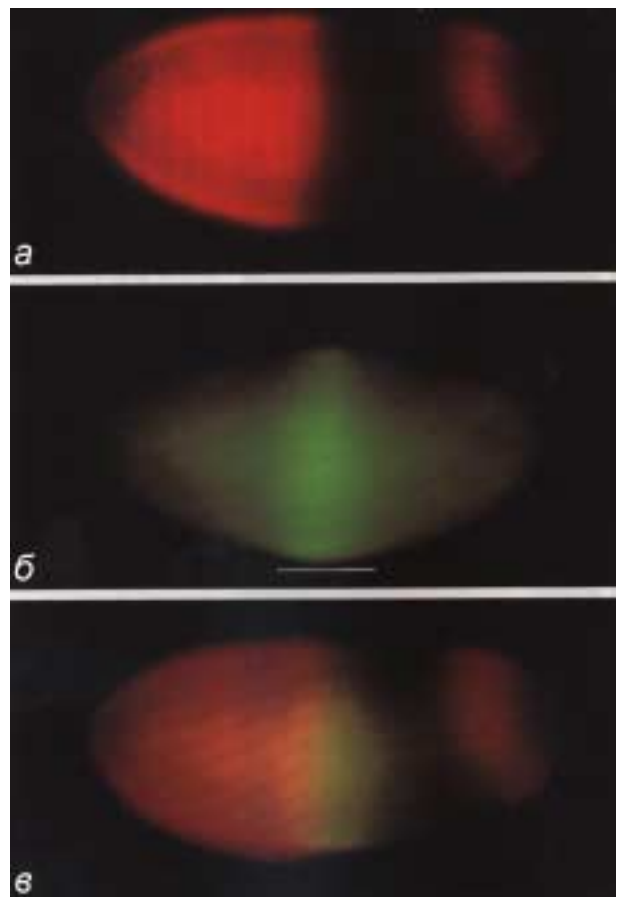


Рис.2.39. Распределение белковых продуктов генов hb (hunchback) (а), и Kr (Kruppel) (б) у эмбрионов *D. melanogaster* на стадии клеточной бластодермы. Передний полюс эмбрионов слева, а задний справа, вид с дорзальной стороны. Белок hb выявлен с помощью крысиных антител, а визуализация с помощью вторых антител - меченой ФИТЦ (флюоресцеин-изотиоцианатом) - козьей антисыворотки против иммуноглобулинов крысы; белок Kr - выявлен с помощью крольчих антител, а визуализация с помощью вторых антител - меченой ФИТЦ (родамин-изотиоцианат) козьей антисывороткой против иммуноглобулинов кролика. Передний домен hb занимает 47% длины эмбриона начиная с переднего полюса и имеется позитивная реакция в заднем полюсе (а), Позиция белка Kr находится между 37% и 58% длины эмбриона (б). в - двойное флюоресцентное окрашивание с использованием антител к hb и Kr; зона перекрывания hb и Kr окрашена в желтый цвет.

другого.

На рис.2.28 и 2.39 показано

распределение первичных транскриптов гена *hunchback* (*hb*) и его белкового продукта. Хорошо видно, что они локализируются в переднем полюсе эмбриона, хотя можно видеть также присутствие небольшого количества белка в заднем полюсе. Активация гена *hb* осуществляется белком *bicoid*, который напрямую связывается с сайтом промотора гена *hb*. Транскрипция *hb* гена начинается только по достижении пороговой концентрации белка *bicoid* (рис.2.28). Последнее очень важно, поскольку белок *bicoid* имеет градиент концентрации вдоль передне-задней оси, и это автоматически подразумевает, что транскрипция гена *hb* возможна только в тех районах эмбриона, где пороговая концентрация белка *bicoid* достаточна высока. Такой простой механизм действия морфогена позволяет пространственно ограничивать экспрессию гена *hb*. **Иными словами, количественные различия морфогена вдоль передне-задней оси трансформируются в качественно различные состояния гена *hb* в разных районах цитоплазмы эмбриона.**

На рис.2.39 можно видеть, что следующая зона вдоль передне-задней оси эмбриона содержит белковый продукт гена *Krüppel* (*Kr*). Транскрипция гена *Kr* активируется белком *hb*. Однако, позитивная регуляция гена *Kr* белковым продуктом гена *hb* зависит от концентрации последнего; при высоких концентрациях (такой как в переднем полюсе) белок *hb*, наоборот, ингибирует активность гена *Kr* и тем самым обозначает переднюю границу

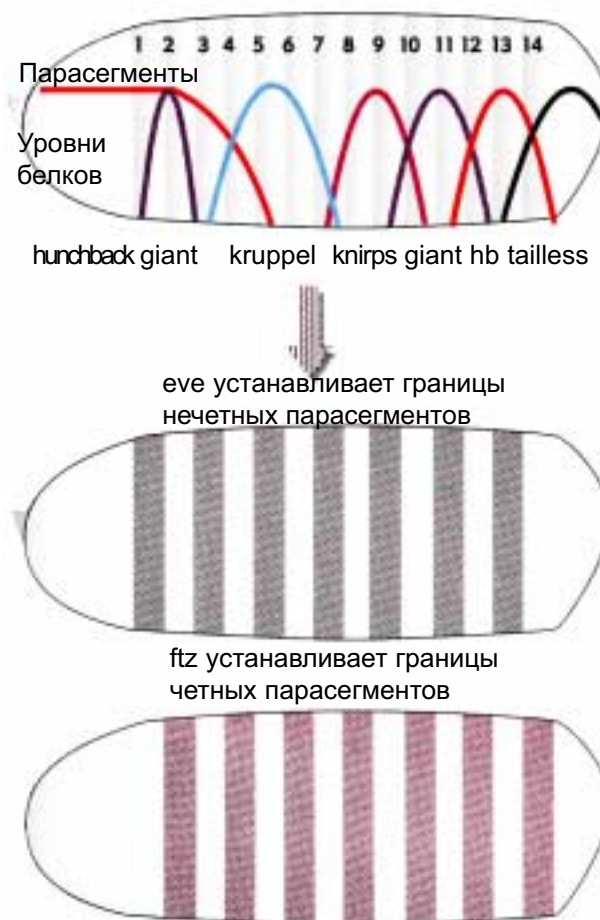


Рис.2.40. Экспрессия «gap» генов определяет границы прилежащих районов эмбриона. Они контролируют экспрессию генов «парного правила».

распределения продуктов гена *Kr*. На рис.2.40 схематически показана локализация белковых продуктов еще двух «gap» генов - *knirps* и *giant*. Белок *hb* является репрессором для этих генов, и потому они экспрессируются в задней части эмбриона. Любопытно, что материнский ген *nanos* выступает как репрессор экспрессии гена *hb* в задней части эмбриона, что также опосредовано ограничивает пространственную локализацию белков *knirps* и *giant* только задним

полюсом (рис.2.40).

На рис.2.38 и 2.40 показана трансформация 4-х зон локализации белковых продуктов “gap” генов в 7-полосный спектр пространственного распределения продуктов генов “pair-rule”. Как отмечалось выше, передняя граница распределения белка Kr определяется высокой концентрацией белка hb. Это соответствует зоне появляющегося позднее парасегмента 3. Однако, белок hb в умеренной концентрации необходим для экспрессии гена Kr и потому задняя граница распределения Kr заканчивается в месте локализации будущего парасегмента 5 (рис.2.40). Таким же сходным образом, ген giant ограничивает экспрессию hb в заднем полюсе, что в свою очередь определяет локализацию белка knirps, поскольку ген knirps ингибируется белком hb (рис.2.40). Важно подчеркнуть, что все описанные события происходят на стадии синтициальной бластодермы и следовательно те или иные границы распределения продуктов “gap” генов в общей цитоплазме выявляются лишь на молекулярном уровне, то есть до формирования будущих морфологических структур.

Первыми генами из группы “pair-rule” экспрессируются гены hairy (h) и even-skipped (eve). Первичные транскрипты этих генов появляются в интерфазе 14-го деления, непосредственно перед целлюляризацией. Возможно это ключевые гены в становлении сегментации, поскольку они устанавливают границы сегментов и влияют на экспрессию других генов этой группы. На рис.2.41 показано

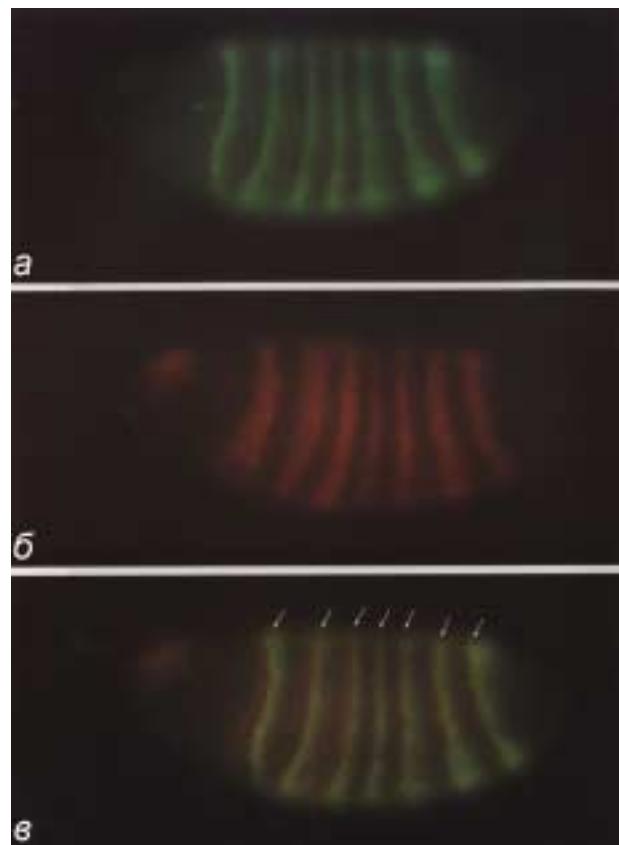


Рис.2.41. Распределение белковых продуктов генов *eve* (*even-skipped*) (а), и *h* (*hairy*) (б) в ядрах эмбрионов на стадии клеточной бластодермы. Белки *h* и *eve* выявлены с помощью первичных крысиных и кроличьих антител, соответственно, а визуализация с помощью вторых антител меченых ФИТЦ (а) или РИТЦ (б). в - результаты двойного флюоресцентного окрашивания белков *h* и *eve*. Стрелки показывают по меньшей мере два ряда ядер с позитивной окраской (желтый цвет) на белок *h*, представляют переднюю границу белковых полос *eve*.

распределение белковых продуктов генов *h* и *eve*. Хорошо видно, что каждый из них формирует 7 поперечных полос (в головном конце эмбриона находится небольшая зона локализации белка *h*), при этом они либо не перекрываются, либо перекрываются частично (рис.2.41). Результатом такого распределения формируется как бы 7 парных полос, состоящих из 2-х тесно прилегающих к друг другу. Расположение этих 7 полос

соответствует локализации будущих парасегментов, причем белок eve маркирует локализацию нечетных парасегментов, а h четных (рис.2.41). В процессе перехода ранней бластодермы к гастрюляции появляются белковые продукты гена fushi tarazu (ftz), которые локализуются в ядрах клеток, которые, в свою очередь, образуют 7 полос шириной в 3-4 клетки (рис.2.42). Таким образом, границы четных парасегментов, очерченные белковыми продуктами гена h, трансформируются в структуры с клеточной организацией, которые дадут начало будущим сегментам. Интересно отметить, что первоначально экспрессия гена ftz происходит равномерно во всех клетках эмбриона. Формирование описанных выше 7 полос происходит благодаря специфической деградации иРНК в клетках между полосами в передней и задней частях эмбриона. Как только оформляются эти полосы, транскрипция гена ftz прекращается, то есть экспрессия носит кратковременный транзитный характер.

Регуляция экспрессии гена eve осуществляется на другой основе, нежели ftz. Во-первых, его экспрессия регулируется независимо в каждой индивидуальной полосе. На рис.2.43 приведена схема регуляции гена eve в полосе 2, которая даст начало развитию парасегмента 3. Транскрипция eve активируется белками hunchback и bicoid, но пространственные границы действия гена eve определяются репрессорами, передняя - giant, а задняя - Kruppel (рис.2.43). Кроме того,



Рис.2.42. Транскрипты гена ftz⁺ локализуются в виде поперечных полос соответствующих четким парасегментам. У мутантов по гену ftz не образуются эти 7 полос.

промотор гена eve имеет сложную организацию, которая делает

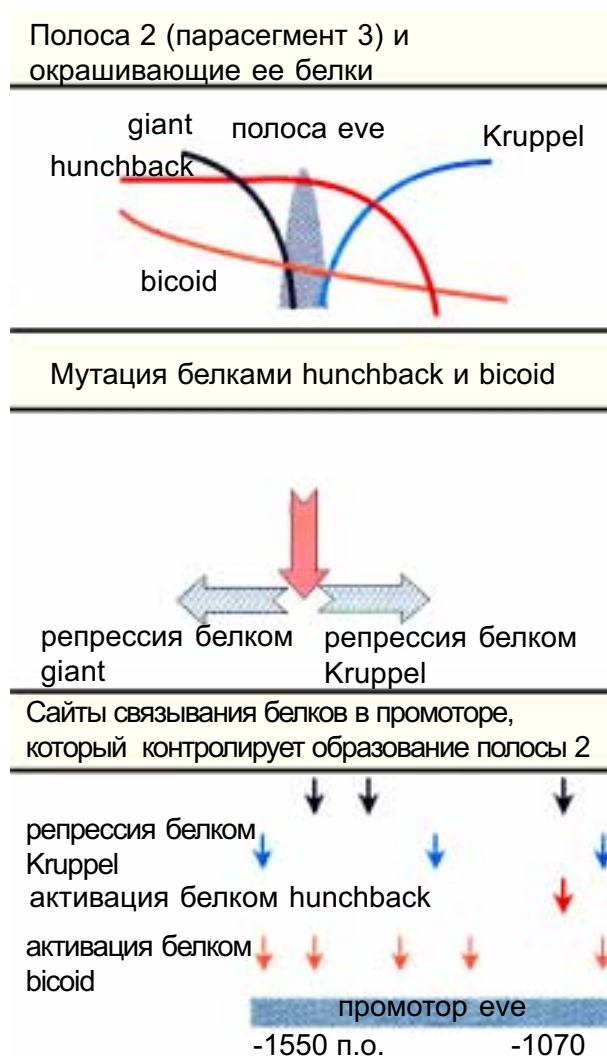


Рис.2.43. Появление полосы eve в парасегменте 3 происходит благодаря активации белками hunchback и bicoid. Репрессия белком giant устанавливает переднюю границу, а репрессия белком Kruppel заднюю границу.

возможным его дифференциальное о функционирование в индивидуальных полосах. На рис.2.43 можно видеть, что на участке промотора гена *eve* с -1550 по -1070 п.о. находится свыше 10 сайтов связывания либо активаторов (*bicoid*, *hunchback*), либо репрессоров (*giant*, *Kr*). Как отмечалось выше, локальная концентрация каждого из этих регуляторных белков значительно варьирует, и это создает предпосылки для возникновения уникальных комбинаций взаимодействия этих белков с сайтами промотора гена *eve* в каждой индивидуальной полосе.

Экспрессия генов “pair-rule” определяет молекулярные границы парасегментов. Следующей стадией формирования сегментов является установление их полярности. По-видимому, ключевыми генами в установлении полярности сегментов являются гены *engrailed* (*en*) и *wingless* (*wg*). Экспрессия гена *en* необходима во всех сегментах для разграничения А и Р компартментов. Его активность проявляется только в компартменте Р, но не А. Белковый продукт гена *en* локализуется в узкой зоне компартмента Р шириной только в один ряд клеток. Рис.2.44 показывает локализацию белка *en*, выявляемую с помощью моноклональных специфических антител. Легко заметить, что действительно только один ряд клеток очерчивает переднюю границу парасегмента Р в каждом из 14 сегментов. Экспрессия гена *en* исключительно важна, поскольку определяет границы компартментов, из которых разовьются будущие дефинитивные структуры

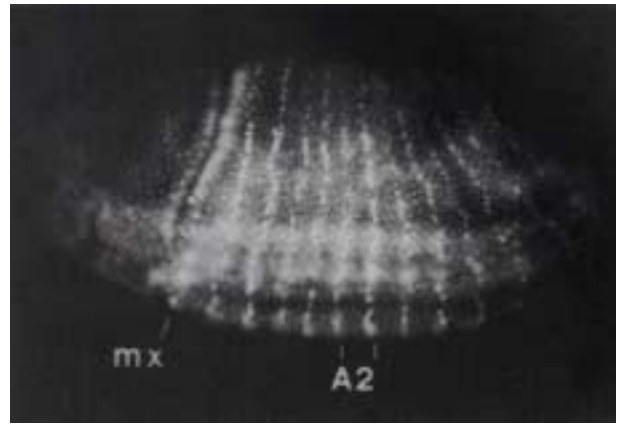


Рис.2.44. Локализация белка *engrailed* наблюдается в ядрах и полосы представлены только одним рядом клеток.

имаго. Изначально один ряд клеток образуются у передней границы полос *ftz* и *eve*, то есть там, где будет передняя граница компартментов Р. Какие механизмы лежат в основе такого точного пространственного распределения продуктов гена *en*? Существуют две модели, объясняющие этот феномен. Согласно первой модели предполагается, что различные “pair-rule” гены экспрессируются в виде “перекрывающихся” зон вдоль передне-задней оси эмбриона. В результате таких “перекрывающихся” зон активности генов “pair-rule” возникают их различные уникальные комбинации, которые определяют ответную реакцию клеток на следующей стадии развития. Иными словами, гены полярности контролируются генами “pair-rule” подобно тому (как описано выше), как гены “gap” контролируют экспрессию генов “pair-rule”. Вторая модель предполагает, что границы компартментов устанавливаются путем межклеточных взаимодействий, например, между клетками, в которых экспрессируется ген *ftz* или *eve*, и клетками, в которых отсутствует

экспрессия этих генов, что является триггером для экспрессии гена *en*.

Белковый продукт гена *en* является транскрипционным фактором, то есть выступает в роли регулятора активности других генов. Другой ген полярности *wingless* кодирует белок, который секретируется и накапливается вблизи клетки, что позволяет осуществлять локально взаимодействия между прилежащими клетками. Первоначально *wg* экспрессируется в ряду клеток, непосредственно находящихся впереди клеток, содержащих белок *en*, в результате чего устанавливается задняя граница впереди-прилежащего парасегмента. Любопытно, что ген *en* активируется белками *eve* и *ftz*, но затем с началом секреции *wg* транскрипция гена *en* контролируется белком *wg*. В настоящее время недостаточно изучена роль других генов полярности в становлении сегментации. Это довольно гетерогенная группа генов, кодирующих секреторные белки, белки цитоскелета, трансмембранные белки и киназы, а также транскрипционные факторы, но их действие реализуется преимущественно через межклеточные взаимодействия.

2.2.3. Гомеозисные гены и их роль в развитии.

Термин “гомеозис” был введен Уильямом Бэтсоном более 100 лет назад. В своей книге “Материалы к изучению изменчивости”, изданной в 1894 г., Бэтсон так обосновывал введение этого понятия: “Превращение антенны насекомого в ногу, глаза

ракообразного - в антенну, лепестка - в тычинку и тому подобное - все это примеры одного рода. Желательно и даже необходимо, чтобы такие изменения, состоящие в том, что один из членов ряда меристемных структур принимает форму или приобретает признаки, свойственные другим членам ряда, были выделены в особую группу явлений... Поэтому я предлагаю... термин **гомеозис...**, **поскольку главное здесь не в том, что произошло некое изменение, а в том, что одно, изменившись, приобрело сходство с чем-то другим**”. Бэтсон выделяет изменчивость гомеозисного типа в особую категорию, подчеркивая превращение одной метамерной структуры в другую. Таким образом, сами по себе **гомеозисные превращения не создают ничего нового в онтогенезе, но они изменяют характер регионального развития эмбриона.**

В случае дрозофилы к такой категории относятся мутации, вызывающие превращение структур, характерных для одного сегмента, в структуры, **свойственные**



Рис.2.45. Четырех-крылая муха развивается из яиц генотипа *abx*, *bx* и *rbx*.

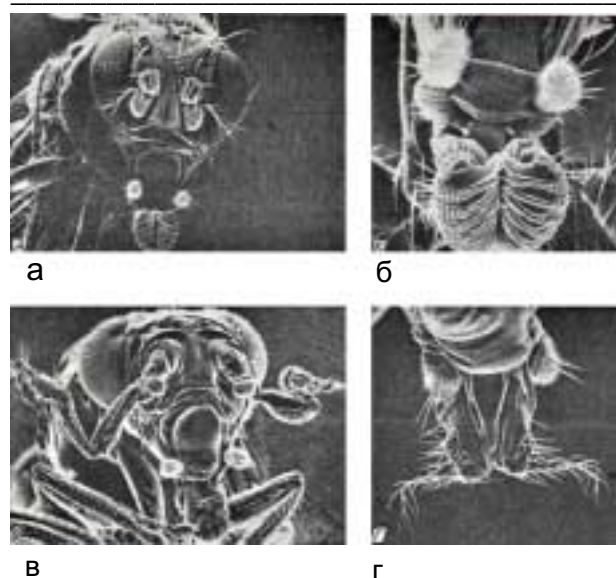


Рис.2.46. А, Б - голова имаго дикого типа при разном увеличении. В - мутация *Antp*, при которой антенны трансформируются в две пары ног; Г - мутация *proboscipedia*, превращение губы в тарзус.

близлежащим сегментам. Наиболее яркими примерами гомеозисных превращений являются развитие заднегруди по типу среднегруди, сопровождающееся превращением жужжалиц во вторую пару крыльев, или развитие на голове вместо антенны или щупиков передней пары ног. На рис.2.45 показаны эффекты мутаций *bithorax* (*bx*), *postbithorax* (*pbx*) и *anteriobithorax* (*abx*) (*Ubx*). Компаунд по этим мутациям имеет 4-е пары крыльев и развитую заднегрудь, показывая сходство с представителями другого таксона - тетраптера. В данном случае, мутации вызывают изменение направления развития 3-го грудного сегмента по пути 2-го торакального сегмента. На рис.2.46 показаны гомеозисные превращения вызванные мутациями *Antennapedia* (*Antp*) и *proboscipedia* (*pb*). Хорошо видно, что антенна развивается в ноги, а псевдотрахеальные ряды

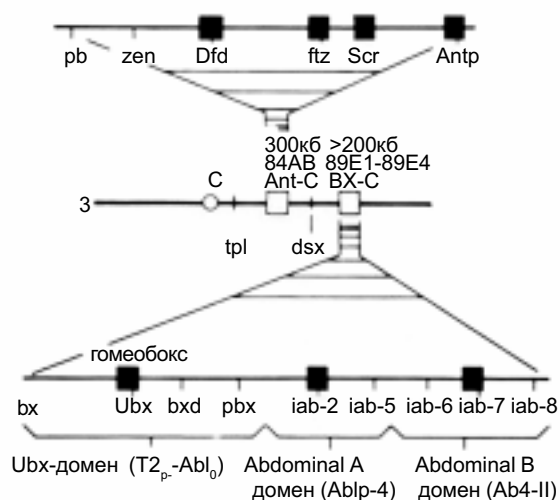


Рис.2.47. Схема организации комплекса ВХ-С и АНТ-С на третьей хромосоме дрозофилы. Распределение гомеобоксов (зачернены) в комплексах (белые).

микрощетинок нижней губы превращаются в аристы и концевые структуры антенны. Такого рода мутации не могли не привлечь внимание генетиков, поскольку представлялась уникальная возможность исследовать функцию генов, **контролирующих развитие сегментов, определяющих их суть.**

У дрозофилы гомеозисные гены представлены двумя кластерами генов или, как в настоящее время принято говорить, двумя комплексами генов, ВХ-С (*Bithorax-Complex*) и АНТ-С (*Antennapedia-Complex*). На рис.2.47 показана локализация и организация генов комплексов АНТ-С и ВХ-С в правом плече 3-й хромосомы. Видно, что комплекс АНТ-С расположен в районе 84АВ и имеет размеры около 350 тыс.п.о. На рис.2.48 показан район 84АВ на цитогенетической карте 3-й хромосомы. Видно, что этот район состоит из 2-х крупных дисков. Комплекс ВХ-С находится в районе 89Е1 - 89Е4 и имеет размеры более 200

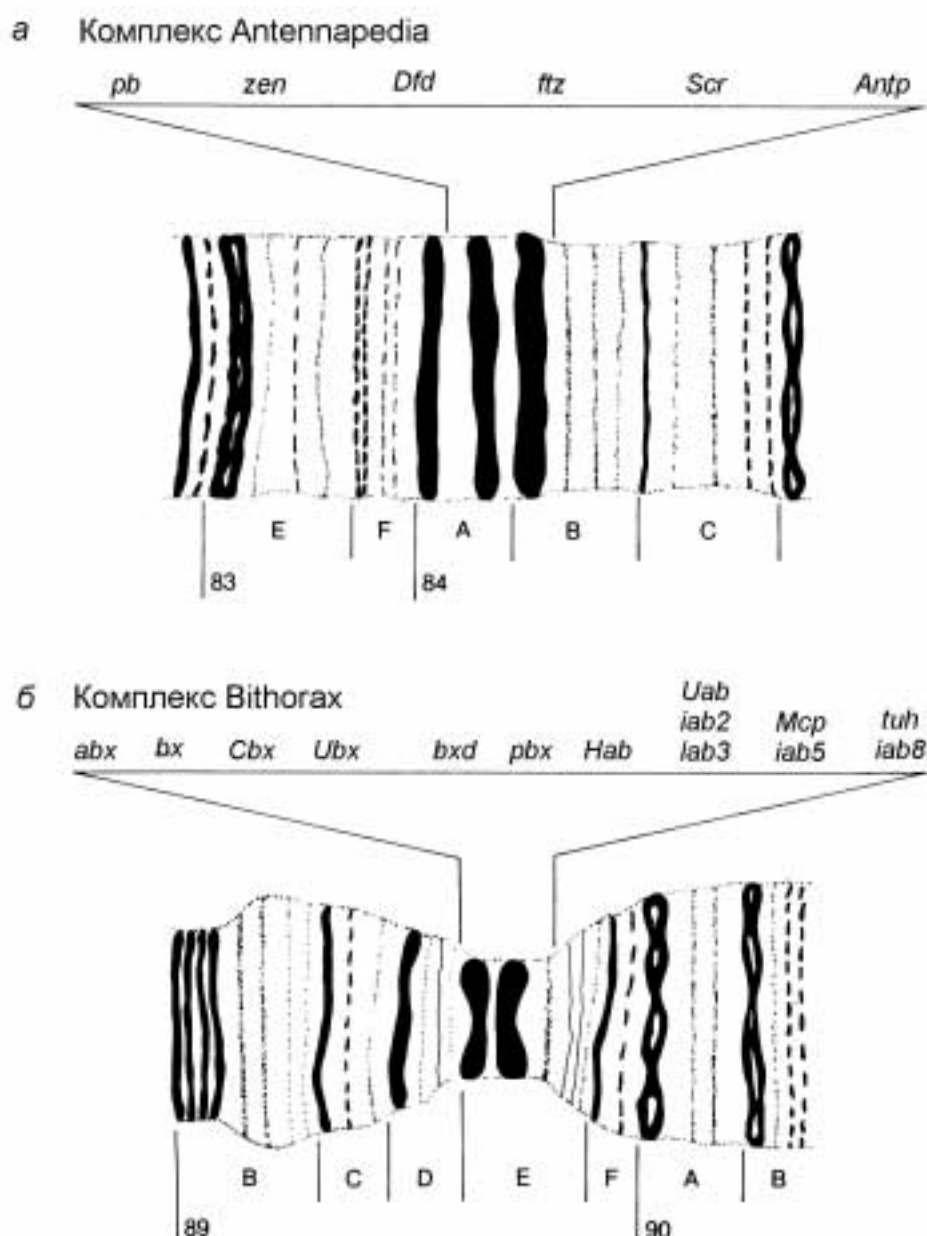


Рис.2.48. Схематическое изображение участков политенных хромосом *D. melanogaster*, в которых расположены комплексы ANT-C (A) и BX-C (Б). Расположение мутаций в комплексах: *pb* - proboscipedia, *Dfd* - Deformed, *ftz* - fishi-tarazu, *S* - Sex comb reduced, *Antp* - Antennapedia, *abx* - anteriobithorax, *bx* - bithorax, *Cbx* - Contrabithorax, *Ubx* - Ultrabithorax, *bxd* - bithoraxoid, *pbx* - postbithorax, *Hab* - Hyperabdomonal, *Uab* - Ultraabdominal, *Mcp* - Miscadestral - pigmentation, *tuh* - tumorous hed, *iab* - infraabdominal

тыс.п.о. На рис.2.48 показан район локализации комплекса ANT-C на цитогенетической карте 3-й хромосомы. Этот район представлен двумя крупными дисками и одним минорным.

В настоящее время в комплексе ANT-C идентифицировано 9 генов, расположенных в следующем порядке

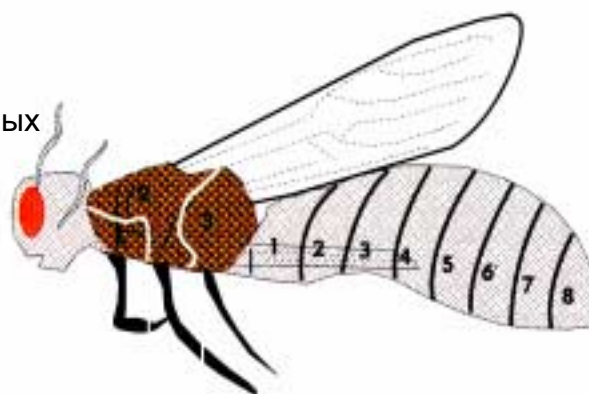
слева направо (рис.2.51): labial (*lab*), proboscipedia (*pb*), *zerknült* (*zen*), bicoid (*bcd*), *ama*, Deformed (*Dfd*), Sex combs reduced (*Scr*), fushi tarazu (*ftz*) и Antennapedia (*Ant*). Следует отметить, что гены *bcd*, *zen*, *ftz* (функции этих генов в раннем развитии описаны выше) и *ama* хотя и находятся в комплексе ANT-C, но они не являются

гомеозисными генами (рис.2.51); к собственно гомеозисным генам относятся только 5 генов: *lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr* и *Ant*. Мутации именно этих генов вызывают гомеозисные эффекты: *lab* вызывает появление на нижней губе арист, эффект *pb* проявляется в превращении нижнегубного сегмента в переднюю ногу, при мутации *Dfd* не развивается мандибулярный сегмент, *Scr* вызывает трансформацию переднегруди в среднегрудь, а *Antp*, как описано выше, изменяет развитие сегментов T2 и T3 по типу T1 (рис.2.51). Делеция всего комплекса генов ANT-C вызывает трансформацию T2, T3 и двух головных сегментов (максилярный и нижнегубной) в T1. Легко заметить, что **фокус действия гомеозисных генов ANT-C ограничен самыми передними сегментами тела эмбриона: головными и 3-мя торакальными (парасегменты 1-4) (рис.2.51).**

Комплекс генов BX-C показан на рис.2.47 и 2.49. Фокус действия генов этого комплекса распространяется от сегмента T2 до A8, то есть эти гены осуществляют контроль развития структур большей части тела имаго. В отличие от кластера генов ANT-C, комплекс BX-C содержит только 3 гена, и все они гомеозисного типа: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal A* (*abdA*) и *abdominal B* (*abdB*) (рис.2.49). Исторически так сложилось, что комплекс BX-C принято делить на 2 домена: *Ultrabithorax* и *Infraabdominal*, который в свою очередь состоит из двух субдоменов, *abdA* и *abdB* (рис.2.47 и 2.49). Легко можно заметить, что домен *Ubx* и субдомены *abdA* и *abdB*

соответствуют генам *Ubx*, *abdA* и *abdB*, соответственно (рис.2.49). Предполагается, что в процессе эволюции домен *Ubx* появился первым, а затем в результате двух раундов дупликации появился *Infraabdominal*. Мутации домена *Ubx* вызывают гомеозисные превращения, ограниченные районом от T2P до A1A (парасегменты 5-6) (рис.2.49), эффекты мутации домена *abdA* проявляются в районе от A1P до A4 (парасегменты 7-9), а *abdB* от A4 до A8 (парасегменты 9-14) (рис.2.49). Следует остановиться на характеристике мутаций комплекса BX-C. В настоящее время известно, что эти мутации имеют разное происхождение, одни мутации затрагивают кодирующую часть генов *Ubx*, *abdA* и *abdB*, тогда как другие цис-действующие регуляторные сайты этих генов. На рис.2.48 и 2.49 показаны сайты мутаций *Contrabithorax* (*Cbx*), *anterabithorax* (*abx*), *bithorax* (*bx*), *bithoraxoid* (*bxid*) и *postbithorax* (*pbx*), которые находятся вне кодирующей части гена *Ubx*, но вовлекают регуляторные сайты в цис-положении, иногда расположенные на расстоянии до 10 тыс.п.о. от кодирующей части гена. Эффекты некоторых из этих мутаций показаны слева вверху рис.2.49. Делеция самого гена *Ubx* вызывает трансформацию сегментов T3 и A1 в T2. Такого же сорта мутации описаны в субдомене *abdA* (мутации серии *infraabdominal*: *iab2*, *iab3* и *iab4*) и в *abdB* (*iab5*, *iab6*, *iab7* и *iab8*). Фокус действия этих мутаций представлен справа вверху рис.2.49. Делеция всего же комплекса BX-C вызывает превращение всех абдоминальных и T3 в серию сегментов типа T2.

Комплекс ВХ-С содержит 3 транскрибирующихся гена. Серия мутаций в регуляторных зонах этих генов вызывает гомеозисные превращения абдоминальных сегментов. Места мутаций (делеций, инсерций и транслокаций) показаны на молекулярной карте ВХ-С.



Мутации

- abx* трансформация Т2Р/Т3А в Т2
- bx* трансформация Т3А в Т2А
- bxд* трансформация А1А в Т3А

Мутации

- iab6* трансформация А6 и А5
- iab5* трансформация А5 в А4
- iab4* трансформация А4 в А3
- iab3* трансформация А3 в А2
- iab2* трансформация А2 в А1

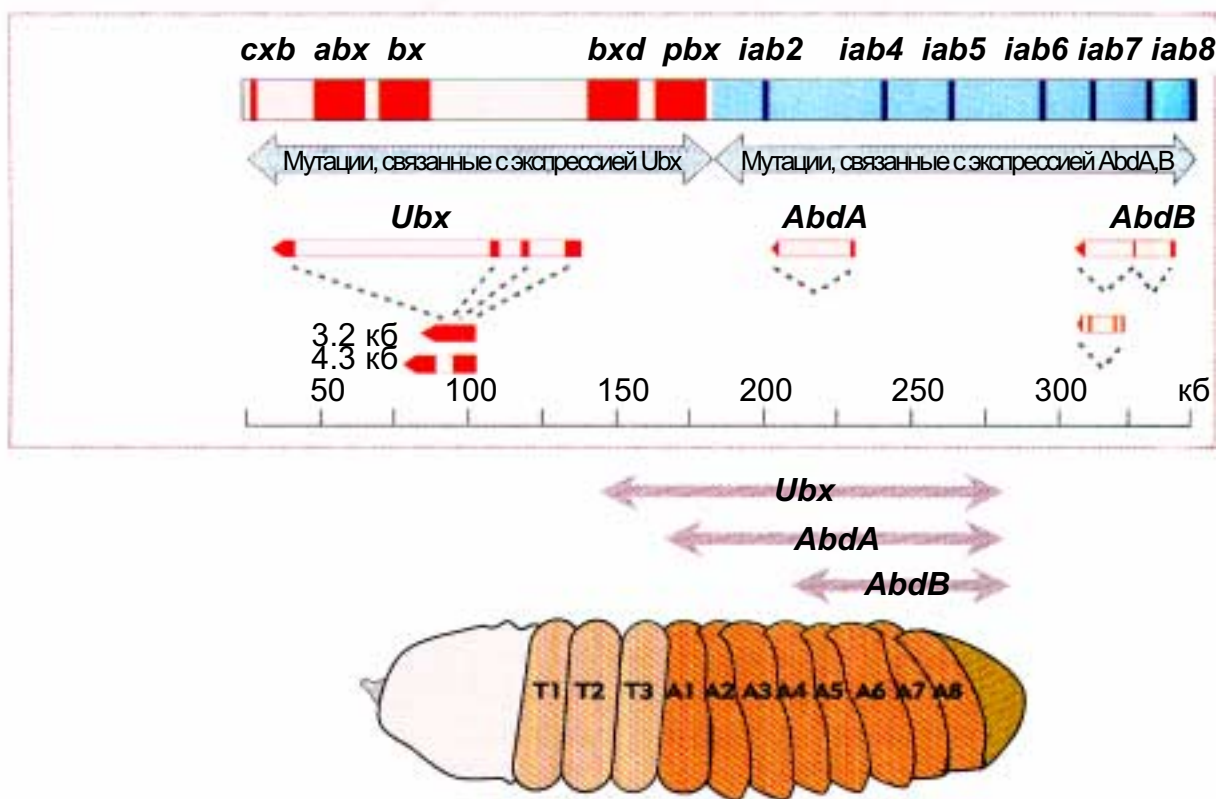


Рис.2.49. Комплекс ВХ-С содержит 3 транскрибирующихся гена. Серия мутаций в регуляторных зонах этих генов вызывают гомеозисные превращения абдоминальных сегментов. Сайты мутаций (делеций, инсерций и транслокаций) показаны на молекулярной карте ВХ-С.

Важнейшая и уникальная характеристика обоих комплексов ANТ-С и ВХ-С, заключается в том, что чем правее расположен ген в комплексе, тем сильнее распространяется его эффект в сторону задних частей тела личинки или имаго, то есть наблюдается **колинеарность в**

линейном расположении генов слева направо в кластере и их экспрессии вдоль передне-задней оси эмбриона. Основным принципом их взаимодействия заключается в том, что для образования любого компартмента требуются генные продукты как гена, расположенного слева и экспрессирующегося в более передних компартментах, так и близлежащего гена, но расположенного правее. Это объясняет эффекты мутаций, выражающиеся в том, что задняя структура (компартмент) развивается по типу более передней. Это хорошо видно на примере действия мутаций

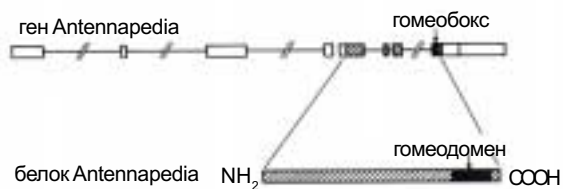


Рис.2.50. Молекулярная организация гена *Antp*. Ген имеет размер более 100 кб и содержит 8 экзонов (показаны светлыми прямоугольниками), разделенными интронами (показаны тонкой линией). Кодированная часть гена заштрихована. Гомеобокс (выделено черным цветом) - высококонсервативный фрагмент ДНК размером 180 п.о., находится в 8-ом экзоне. Гомеобокс кодирует гомеодомен, расположенный вблизи от карбоксильного конца в белке *Antennapedia*.

серии *infraabdominal*: *iab2*, *iab5*, *iab8* вызывают превращение сегментов A2, A5, A8 в A1, A4 и A7, соответственно.

Все гомеозисные гены кодируют ядерные белки, способные связываться с ДНК, и функционируют как транскрипционные факторы. Все эти гены содержат консервативный мотив - **гомеобокс** размером 180 п.о. Ген *Antp*

был один из первых гомеозисных генов, в котором был идентифицирован этот консервативный мотив, и свое название гомеобокс получил от названия этого типа генов. На рис.2.50 оказана схема организации гена *Antp*. Можно видеть, что ген размером 103 тыс.п.о. имеет 8 экзонов, разделенных протяженными интронами. Гомеобокс расположен недалеко от 3'-концу первичного транскрипта. Белковая последовательность, кодируемая гомеобоксом, называется **гомеодоменом** и находится вблизи карбоксильного конца белка *Antennapedia* (рис.2.50). Белок имеет молекулярный вес около 43 000 дальтон. Таким образом, кодирующая часть гена *Antennapedia* занимает всего около 1% полного размера гена. Гомеодомен белка *Antennapedia*, как и всех других гомеобокс-содержащих генов, способен специфически связываться с ДНК по типу виток-поворот-виток ("helix-turn-helix"). Интересно отметить, что гомеобоксы, кодирующие гомеодомены, исключительно консервативны в эволюции. Гомологичные последовательности ДНК найдены практически у всех изученных видов животных с метамерной организацией тела и даже у радиально-развивающихся видов, у которых отсутствует метамерия. Несомненно все гомеобокс-содержащие гены имеют общее происхождение. Это хорошо видно из сравнения первичных структур гомеобоксов. Например, гомеобокс гена *Antp* на 87% гомологичен с таковым гена *Ubx*. Вопросы эволюционного консерватизма гомеозисных генов

Мутантные фенотипы

- lab** дефекты головы
- pb** замещение лабиальных структур антенными
- Dfd** делеция мандибулярных сегментов
- Scr** трансформация T1 в T2
- Antp** трансформация T2-T3 в T1

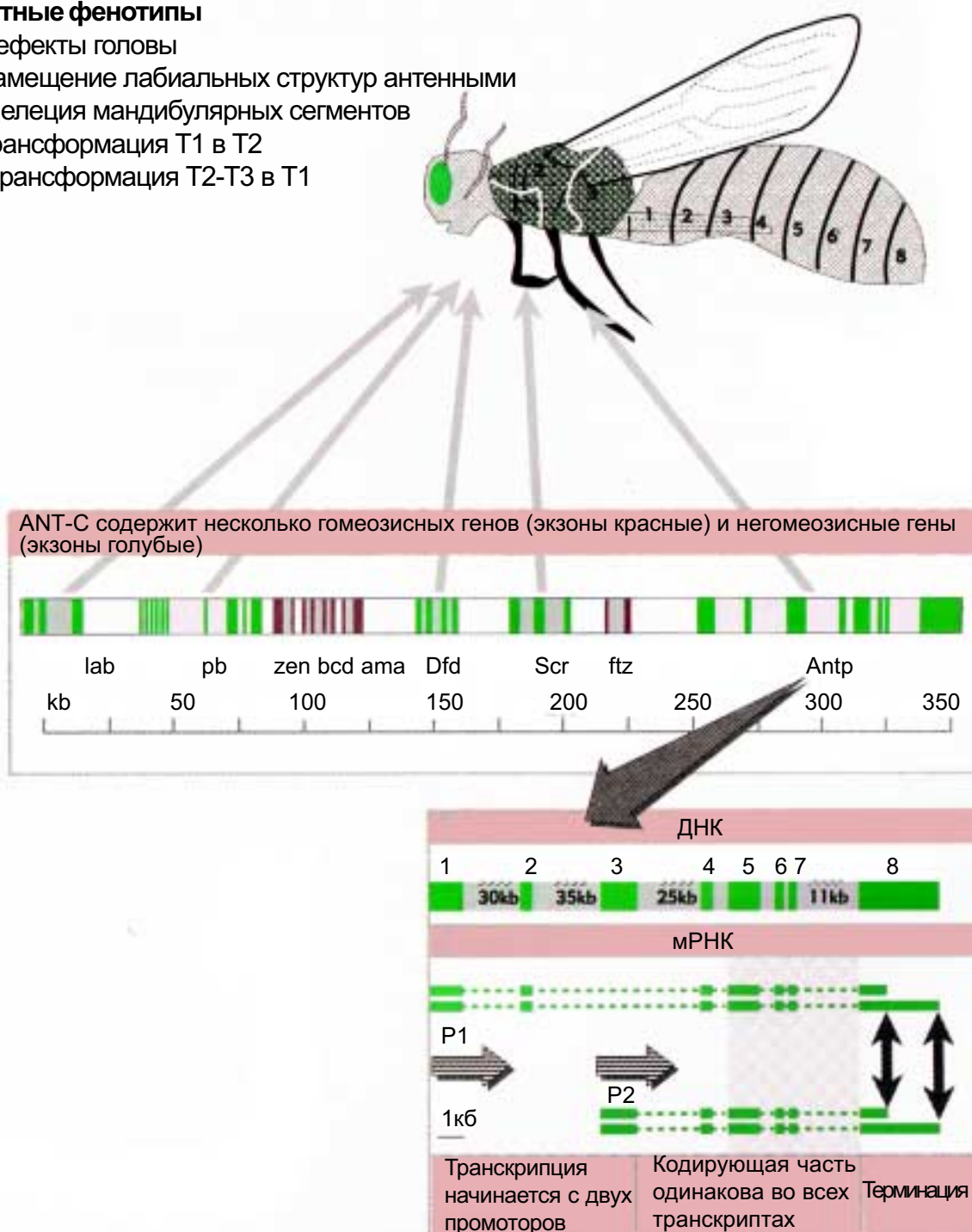


Рис.2.51. Гомеозисные гены комплекса ANT-C определяют дифференцировку передних сегментов. Гены варьируют в размерах и перемежаются другими, негемеозисными генами. Ген *Antp* очень большой и дает альтернативные формы первичных транскриптов.

будут рассмотрены ниже.

Все гомеозисные гены имеют сложную экзон-интронную организацию, (см. выше организацию гена *Antp*), что нехарактерно для большинства генов дрозофилы. Также

зачастую для этих генов характерен сложный путь формирования зрелых иРНК. В качестве примера можно рассмотреть транскрипцию гена *Ubx*. Из рис.2.49 следует, что первичный транскрипт гена *Ubx* размером около

75 kb подвергается альтернативному сплайсингу, и возникает 3 типа иРНК с размерами 3.2 kb, 4.3 kb и 4.7 kb. Впервые транскрипционная активность гена *Ubx* обнаруживается около 3-х часов развития (стадия клеточной бластодермы), причем первоначально появляется транзиторная форма РНК (4.7 kb), которая исчезает к 8-ми часам развития. Несколько позднее появляется 3.2 kb, а затем и 4.3 kb РНК, которые прослеживаются на всех стадиях развития дрозофилы.

Любопытно, что оба последних типа иРНК содержат последовательности обоих концов гигантского первичного транскрипта (1-й и последний экзоны), но различаются тем, что включают последовательности разных внутренних экзонов. Предполагается, что разные формы иРНК гена *Ubx* дифференциально транслируются в разных компартментах. Использование флюоресцентных антител против общей части белков *Ubx* (часть, кодируемая 1-м экзоном) показало его неравномерное распределение вдоль тела эмбриона: слабое свечение в рТ2, сильное в рТ3 и аА1 и постепенное снижение свечения с аА2 к аА8.

Естественно возникает вопрос: как относительное небольшое число гомеозисных генов осуществляют контроль развития индивидуальных сегментов (компаратментов)? Как отмечалось выше, анализ мутаций в комплексах ANTP и BX **позволил выявить функциональную иерархию среди гомеозисных генов.** Наиболее отчетливо существование соподчиненности гомеозисных генов

между собой было выявлено при анализе мутаций локуса *extra sex combs (esc)* (локус оказывает транс-эффект на гомеозисные гены; характеристика транс-регуляторов гомеозисных генов будет рассмотрено позднее). Локус *esc* является членом группы генов *Polyscomb*. Мутации локуса *esc* оказывают дерепрессирующий эффект на гомеозисные гены, что приводит к расширению границ их проявления, то есть за пределы их нормальных доменов. В том случае, когда несколько гомеозисных генов одновременно дерепрессируется под действием *esc*, сегментация протекает под контролем более постериорно-действующих генов. Так у мутантов по локусу *esc* в сочетании с нормальными аллелями всех гомеозисных генов, головные, торакальные и абдоминальные сегменты личинки развиваются по типу А8, то есть под контролем гена *abdB*, имеющего наиболее постериорный фокус действия из всех генов комплекса ВХ. У мутантов-компаундов по *esc* и делеции гена *abdB*, все сегменты личинки развиваются по типу А4, то есть определяются фокусом действия гена *abdA*, который является самым последним функционирующим членом комплекса ВХ у этих компаундов. У компаундов по гену *esc* и делеции всего комплекса ВХ наблюдается развитие всех сегментов по типу торакальных Т2 или Т1, то есть под контролем *Scr* или *Antp*, которые являются крайними функционирующими генами у такого типа компаундов. В случае делеции трех генов ВХ-С и *Scr* с *Antp* из ANTP-С на фоне мутации *esc* у личинки все сегменты превращаются в головные.

Легко заметить, что функционирование гомеозисных генов осуществляется иерархическим способом по типу **Scr < Antp < Ubx < abdA < abdB**, то есть гены расположенные более постериорно являются супрессорами для генов расположенных антериорно (“downregulation”). Также важно отметить, что несмотря на то что комплексы ANT и BX пространственно разообщены и формируют независимые кластеры, функциональная иерархия индивидуальных гомеозисных генов соответствует порядку генов слева направо в обоих комплексах или, иными словами, наблюдается

коллинеарность в функционировании гомеозисных генов и их порядком на хромосоме 3.

Большую роль в понимании, супрессирующего действия постериорных генов в функциональной иерархии гомеозисных генов сыграли эксперименты с введением их дополнительных копий в геном дрозофилы. На рис.2.52 представлены результаты опытов на трансгенных дрозофилах, в геном которых были введены следующие конструкции: а) промотор гена *hsp70* (ген кодирует “heat-shock” белок с молекулярной массой 70 кД), слитый с кодирующей частью гена *Antp*, *hsp-Antp*; б) промотор гена *hsp*, слитый с

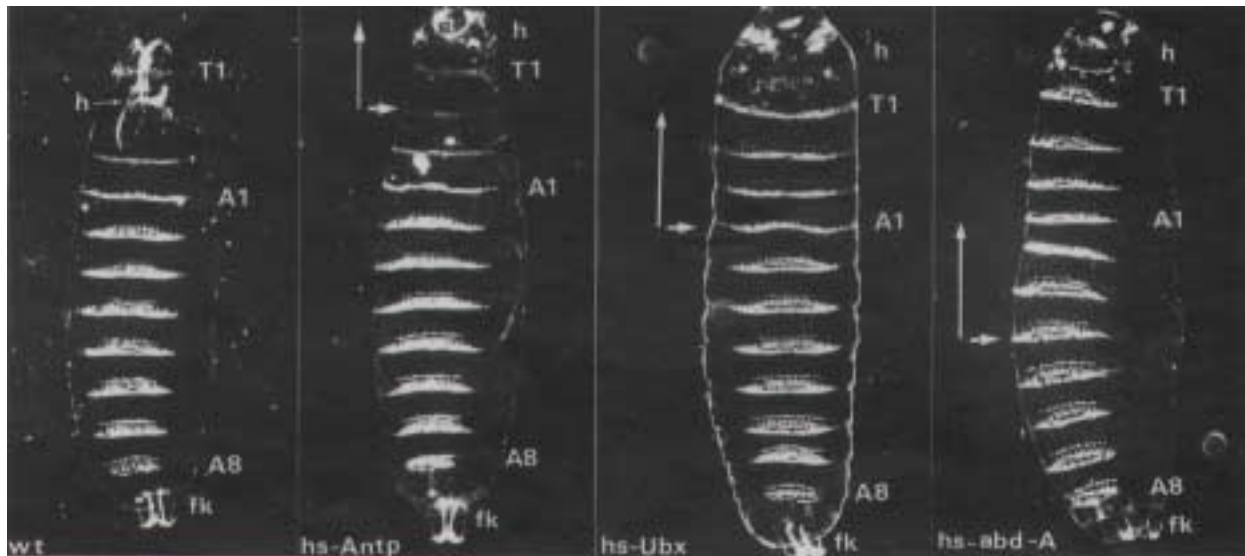


Рис.2.52. Сравнение гомеозисных эффектов трансгенов *hsp70-Antp*, *hsp70-Ubx* и *hsp70-abdA* (см.текст) на формирование сегментов у трансгенных личинок. Стрелками указаны границы морфологических изменений, вызванных эктопической экспрессией генов *Antp*, *Ubx* и *abdA*. У личинки дикого типа (wt) видно, что сегмент T1 расположен впереди головы. (h). Заметно, также, что дентикулы T1 тоньше, чем T2 и что T1 имеет центрально расположенную группу дентикул, которая не представлена в T2. A1 и A8 - абдоминальные сегменты, fk - filzkoper. Эффект трансгена *hsp70-Antp* ограничен районом впереди сегмента T2 (*hs-Antp*). Голова не инвагинирует на стадии бластодермы, и потому эктопическая экспрессия *hs-Ubx* вызывает изменения сегментации в районе, ограниченной A1. Остальные части тела личинки, включая A1, не отличаются от личинки дикого типа. Эктопическая экспрессия *abdA* (*hs-abdA*) вызывает изменения сегментации в районе, находящемся впереди сегмента A4; в фокусе действия трансгена *hs-abdA* все сегменты напоминают A4, что отчетливо видно в случае T1 и T2. У всех трансгенных личинок, включая *filzkoper* абдоминальные сегменты с A5 по A8 не изменены (по Duboule and Morata, 1994).

кодирующей частью гена *Ubx*, *hsp-Ubx*; в) промотор гена *hsp*, слитый с кодирующей частью гена *abdA*, *hsp-abdA*. Согласно структуре этих трансгенов, их экспрессия носит конститутивный характер у трансгенных личинок, если развитие происходит при повышенной температуре. Экспрессия трансгена *hsp-Antrp* проявляется у личинок в превращении T2 в T1 и в отсутствии инвагинация цефалической борозды и, как результат, голова у личинки находится впереди T1, а не позади, как в норме (рис.2.52). Стрелка указывает на границы действия эктопической экспрессии трансгена *hsp-Antrp*. В норме экспрессия гена *Ubx* распространяется от парасегмента 5 до парасегмента 13, с наивысшим ее уровнем в A1 (парасегмент 6). Эктопическая экспрессия трансгена *hsp-Ubx* вызывает трансформацию головных и торакальных сегментов по типу A1, остальные абдоминальные сегменты развиваются нормально (рис.2.52). Эти результаты показывают, что дополнительная эктопическая экспрессия *Ubx* не влияет на развитие сегментов-мишеней гена *Ubx* (парасегменты 5-13), но расширяет фокус своего действия, трансформируя впереди лежащие сегменты (рис.2.52). Интересно, что эктопическая экспрессия *hsp-Ubx* не оказывает влияния на развитие самых задних парасегментов 14 и 15, несмотря на избыточное присутствие в них белка *Ubx*. Как отмечалось выше, в норме белок *Ubx* отсутствует в этих парасегментах. Таким образом, белок *Ubx* морфогенетически неактивен у трансгенных личинок *hsp-Ubx* в этих

парасегментах. Отсутствие фенотипического эффекта трансгена *hsp-Ubx* в парасегментах 14 и 15 связано с репрессивным действием гена *abdB*, поскольку на фоне делеции гена *abdB* морфогенетический эффект трансгена *hsp-Ubx* проявляется. **Иными словами, в основе функциональной инактивации *Ubx* лежит супрессирующий эффект гена *abdB*.** С этим же согласуются данные по экспрессии гена *Ubx* в разных типах клеток. Например, хотя ген *Ubx* экспрессируется в эпидермисе в парасегментах 5-13, однако его экспрессия в висцеральной мезодерме ограничена только 7-ым парасегментом, тогда как экспрессия *abdA* в мезодерме имеет место в парасегментах 8-12. Вероятно, это есть результат репрессивного действия гена *abdA*, поскольку у мутантов по гену *abdA* имеет место экспрессия гена *Ubx* в этих парасегментах. Это супрессирующее действие гена *abdA* реализуется опосредовано. Установлено, что активация гена *Ubx* в клетках мезодермы парасегмента 7 происходит благодаря белку *decapentaplegic (dpp)*. Ген *dpp* неактивен в парасегментах 8-12.

Фундаментальный вывод о функциональной иерархии гомеозисных генов подтверждается экспериментами по эктопической экспрессии трансгена *hsp-abdA*. Из рис.2.52 следует, что избыточная экспрессия гена *abdA* сопровождается превращением головных, торакальных и A1-A3 сегментов в A4. Таким образом, в этом случае также наблюдается супрессирующий эффект постериорно расположенного гена на

функцию всех генов, расположенных “downstream”, то есть с 5` -конца.

Другая группа экспериментальных данных, свидетельствующих в пользу представления о функциональной иерархии гомеозисных генов, была получена при сравнительном изучении действия гомеобокс-содержащих генов в развитии позвоночных. Выше уже отмечалось, что гомеозисные гены содержат консервативную последовательность - гомеобокс, что позволяет идентифицировать гомеобокс-содержащие гены в геномах

организованных в 4 кластера. На рис.2.53 показана схема организации генов мыши и их структурные взаимоотношения с гомеозисными генами дрозофилы. У мыши кластеры НОХА, НОХВ, НОХС и НОХД расположены на хромосомах 6, 11, 15 и 2, соответственно. Размеры кластеров варьируют от 20 до 200 кб. Хорошо видно, что у млекопитающих организация кластеров гомеобокс-содержащих генов мыши, НОХА, НОХВ, НОХС и НОХД, имеет значительное сходство с комплексами генов ANТ-С и ВХ-С. Это прежде всего

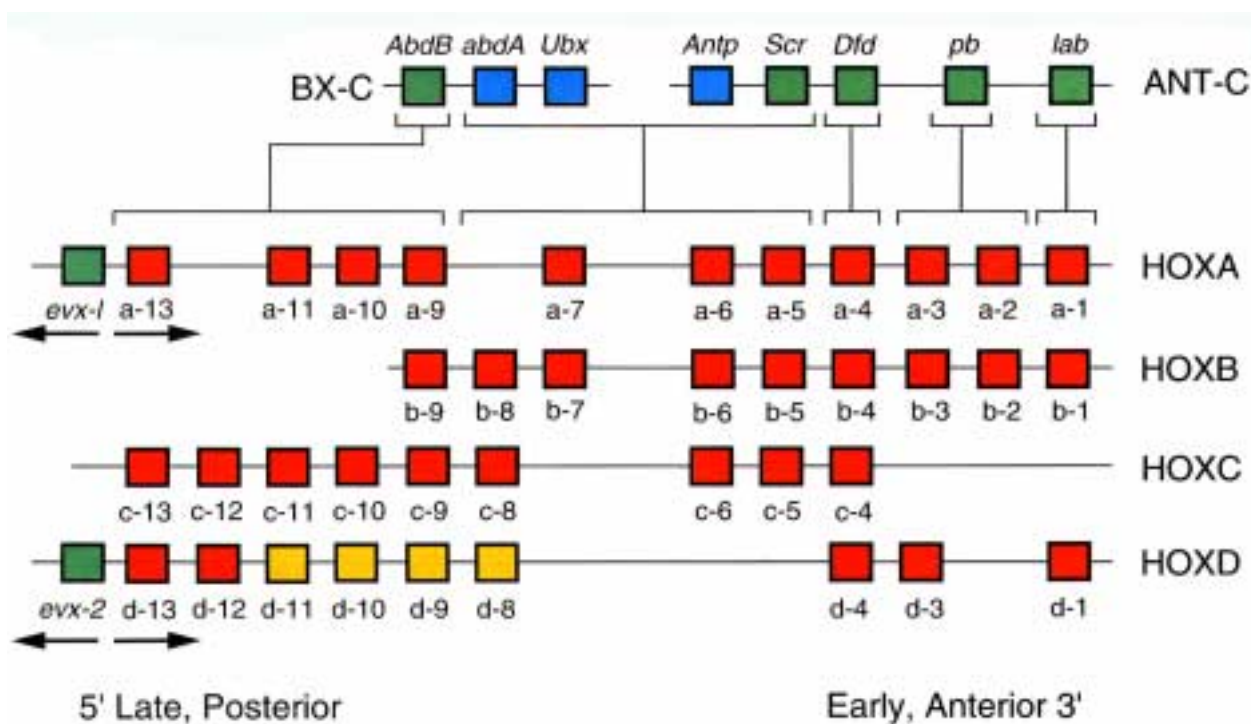


Рис.2.53. Диаграмма, показывающая организацию гомеозисных генов у *D. melanogaster* и у млекопитающих и их филогенетические взаимодействия. Вверху показаны комплекс генов ВХ-С и ANP-С у *D. melanogaster*: Abd B (abdominal B), abdA (abdominal A), Ubx (Ultrabithorax), Antp (Antennapedia), Scr (Sex comb reduced), Dfd (Deformed), pb (proboscipedia) и lab (labial). Четыре кластера гомеобокс-содержащих генов: НОХА, НОХВ, НОХС и НОХД выявлено в геноме млекопитающих. Все гомеобокс-содержащие гены транскрибируются от 5` к 3` концу.

у филогенетически далеких видов. Использование гомеобоксов в качестве зондов позволило выявить в геноме млекопитающих (человек, мышь) 38 гомеобокс-содержащих генов,

касаются сохранения порядка генов, характерного для генома дрозофилы. Это удивительно, поскольку в геноме дрозофилы в комплексе ANТ-С содержатся также гены (bcd, ftz, ama) с

другими типами гомеобоксов, и это предполагает, что в эволюции произошла сложная реорганизация этого участка предкового генома, сопровождавшаяся “аккуратным” вырезанием генов, лишенных гомеозисных функций, но при полном сохранении всех гомеозисных генов. Транскрипция в каждом кластере гомеобокс-содержащих генов у мыши, как и у дрозофилы, осуществляется в направлении слева направо от 5' - к 3' концу (рис.2.53). Можно заметить также, что в процессе эволюции произошли дубликации некоторых членов комплекса гомеозисных генов в геноме млекопитающих. Например, гомеолог гена *pb* дрозофилы представлен в двух копиях, *a-2* и *a-3*, в кластере НОХА, или *b-2* и *b-3* в кластере НОХВ (рис.2.53). Еще большее число копий имеется в геноме мыши генов, гомеологичных гену *AbdV* дрозофилы (4 гена: *a-9*, *a-10*, *a-11* и *a-13*, в кластере НОХА или 5 генов: *c-9*, *c-10*, *c-11*, *c-12* и *c-13*, в кластере НОХС). Однако наиболее впечатляющими являются данные по экспрессии членов семейств НОХА, НОХВ, НОХС и НОХ-С в процессе развития мыши. На рис.2.54 схематически показано распределение первичных транскриптов генов, членов семейства НОХА. Легко можно заметить коллинеарность в распределении этих транскриптов вдоль передне-задней оси эмбриона мыши (на стадии образования сомитов) и в линейном расположении генов в комплексе НОХА. Действие генов, расположенных более постериорно, таких как *a-4*, *a-5* и *a-6*, проявляется в значительной части позвоночного

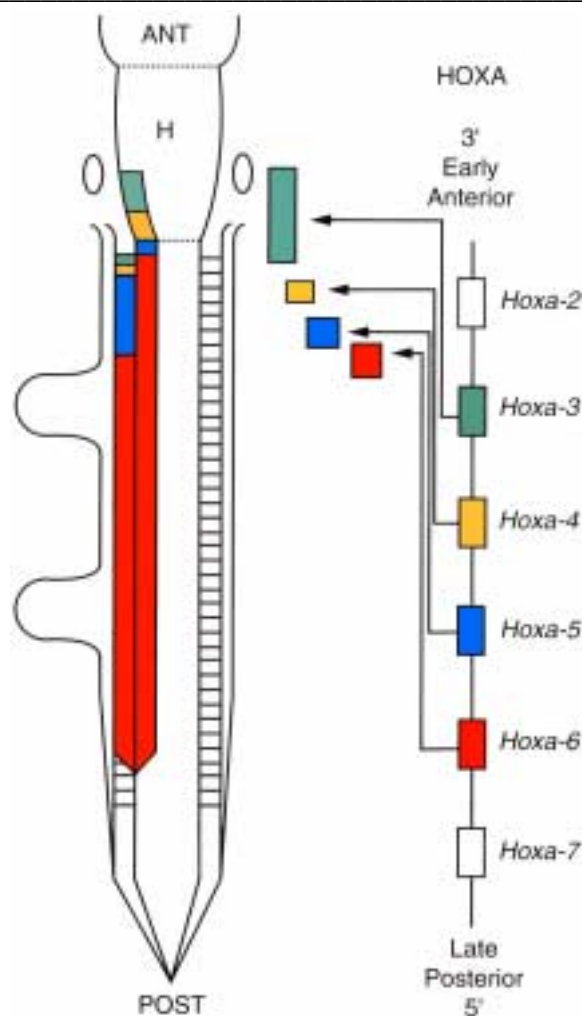


Рис.2.54. Схема экспрессии гомеобокс-содержащих генов, членов комплекса Ноха, вдоль превертебрального зачатка спинного мозга и нейральной трубки эмбриона мыши. Можно видеть коллинеарность расположения генов в комплексе Ноха и распределения первичных транскриптов этих генов вдоль передней (ANT) и задней (POST) оси эмбриона, с преобладанием экспрессии постериорных членов комплекса; в центре рисунка стрелки показывают передние границы распределения генов Ноха 2-6.

столба, но не затрагивает передней его части и не распространяется на закладку заднего мозга (рис.2.54). Наоборот, фокус действия гена НОХА-3 ограничен закладкой заднего мозга и крайней передней частью позвоночного столба (рис.2.54). Из рис.2.54 также видно преобладание экспрессии постериорных генов над

генами, расположенными более антериорно.

Недавно получены прямые доказательства эволюционного консерватизма функциональной иерархии между НОХ генами, прослеживающейся от дрозофилы до млекопитающих. Кодированные части мышечных генов *Hoxd-8*, *Hoxd-9*, *Hoxd-10* и *Hoxd-11* были “слиты” с промотором *heat-shock* гена (*hsp70*) и введены в геном дрозофилы. Действие генов мышцы, находящихся под контролем промотора *hsp70*, на развитие трансгенных мух показано на рис.2.55. Экспрессия *Hoxd-8* и *Hoxd-9* предотвращает инволюцию головы и трансформирует один головной сегмент, но не нарушает развития торакальных и абдоминальных сегментов (рис.2.55). Экспрессия *Hoxd-10* у трансгенных личинок вызывает трансформацию торакальных сегментов, но не абдоминальных, тогда как экспрессия *Hoxd-11* нарушает развитие абдоминальных структур (рис.2.55). Эти данные показывают коллинеарность экспрессии гомеобокс-содержащих генов мышцы у трансгенных мух, то есть более постериорно экспрессирующиеся гены у мышцы оказывают свой эффект также на постериорные структуры трансгенных дрозофил.

В настоящее время отсутствуют надежные данные о механизмах такого контроля. Общие представления базируются на предположении, что имеющиеся количественные различия в распределении гомеобокс-содержащих белков вдоль передне-задней оси эмбриона потенциально могут обусловить дифференциальный

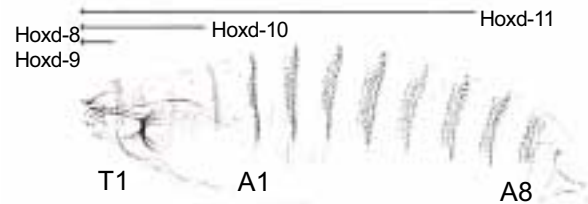


Рис.2.55. Районы личинки *D. melanogaster* испытывающие влияние трансгенов, состоящих из кодирующих частей генов *Hoxd-8*, *Hoxd-9*, *Hoxd-10* и *Hoxd-11* мышцы и промотора гена белка *heat-shock*. Фокусы действия этих трансгенов отмечены линиями *Hoxd-8*, *Hoxd-9*, *Hoxd-10* и *Hoxd-11*. Эффект *Hoxd-8* и *Hoxd-9* вызывает трансформацию одного головного сегмента и предотвращает инволюцию головы, но отсутствует эффект на торакальные и абдоминальные сегменты. Экспрессия *Hoxd-10* вызывает трансформацию торакальных сегментов, но не абдоминальных, в то время как эффект *Hoxd-11* распространяется и на абдоминальные сегменты.

ответ генов-”мишеней” (“target genes”), как это описано выше для детерминации пространственных границ действия генов сегментации. Несомненно также, что в регуляции гомеозисных генов принимают участие гены сегментации и даже материнские гены. Например, изменяется экспрессия гена *Ubx* у мутантов по генам *bicoid*, *hunchback* и *Krüppel*. В определении передней границы этого гена принимает участие гены сегментации *fushi tarazu* и *even-skipped*.

Картина регуляции гомеозисных генов еще более усложняется, если принять во внимание существование достаточно большого набора генов (**более 20**), которые влияют на их экспрессию транс-способом. В таблице 2.5 приведен список таких генов. Как следует из данных этой таблицы, все эти гены относятся к

Таблица 2.5. Транс-регуляторные гены, влияющие на экспрессию гомеозисных генов.

Ген	Локализация
Гаплонедостаточные	
Asx - additional sex combs	51AB
Psc - posterior sex combs	49EF
Pd - Polycomb-like	3-47
Pc - Polycomb	
Scm - Sex comb on mid leg	85EF
ph - polyhomeiotic	2D2-4
Ubl - Unltrabithorax-like	
Гаплонедостаточные с материнским эффектом	
exc - extra sex combs	33B1.2
sxc - super sex combs	2-55

группе гаплонедостаточных: делеции по этим генам в гетерозиготном состоянии не обеспечивают нормального развития и ведут себя как эмбриолетали. Эта категория генов более или менее равномерно распределена по геному дрозофилы (таблица 2.5). Эффекты трансдействующих генов на сегментацию разнообразны: например, мутации Pc и esc вызывают трансформацию всех торакальных и абдоминальных сегментов в A8, тогда как мутации Asc, Pcl, Psc и Scm вызывают лишь частичную трансформацию задних абдоминальных сегментов. Однако, в последнем случае двойные мутанты (компаунды по этим генам) зачастую имеют фенотип, сходный с Pc. Это может указывать **на синергичность действия этих генов.**

Транс-регуляция экспрессии гомеозисных генов осуществляется разнообразными способами. Например, доминантная мутация гена Ubl, локализованного в X-хромосоме, имитирует мутацию Ubx. Однако в гомозиготном состоянии мутация проявляется как леталь и без каких

либо гомеозисных превращений. Более того некоторые аллели гена Ubl также не вызывают гомеозисных эффектов. В настоящее время известно, что ген Ubl кодирует одну из субъединиц РНК-полимеразы II, необходимую для транскрипции. Так как гомеозисным эффектом обладает лишь один аллель гена Ubl, а нуль-аллели им не обладают, предполагается, что этот единственный гомеозисный аллель обуславливает синтез измененного фермента, который в свою очередь оказывает влияние на транскрипцию гена Ubx. Этот вывод подтверждается тем, что этот аллель снижает скорость транскрипции и других негемозисных генов, локализованных в других хромосомах. Вероятно, транскрипция гена Ubx более чувствительна к измененной активности фермента, чем другие гомеозисные гены.

В настоящее время установлена функция гена Pc, этот ген кодирует белок, который преимущественно (если не исключительно) связывается с гетерохроматином посредством хромодомена. Такая функция гена Pc предполагает репрессирующий

характер действия белка Pc на активность многих генов, включая гены комплекса ВХ-С.

Прогресс в исследовании молекулярных механизмов действия гомеозисных генов вскрыл новые пути регуляции и взаимодействия гомеозисных и негемеозисных генов. Например, недавно показано, что нога и антенна являются в некотором роде гомологичными структурами и различия между ними возникают благодаря действию гена *Antr*, который репрессирует гены *extradenticle (exd)* и *homothorax (hth)*, детерминирующие развитие антенны. Гены *exd* и *hth* содержат гомеобоксы, но другого типа, нежели гомеозисные гены. Нарушение функции гена *exd* или *hth* вызывает превращение антенны в ногу, причем это может происходить без активации гена *Antr*. Любопытно, что мышинный гомолог гена *hth* (*Meis1*) сохраняет эту функцию; эктопическая экспрессия гена *Meis1* вызывает трансформацию анальной пластинки в антенну и аристы. Можно ожидать, что в ближайшие годы будут расшифрованы молекулярные механизмы действия гомеозисных генов и будет понят принцип их иерархичной регуляции.

Список рекомендуемой литературы

- Айала Ф., Кайгер Дж.* Современная генетика. “Мир”, Москва, 1988.
- Гилберт С.* Биология развития. т.1, “Мир”, Москва, 1993.
- Рэфф Р., Кофман Т.* Эмбрионы, гены и эволюция. “Мир”, Москва, 1986.
- Ashburner M.* *Drosophila*. A Laboratory Handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Duboule D., Morata G.* Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. Trends in Genetics, v.10, pp 358-364 (1994).
- Foe V.E.* Mitotic domains reveal early commitment of cells in *Drosophila* embryos. Cell, v.107, pp 1-22 (1989).
- Gehring W.J.* Imaginal discs: determination. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*. Eds. M.Ashburner and T.R.F.Wright. Academic Press, New York. Vol.2c, pp 511-554.
- Fullilove L.S., Jacobson A.G., Turner F.R.* Embryonic development: descriptive. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*. Eds. M.Ashburner and T.R.F.Wright. Academic Press, New York. Vol.2c, pp 103-228 (1978).
- Hadorn E.* Transdetermination. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*. Eds.M.Ashburner and T.R.F.Wright. Academic Press, New York. Vol.2c, pp 555-617 (1978).
- Illmensee K.* Developmental potencies of nuclei from cleavage, preblastoderm, and syncytial blastoderm transplanted into unfertilized eggs of *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux’s Archiv, v.170, pp 267-298 (1972).
- Illmensee K.* The potentialities of

transplanted early gastrula nuclei of *Drosophila melanogaster*. Production of their imago descendants by germ-line transplantation. Wilhelm Roux's Archiv, v.171, pp 331-343 (1973).

Ingham P.W. The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. Nature, v.335, pp 25-34 (1988).

Mahowald A.P., Hardy P.A. Genetics of *Drosophila* embryogenesis. Annual Review of Genetics, v.19, pp 149-177, (1985).

Nusslein-Folhard C. Gradient that organizes embryo development. Scientific American, August, pp 38-43 (1996).

Spradling A.C. Developmental genetics of oogenesis. In: Development of *Drosophila melanogaster*. Ed. Bate Martinez Arias, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 1-70 (1993).

Zalokar M. Transplantation of nuclei in *Drosophila melanogaster*. Proceedings of National Academy of Sciences of USA, v.68, pp 1539-1541.