

Генетические взаимодействия аллелей локуса *Delta* с мутациями, нарушающими развитие крыла у *Drosophila virilis*. 2. *Delta* и мутации, связанные с избытком жилок крыла

И. А. Козерецкая, О. В. Жук

Киевский университет имени Тараса Шевченко
Ул. Владимирская, 64, Киев, 01017, Украина

У D. virilis обнаружены фенотипические взаимодействия мутантного аллеля локуса Delta с мутациями, вызывающими избыток материала жилок крыла: Branched, truckee. Результатом этих взаимодействий является усиление пенетрантности и экспрессивности мутантного фенотипа Delta.

Введение. Важную роль в развитии многоклеточных организмов играют межклеточные взаимодействия. Один из путей таких взаимодействий состоит из элементов так называемой *Notch*-сигнальной системы [1]. Белки, аналогичные белкам группы *Notch*, выявлены у многих видов животных [1]. Для *D. melanogaster* известно, что *Notch*-сигнализация участвует в процессах развития центральной и периферической нервной системы, оогенезе, дифференциации клеток мышц, крыла и глаза [2]. В последние годы активно изучается роль *Notch*-сигнальной системы в образовании пластинки крыла у *Drosophila* [2–10].

Группа *Notch* включает, кроме *Notch* (*N*), также гены *Delta* (*Dl*), *Enhancer of split* (*E(spl)*), *deltex* (*dx*), *Hairless* (*H*), *Suppressor of Hairless* (*Su(H)*) и другие локусы [5]. Активный поиск генов — компонентов этого пути и генов — регуляторов *Notch*-сигнализации и сегодня остается одной из важных проблем в генетике дрозофилы.

Центральными компонентами этой системы, основу функционирования которой составляют процессы латерального ингибирования и индуктивной сигнализации, являются белки, кодируемые генами *Notch* и *Delta* [5].

DELTA выступает лигандом, единственным известным рецептором которого считается белок *NOTCH* [9]. Происходящие в имагинальных дисках процессы формирования крыла при условии нормальной работы этих белков обеспечивают образование двух популяций клеток: клеток межжилкового пространства, выбирающих первичную эпидермальную судьбу, и клеток жилки, судьба которых считается вторичной [10]. Модификации мутантных фенотипов *Dl* обусловлены сложными механизмами дифференцировки клеток. Особи *D. melanogaster*, гетерозиготные по мутантным аллелям *Dl* и *N*, причиной возникновения которых является отсутствие или нарушение функций этих генов, характеризуются заметным увеличением числа клеток, формирующих жилку (утолщения жилки, дельтообразные наплывы на жилках у края крыла).

Мутации, вызванные усилением активности этих генов, например *Abruptex* (*Ax*), приводят к уменьшению числа клеток жилки (отсутствие части жилок) и увеличению числа эпидермальных клеток между жилками, причем при введении в геном одного нуля-аллеля *Dl* жилки у *Ax*-мутантов частично или полностью восстанавливаются [10–13]. Изучая генетические взаимодействия мутаций локуса *Dl* с мутантными аллелями разных генов, обнаруживающих нарушения процессов дифферен-

цировки клеток этих двух типов, можно судить об участии указанных генов в общих с *Dl* метаболических сигнальных системах. Анализ таких взаимодействий широко используется для поиска новых компонентов *Dl-N* сигнального пути и выяснения роли DELTA-лиганда в механизмах межклеточного общения [2—6]. В настоящей работе мы изучали генетические взаимодействия *Dl* с крыловыми мутациями, характеризующимися избытком материала жилок крыла (*Branched* (*B*), *truckee*^{*}).

Материалы и методы. В работе использована коллекция крыловых мутантов *D. virilis*, полученная из Института биологии развития РАН (Москва) и Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Подробная характеристика этих линий приведена в табл. 1.

Для изучения взаимодействий *Dl* с другими крыловыми мутациями получали мух, несущих мутацию *Dl* в комбинации с мутациями генов, влияющих на фенотип крыла. Были синтезированы линии, *Dl*-особи которых имели генотип: *Dl/+; B³/B³* (на основе линий 107 и *Dl¹⁶⁷*); *Dl/+; B⁵/B⁵* (на основе линий 169 и *Dl¹⁶⁷*) и *Dl/+; truckee/truckee* (на основе линий *truckee* и *Dl¹⁶⁷*). Линии поддерживали посредством массовых скрещиваний при температуре 25 °С.

Особенности *Dl*-фенотипа крыла анализировали не менее чем у 100 особей в каждой линии, учитывая характерные для фенотипа *Dl*-особей наплывы у края крыла на продольных (L2—L5) и поперечных (C1—C2) жилках, а также модификации *B* и *truckee* мутантных фенотипов в присутствии мутантного аллеля *Dl*. В качестве контроля учитывали особенности фенотипа жилок у особей *Dl^r*, присутствующих среди потомков соответствую-

ющего скрещивания. Поскольку мы не наблюдали никаких модификаций в проявлении признаков у таких особей во вновь синтезированных линиях по сравнению с исходными, результаты этих контрольных вариантов не приводятся и не обсуждаются. Сравнение частоты проявления признака в разных линиях проводили с помощью метода χ^2 [14].

Результаты. В опытах использованы два разных аллеля локуса *Branched* (*B³*, *B⁵*).

Delta в комбинации с *B³*. Чтобы выяснить, существуют ли взаимодействия между *Dl* (рис. 2, а) и *B³* (рис. 1, б), мы синтезировали линию, в которой присутствовали особи, гомозиготные по *B³* и гетерозиготные по *Dl* (*Dl/+; B³/B³*) (рис. 2, б). Особи этой линии характеризуются резким увеличением пенетрантности и экспрессивности мутантного *Dl*-фенотипа (рис. 2, б; табл. 2). Частота встречаемости дельт на продольных жилках крыла практически равна 100 %. На поперечных жилках она выше, чем у линии *Dl¹⁶⁷*. Дельтовидный наплыв на жилке L2 увеличивается и почти полностью занимает маргинальную ячейку между L1 и L2. Часто его размеры настолько велики, что в дистальной части L2 он сливается с жилкой L3, образуя общий наплыв. Между жилками L3 и L4 наплывы всегда отсутствуют. Расширения жилок L4 и L5, сливаясь, также образуют огромный наплыв между L5 и краем крыла. Кроме того, между L4 и L5 иногда возникают дополнительные поперечные жилки (рис. 2, б). Значительное число крыльев (82,5±2,3 %) изменяется в той или иной степени, обнаруживая характерные для молодых имаго структуры, напоминающие пузыри, которые впоследствии (после вытекания из них гемолимфы)

Таблица 1
Список линий, использованных в скрещиваниях

Линия	Мутация			Фенотип
	Символ	Название	Локализация	
167	<i>Dl</i>	<i>Delta</i>	2—45,0	Дельтовидные наплывы на L2 и иногда на других продольных и поперечных жилках (рис. 2, а)
107	<i>B³**</i>	<i>Branched</i>	5—141,0	Разветвление жилок (рис. 1, б)
169	<i>B⁵</i>	<i>Branched</i>	5—141,0	Разветвление жилок (рис. 1, в)
<i>Truckee</i>	—	—	—	Слабое разветвление L2 и иногда других жилок (рис. 1, г)

*Рецессивная мутация, выделенная из линии дикого типа *Truckee*. Характеризуется незначительным расширением жилок (рис. 1, г), имеет неполную пенетрантность, не локализована; **в скрещиваниях ведет себя, как рецессивная мутация.

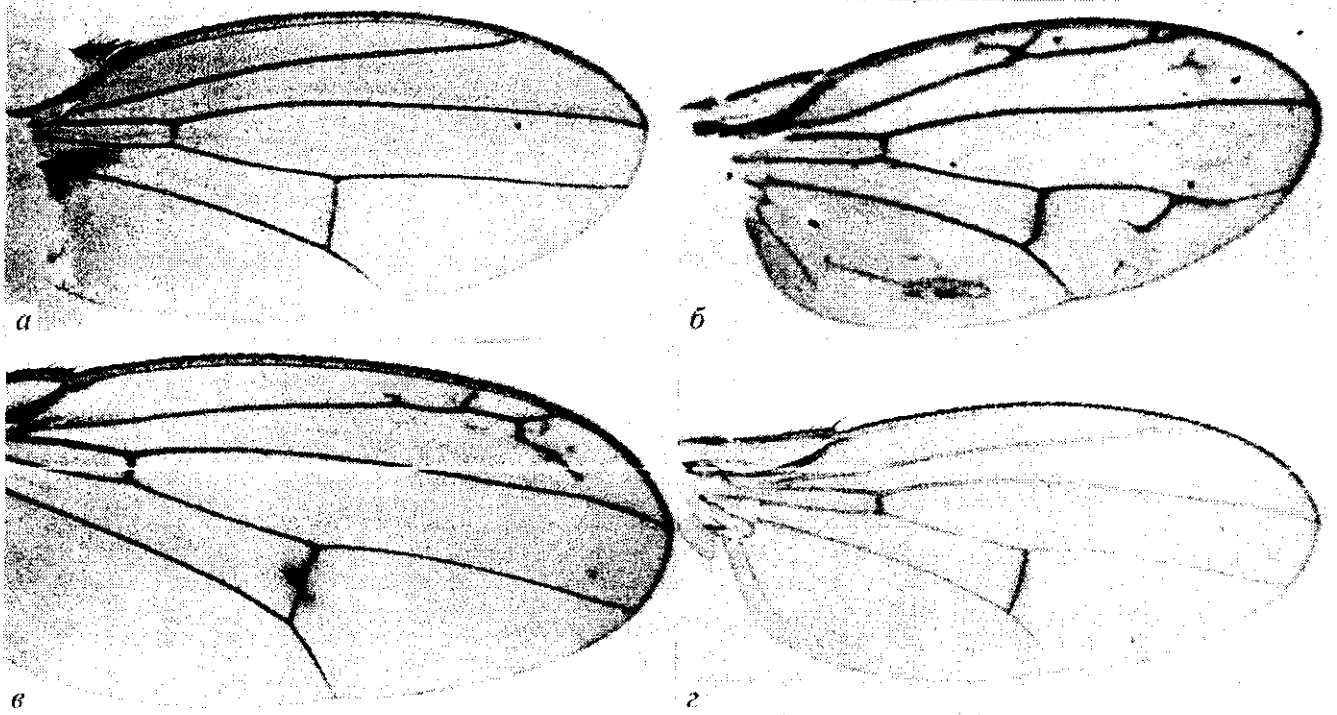


Рис. 1. Фенотипы крыла у особей исходных линий (табл. 1): крыло мух дикого типа с указанием расположения продольных L1—L5 и поперечных C1, C2 жилок (а, линия 9) и обнаруживающих мутации крыла: B^3 (б, линия 107), B^5 (в, линия 169), *truckee* (г)

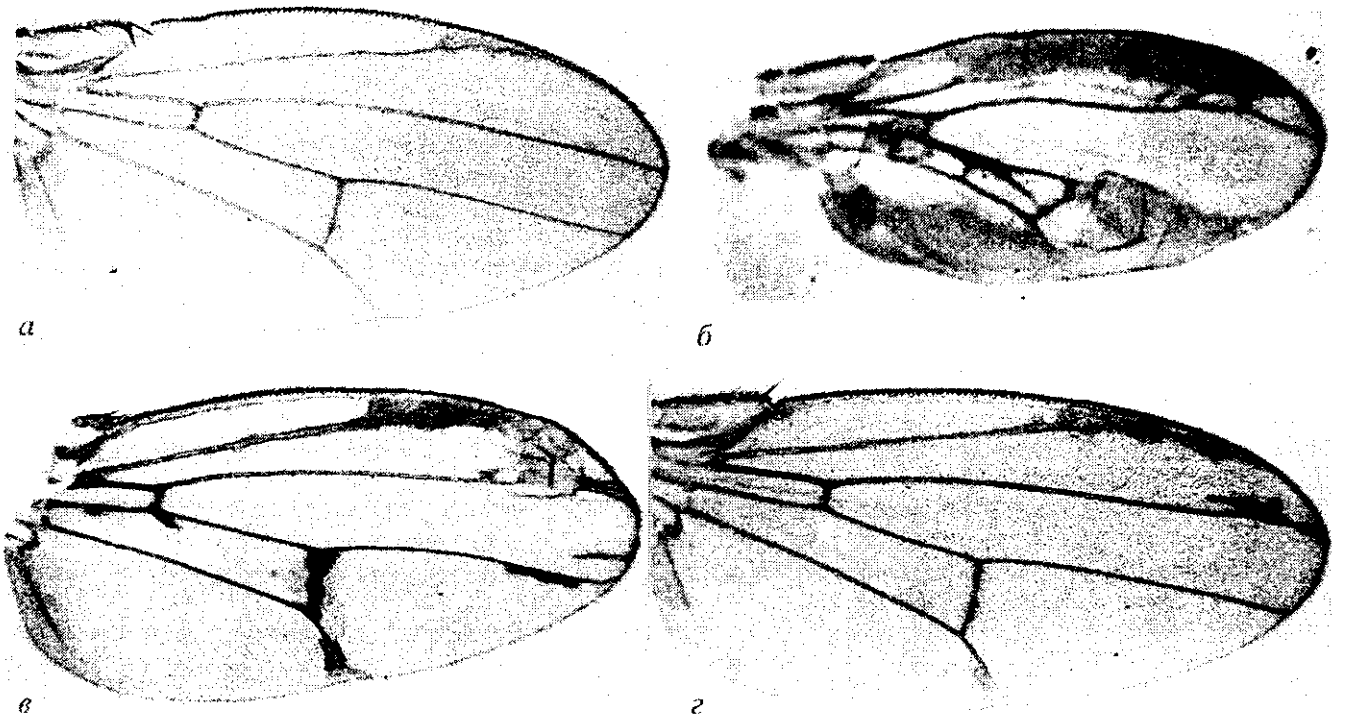


Рис. 2. Фенотипы крыла у особей с генотипом: $Dl/+$ (а), $Dl/+; B^3/B^3$ (б), $Dl/+; B^5/B^5$ (в), $Dl/+; truckee/truckee$ (г)

Таблица 2

Особенности распределения наплывов на жилках крыла у особей, гетерозиготных по *Dl* и гомозиготных по мутациям генов, связанных с избытком жилок крыла

Линия (генотип)	Общее число особей	Число особей, имеющих наплывы только на								
		L2			L3			L4		
		с	л	п	с	л	п	с	л	п
<i>Dl/+</i>	100	100	—	—	15	4	9	2	2	1
<i>Dl/+; B³/B³</i>	100	100	—	—	—	—	1	100	—	—
<i>Dl/+; B⁵/B⁵</i>	100	100	—	—	100	—	—	100	—	—
<i>Dl/+; truckee/truckee</i>	100	100	—	—	38	7	8	80	3	4

Линия (генотип)	Общее число особей	Число особей, имеющих наплывы только на								
		L5			C1			C2		
		с	л	п	с	л	п	с	л	п
<i>Dl/+</i>	100	75	9	8	24	9	3	1	—	—
<i>Dl/+; B³/B³</i>	100	100	—	—	87	3	2	15	9	7
<i>Dl/+; B⁵/B⁵</i>	100	100	—	—	100	—	—	100	—	—
<i>Dl/+; truckee/truckee</i>	100	98	—	—	90	1	1	24	1	10

выглядят, как деструктурированные изменения соответствующих участков крыла взрослых мух (рис. 2, б).

Delta в комбинации с *B⁵*. В F_2 от скрещивания линий 169 и *Dl*⁶⁷ получены особи, гомозиготные по *B⁵* и гетерозиготные по *Dl* (*Dl/+; B⁵/B⁵*) (рис. 2, в). Фенотип особей, возникающих в результате взаимодействия *Dl* и *B⁵*, так же, как и при взаимодействии *Dl* с *B³*, характеризуется повышенной пенетрантностью и экспрессивностью проявления наплывов. Степень выраженности признака на L2 напоминает таковую у вышеописанного аллеля этого локуса (рис. 2, в). Пенетрантность наплывов на всех жилках крыла составляет 100 %. А степень выраженности признака гораздо меньше, чем в случае взаимодействия с *B³*. Отмечены (60,0±3,5 %) крылья, которые характеризуются наличием «пузырей». Между L3 и L4, а также между L1 и L2 возникают дополнительные поперечные жилки (рис. 3).

Delta в комбинации с *truckee*. У особей, гомозиготных по *truckee* и гетерозиготных по *Dl*, наблюдается повышенная частота встречаемости наплывов на жилках крыла (табл. 2), что является

несомненным результатом генетических взаимодействий *Dl* и *truckee*. Экспрессивность этого признака заметно возрастает лишь на жилках L2 и C1. Отмечены также и другие изменения жилок — узелки, наплывы и в 4 % случаев — «пузыри» (рис. 4).

Обсуждение. Гены *N*-сигнального пути контролируют выбор клеточных судеб у многоклеточных организмов, обеспечивая способность недифференцированных клеток отвечать на сигналы дифференцировки и пролиферации. Известно, что у *Drosophila* локусы *Notch* и *Delta* среди множества функций отвечают и за формирование пластинки и края крыла [6]. В этой работе мы изучали генетические взаимодействия *Dl* с генами, мутантные аллели которых приводят к избытку материала жилок, и что очень важно, принадлежность которых к *Dl-N* метаболическому пути пока не доказана. Наблюдаемые нами модификации фенотипа совершенно однозначно свидетельствуют о существовании таких взаимодействий: обнаружены изменения размеров наплывов и частоты их встречаемости на разных жилках крыла (рис. 2), а также некоторые другие особенности фенотипа (рис. 2), т.

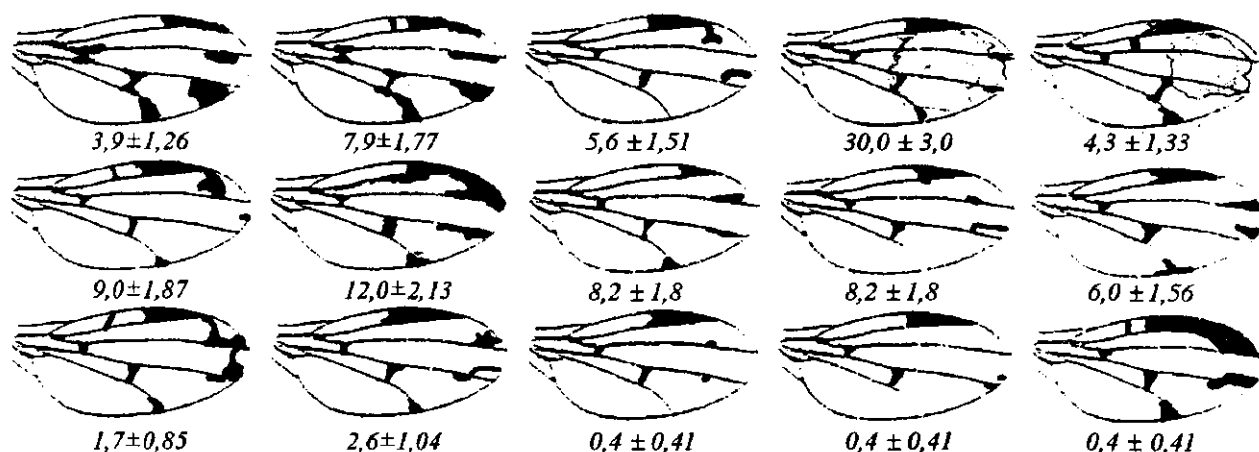


Рис. 3. Схематическое изображение фенотипов жилок крыла у особей с генотипом $Dl/+; B^5/B^5$ и частота встречаемости крыльев с разными фенотипами (%)

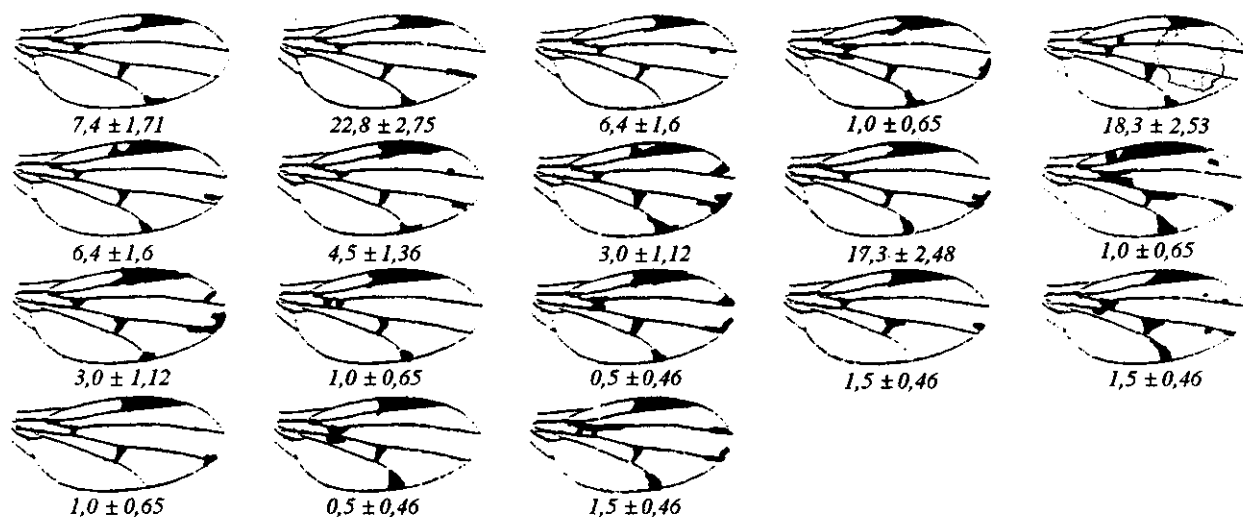


Рис. 4. Схематическое изображение разнообразия фенотипов крыла у особей с генотипом $Dl/+; truckee/truckee$ и частота встречаемости крыльев с разными фенотипами (%)

е. происходит явное перераспределение числа клеток, выбирающих судьбу клеток жилки и клеток межжилкового пространства.

Характер взаимодействия локусов B и Dl неза-

висимо от типа аллеля B имеет общую тенденцию к увеличению популяции клеток жилок. Однако степень выраженности этих взаимодействий явно зависит от «силы» мутантных аллелей локуса B :

чем больше степень разветвления жилок у аллеля *B*, вступающего во взаимодействие с *Dl*-аллелями, тем больше у потомков наплывы и, следовательно, популяция клеток жилки. Фенотип *truckee* характеризуется незначительным расширением жилки (часто — черточки) L2 в районе ее соединения с L1, и результатом ее взаимодействия с *Dl* является повышение пенетрантности признака «дельта» и незначительное усиление его экспрессивности. Поскольку мутации локуса *B* и *truckee* усиливают мутантный фенотип *Dl*, можно предположить, что аллель дикого типа гена *B* и *truckee* является положительным регулятором *N*-сигнального пути. Даже если они непосредственно не участвуют в *N*-сигнализации, то метаболические пути, использующие функцию этих локусов, могут по-видимому, пересекаться.

При взаимодействии мутаций локуса *Dl* с таковыми, вызывающими избыток материала жилок, всегда с той или иной частотой (от 82,5+2,3 % в случае *B*³, и до 4 % в случае с *truckee*) возникают пузыреобразные изменения крыла. Как нам кажется, они могут быть связаны с нарушением дифференциации жилок при увеличении материала последних: чем больше популяция клеток жилки у особи определенной линии, тем выше частота встречаемости таких «пузырей».

При изучении взаимодействия локуса *Dl* с генами, отвечающими за формирование жилок крыла, все используемые в скрещиваниях мутантные аллели были условно разделены на две группы: 1) группа генов, мутации которых приводят к недостатку материала жилок, к укорочению либо отсутствию жилок; 2) мутации, вызывающие появление избыточных жилок и увеличение популяции клеток жилок крыла. Наличие в геноме дрозофил одновременно мутаций гена *Dl* и мутаций 1-й группы, с одной стороны, усиливает пенетрантность наплывов (*Dl*-мутантный фенотип), а с другой — наблюдается частичное или полное восстановление продольных и поперечных жилок крыла [15, 16]. Взаимодействие мутаций локуса *Dl* с мутациями, вызывающими разветвление жилок, приводит к значительному усилению экспрессивности и пенетрантности наплывов.

Наблюдаемые нами эффекты полностью соответствуют представлениям о роли *N*-сигнальной системы в процессах дифференцировки жилок, где нормальная функция *Dl* необходима для ограничения числа клеток, выбирающих судьбу клеток жилки, а нарушение или отсутствие функции *Dl* приводит к увеличению числа клеток жилки [12]. Как можно было ожидать, в наших опытах мутации локуса *Dl* действительно оказались способными

корректировать фенотип у аллелей первого типа и усугублять дефекты жилок, связанные с проявлением мутаций второго типа.

Однако механизмы взаимодействия вышеописанных крыловых мутаций с мутациями локуса *Dl* могут быть выяснены лишь в дальнейших исследованиях на молекулярном и генетическом уровнях.

Авторы выражают глубокую благодарность И. С. Губенко за помощь и консультации при выполнении этой работы, а также В. Митрофанову (ИВР, Москва) и М. Б. Евгеньеву (ИМБ, Москва) — за предоставление коллекции крыловых мутантов.

И. А. Козерецкая, О. В. Жук

Генетичні взаємодії алелів локусу *Delta* з мутаціями, що порушують розвиток крила у *Drosophila virilis*. 2. *Delta* та мутації, що призводять до надлишку жилок крила

Резюме

У *D. virilis* виявлено фенотипові взаємодії мутантного алеля локусу *Delta* з мутаціями *Branched* та *truckee*, що викликають надлишок жилок крила. Результатом цієї взаємодії є підсилення пенетрантності та експресивності мутантного фенотипу *Delta*.

I. A. Kozeretzkaya, O. V. Zhuk

Genetic interactions of *Delta* locus allele with the wing development mutations in *Drosophila virilis*. 2. *Delta* and the mutations causing the wing vein excess

Summary

In *Drosophila virilis* neurogenic gene *Delta* interacts with mutations causing the wing veins excess: *Branched* and *truckee*. The basic result of this interaction is the penetrance and expressivity of the mutant *Delta* phenotype enhancement.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray S. A Notch affair // Cell.—1998.—93.—P. 499—503.
2. Fostier M., Evans D. A. P., Artavanis-Tsakonas S., Baron M. Genetic characterization of the *Drosophila melanogaster* Suppressor of *deltex* gene: A regulator of Notch signaling // Genetics.—1998.—150.—P. 1477—1485.
3. Micchelli C. A., Rulifson E. J., Blair S. S. The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role of *Delta* and *Serrate* // Development.—1997.—124.—P. 1485—1495.
4. Abu-Issa R., Cavicchi S. Genetic interactions among *vestigial*, *hairy*, and *Notch* suggest a role of *vestigial* in the differentiation of epidermal and neural cells of the wing and halter of *Drosophila melanogaster* // J. Neurogenetics.—1996.—10.—P. 239—246.
5. Doherty D., Feger G., Younger-Shepherd S., Yeh Jan L., Nung Jan Y. *Delta* is ventral to dorsal signal complementary to *Serrate*, another Notch ligand in *Drosophila* wing formation // Genes and Development.—1996.—10.—P. 421—434.
6. Majumdar A., Nagaraj R., Banerjee U. *strawberry* notch encodes a conserved nuclear protein that functions downstream of Notch and regulates gene expression along the developing

- wing margin of *Drosophila* // Genes and Development.—1997.—11.—P. 1341—1353.
7. Campos-Ortega J. A., Knust E. Genetics of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster* // Annu. Rev. Genet.—1990.—24.—P. 387—407.
 8. Fleming R. J., Gu Y., Hukriede N. A. Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene *fringe* in the dorsal compartment of the *Drosophila* wing imaginal disc // Development.—1997.—124.—P. 2973—2981.
 9. Diaz-Benjumea F. J., Cohen S. M. Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing // Development.—1995.—121.—P. 4215—4225.
 10. Murata T., Ogura K., Murakami R., Okano H., Yokoyama K. K. *hitrangi*, a gene essential for wing development in *Drosophila melanogaster*, affects the Notch cascade // Genes Genet. Syst.—1996.—71.—P. 247—254.
 11. Young M. W., Wesley C. S. Diverse roles for the Notch receptor in the development of *D. melanogaster* // Perspectives on Developmental Neurobiol.—1997.—4.—P. 345—355.
 12. Muskavitch M. A. T. Delta-Notch signaling and *Drosophila* cell fate choice // Develop. Biol.—1994.—166.—P. 415—430.
 13. de Celis J. F., Barrio R., Arco A., Garcia-Bellido A. Genetic and molecular characterization of Notch mutation in its Delta and Serrate binding domain in *Drosophila* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90.—P. 4037—4041.
 14. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях.—М.: Медицина, 1975.—С. 135—143.
 15. Губенко И. С., Суббота П. П., Козерецкая И. А., Вагин Ю. В. Локус Delta у *Drosophila virilis*: аллели, фенотипы крыла, генетические взаимодействия // Цитология и генетика.—1998.—32, № 5.—С. 22—34.
 16. Козерецкая И. А., Жук О. В. Генетические взаимодействия аллелей локуса Delta мутациями, нарушающими развитие крыла у *Drosophila virilis*. 1. Delta мутации, связанные с отсутствием жилок крыла // Биополимеры и клетка.—1999.—15, № 3.—С. 230—236.

УДК 595.773.4

Поступила в редакцию 20.07.99