

О.В. ЖУК, И.А. КОЗЕРЕЦКАЯ

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев

E-mail: olga\_zhuk@univ.kiev.ua

E-mail: kozer@univ.kiev.ua

## ГЕН MINIATURE У *DROSOPHILA VIRILIS*: МАТЕРИНСКИЙ ЭФФЕКТ И ЭВОЛЮЦИОННЫЙ КОНСЕРВАТИЗМ



Проведено сравнительное исследование двух мутантных аллелей гена *miniature* *Drosophila virilis*. Определено цитологическое расположение локуса *miniature* на политенных хромосомах *Drosophila virilis* с использованием последовательностей *Drosophila melanogaster*, что подтверждает высокий уровень его эволюционного консерватизма. Продемонстрировано, что присутствие функционального белка *Min* необходимо для оплодотворения, поскольку самки, гомозиготные по одному из аллелей, продуцируют неоплодотворенные яйца, которые аномально располагаются на поверхности питательной среды. Установлено температурочувствительное влияние другого аллеля на жизнеспособность особей. Проведен поиск взаимодействующих генов среди компонентов *Notch*-сигнального пути.

© О.В. ЖУК, И.А. КОЗЕРЕЦКАЯ, 2007

**Введение.** Наружные покровы насекомых по сравнению с эпидермисом позвоночных характеризуются достаточно простой организацией. Эпидермис *Drosophila* представляет собой монослой эпителиальных клеток, в то время как у позвоночных — это многослойное образование, в состав которого входят две ткани различного происхождения [1]. Другим важным отличием является наличие у насекомых кутикулы, которая обеспечивает жесткость наружных покровов и защиту от внешних факторов. Ту же роль у позвоночных выполняют промежуточные филаменты (кератины) совместно с рядом других белков. Однако несмотря на такие существенные отличия, в генетический контроль развития эпителиальных тканей вовлечены эволюционно консервативные сигнальные системы. Те же сигнальные пути, которые контролируют дифференциацию эпидермиса у *Drosophila*, определенным образом участвуют в морфогенезе эпидермиса позвоночных [2]. Стоит также отметить, что при достаточно простой организации эпителиальных тканей у насекомых сохраняются такие их характеристики, как полярность клеток и наличие межклеточных контактов [1].

Крыло насекомого представляет собой два взаимодействующих слоя эпителия, клетки которых в процессе развития неоднократно изменяют свою форму, создавая, в частности, специфический паттерн кутикулярных выростов на наружной поверхности [3]. Такая простая организация стала причиной того, что крыло широко используется как генетическая модель для изучения развития и дифференциации эпидермальных тканей у *Drosophila*. Описан ряд мутаций, свидетельствующих об очевидной роли некоторых белков в дифференциации клеток крыла, но не понятны конкретные процессы, в которые они вовлечены. У *Drosophila virilis* известны крыловые мутации *miniature* и *dusky*, которые у *Drosophila melanogaster* объединяют в *m-dy* комплекс. Эти гены характеризуются сходным фенотипом мутаций (уменьшенный размер клеток крыла), близкой локализацией на хромосоме. Они кодируют гомологичные трансмембранные белки, содержащие так называемый *zona pellucida* (ZP) домен [4]. Обычно ZP белки у других видов функционируют как структурные (компоненты межклеточного матрикса) или действуют как рецепторы. Белки *Min* и *Dy* дрозофилы вовлечены

в процесс формирования кутикулы крыла, а уменьшенный размер клеток связан с нарушением реорганизации апикальной мембраны во время дифференциации — процесса, включающего изменение актинового цитоскелета [4]. Однако на данный момент неизвестно, какую именно роль выполняют белки Min и Du в дифференциации крылового эпителия и с какими компонентами известных сигнальных систем они взаимодействуют.

В настоящей работе рассматриваются два мутантных аллеля *miniature Drosophila virilis*, для одного из которых установлен материнский эффект. Кроме того, изучено влияние аллелей на жизнеспособность особей, определена цитологическая локализация генов *miniature* и *dusky*, а также проведен поиск взаимодействующих мутаций.

**Материалы и методы.** Линии *Drosophila virilis*. Линии, полученные в системе гибридного дисгенеза у *Drosophila virilis*, содержат разные мутантные аллели гена *miniature* —  $m^{42}$  и  $m^{G1}$ . Использовали линию дикого типа 9 природной популяции г. Батуми в определенных типах скрещиваний для определения жизнеспособности. Взаимодействия генов изучали на фенотипическом уровне, получая линии двойных мутантов на основе ряда линий, а именно *Dl*, *gpL2* (*gap*), *cv* (*crossveinless*), *Odd*<sup>22</sup>.

**Исследование материнского эффекта мутантного аллеля  $m^{G1}$ .** Виргинных гетерозиготных и гомозиготных по  $m^{G1}$  самок скрещивали с самцами  $m^{G1}$ . Самок после их полного созревания высаживали на чашки Петри со стандартной средой на 1 ч. Далее родителей удаляли, наблюдая развитие эмбрионов под стереоскопическим микроскопом, перенося их в камеру с минеральным маслом [5]. Стадии развития определяли по Campos-Ortega [6]. Анализ редукции гонад взрослых самок проводили, просматривая под стереомикроскопом выделенные яичники.

**Клонирование фрагментов генов *miniature* и *dusky Drosophila melanogaster*.** Выделяли суммарную мРНК из личинок дикого типа первого и второго возраста с использованием Trizol («Invitrogen»). Нарабатывали фрагмент гена *miniature* длиной 875 п.о. (используя праймеры 5'-TTGCCACTGCCTGTTACCGT-3', 5'-CGCAGGATTCACACGCATA-3') и гена *dusky* — 421 п.о.

(5'-CATaagcttAAGCCAAACGAAACGGAACG-3', 5'-TTTgaattcCAATTCCGAATCGAAATC-3') методом RT-PCR [7]. Фрагменты были клонированы в EcoRI/HindIII-pBS («Stratagene», США) и секвенированы с использованием PE Applied Biosystems Prism 310 Genetic Analyzer.

**Гибридизация *in situ* на политенных хромосомах.** Для приготовления давленных препаратов политенных хромосом выделяли слюнные железы личинок дикого типа третьего возраста, развивающихся при температуре 18 °С, в капле 45%-ной уксусной кислоты [8]. Меченные биотином фрагменты получали путем ник-трансляции с биотинилированными dUTP и детектировали авидин-связанной пероксидазой хрена (ABC Vectastain kit (Vector Lab)), далее проявляли обработкой с диаминобензидином. Хромосомы были прогибридизованы с каждым зондом отдельно. Локализацию проводили по цитогенетическим картам политенных хромосом *Drosophila virilis* [9].

**Результаты исследований.** В системе гибридного дисгенеза были получены два мутантных аллеля гена *miniature*, обозначенные нами как  $m^{42}$  и  $m^{G1}$ . К общим характеристикам обоих аллелей относится ряд признаков. Во-первых, обе мутации рецессивные, сцепленные с полом. Оба аллеля проявляются в уменьшении пластинки крыла в 1,4 раза по сравнению с крылом дикого типа. Для мутаций такого типа у *Drosophila melanogaster* известно, что уменьшение пластинки связано с уменьшением размера клеток крыла. Подсчет количества клеток по щетинкам в определенных участках крыла особей  $m^{42}$  и  $m^{G1}$  показал, что это справедливо и для мутаций *Drosophila virilis*. Кроме того, клетки крыла мутантов *miniature*, в отличие от дикого типа, имеют видимые в световой микроскоп границы. Для обеих мутаций также характерно наличие округлых структур (*nvs*) в жилках. Исследование их природы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии показало, что они представляют собой неравномерные утолщения кутикулярных слоев [10]. У особей, мутантных по  $m^{42}$  и  $m^{G1}$ , край крыла имеет волнистую форму, что, вероятно, связано с несоответствием между количеством материала жилок и межжилкового пространства.

В результате скрещивания самок  $m^{42}$  с самцами  $m^{G1}$  в первом поколении были получены

самки с признаками мутации *miniature*. Таким образом, исследуемые аллели действительно являются мутациями одного и того же гена, комплементарными друг другу.

Для особей, мутантных по одному из аллелей —  $m^{42}$ , была показана зависимость некоторых показателей от температуры развития. На основе скрещиваний нескольких типов было показано, что жизнеспособность гемизиготных самцов-мутантов не снижена по сравнению с самцами дикого типа при 18 °С (таблица). Однако при температуре 25 °С она снижается на  $17,09 \pm 2,72$  %. Жизнеспособность гомозиготных самок и гемизиготных самцов одинакова при 18 °С, но при 25 °С соотношение полов сдвигается в сторону увеличения количества самок. Однако при 25 °С нет разницы между выживаемостью гетерозиготных самок и самцов дикого типа, при 18 °С такая разница появляется. Для контроля (особи дикого типа) оказалось характерным смещение соотношения полов в сторону увеличения количества самок при обеих температурах развития в равной мере. Если данная тенденция справедлива и для линии  $m^{42}$ , то на основе полученных соотношений можно сделать вывод о том, что жизнеспособность гемизиготных самцов и гетерозиготных самок  $m^{42}$  при 25 °С снижена, а эффект мутации смягчается при более долгом развитии мутантных особей.

Жизнеспособность особей  $m^{G1}$  была также проанализирована на основе двух типов скрещиваний и только при температуре 25 °С. При скрещивании гетерозиготных самок и гемизи-

готных самцов (таблица) было получено четыре класса особей: гетерозиготные и гомозиготные самки, гемизиготные самцы и самцы дикого типа. Наблюдается небольшое отклонение в количестве самок и самцов разного типа, однако оно не является статистически достоверным. Скрещивания самок дикого типа с самцами  $m^{G1}$  также не показали достоверного отклонения в выживаемости гетерозиготных самок по сравнению с самцами дикого типа. Таким образом, мы не установили существенного влияния аллеля  $m^{G1}$  на жизнеспособность мух.

С момента получения мутации была обнаружена неспособность самок  $m^{G1}$  к продукции потомства. У *Drosophila melanogaster* известны мутантные линии *miniature*, самки которых описывались как стерильные [11]. Однако детальные исследования в этом направлении не проводились. Следует отметить лишь работу, в которой были обнаружены транскрипты гена *miniature* в яичниках самок дикого типа [12]. Нами показано, что на развитие самок и их гонад мутация  $m^{G1}$  не оказывает влияния, однако продукт гена необходим на ранних стадиях развития эмбриона, что характерно для генов с материнским эффектом.

Мы проанализировали степень развития гонад мутантных самок, не обнаружив никаких нарушений. Дальнейшее исследование проводили, высаживая взрослых гетеро- и гомозиготных мутантных самок после суточного оплодотворения с самцами  $m^{G1}$  на чашки Петри. Первая особенность яиц, отложенных гомозиготными самками, — это их горизонтальное положение

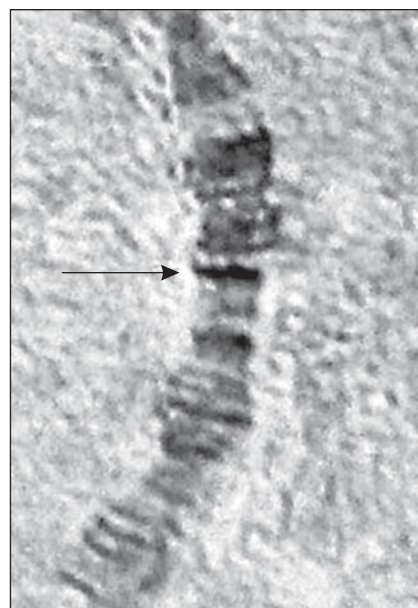
Соотношение полов в потомстве различных скрещиваний линий 9 (дикий тип) и аллелей *miniature* при различной температуре

Схема скрещивания	Температура, °С	Количество самок		Количество самцов		1:1 ( $\chi^2_{\tau} = 3,84$ )
		<i>m</i>	w.t	<i>m</i>	w.t	
9 × 9	25	0	690	0	597	6,7
9 × 9	18	0	189	0	144	6,1
$m^{42} \times m^{42}$	25	519	0	445	0	5,7
$m^{42} \times m^{42}$	18	1177	0	1126	0	1,1
9 × $m^{42}$	25	0	484	0	448	1,4
9 × $m^{42}$	18	0	538	0	468	4,9
$m^{42}/+ \times m^{42}$	25	0	1083	330	398	69,6
$m^{42}/+ \times m^{42}$	18	0	1235	511	514	19,51
$m^{G1}/+ \times m^{G1}$	25	301	340	237	257	1,18/0,4
9 × $m^{G1}$	25	0	373	0	318	2,18

на поверхности питательной среды, в то время как яйца, отложенные гетерозиготными самками, полностью погружаются в среду, на поверхности остаются только филаменты. Таким образом, характер расположения яиц определяется не их собственным, а материнским генотипом. Дальнейшее наблюдение за эмбрионами проводили через некоторые промежутки времени в камере под минеральным маслом. Было обнаружено, что просмотренные яйца не развиваются, внутреннее их содержимое со временем становится неоднородным — делится на желток и масляные капли, что характерно для неоплодотворенных яиц. На основании этих наблюдений можно предположить, что белок Min синтезируется в материнских гонадах и является необходимым компонентом определенных оболочек яйца, способствуя его оплодотворению.

Для уточнения цитогенетической карты политенных хромосом *D. virilis* была проведена гибридизация *in situ* с биотин-мечеными зондами, созданными на основе клонированных фрагментов генов *miniature* и *dusky* *D. melanogaster*. Использование последовательностей *D. melanogaster* в качестве зондов для локализации генов-гомологов *D. virilis* также имело смысл для установления эволюционного консерватизма определенных генных участков. Клонированная нами последовательность гена *miniature* длиной 875 пар оснований (222–1096 п.о. мРНК) соответствует участку наиболее консервативного и функционально важного домена — *zona pellucida* (ZP). В результате проведенной на политенных хромосомах линии дикого типа гибридизации *in situ* с биотинилированным фрагментом был обнаружен один сайт гибридизации в первой хромосоме, в районе 12A (рисунок). Такая локализация гена хорошо согласуется с данными, полученными на основе рекомбинационного анализа (78,0 сМ). Факт гибридизации последовательностей *D. melanogaster* и *D. virilis* свидетельствует о высокой степени их гомологии в районе функционального домена. Данный вывод в свою очередь позволяет предположить сходное функционирование гена у этих двух видов, а именно его роль при оплодотворении.

Фрагмент гена *dusky* *D. melanogaster*, использованный нами в качестве зонда для гибридизации



*In situ* гибридизация на политенных хромосомах *Drosophila virilis* с биотинилированным фрагментом гена *miniature* *Drosophila melanogaster*

ции *in situ*, составлял 421 п.н. (155–576 мРНК). Его последовательность оказалась не столь уникальной, как в случае с геном *miniature*: было обнаружено 8 сайтов гибридизации в X-хромосоме. Интересно отметить, что такое же количество сайтов наблюдалось на политенных хромосомах у *D. melanogaster*. Поскольку у *D. melanogaster* гены *miniature* и *dusky* составляют *m-dy* комплекс, так как имеют близкую хромосомную локализацию и кодируют гомологичные белки, функционирующие в процессе формирования кутикулы крыла, можно предположить, что ген *dusky* у *D. virilis* также будет расположен неподалеку от *miniature*. Таким локусом, где действительно наблюдается гибридизация, является 12B, однако по уровню гибридизации он не был наиболее сильным среди остальных.

Крыло дрозофилы является уникальной моделью для изучения роли различных эволюционно консервативных путей сигнальной трансдукции, генетических взаимодействий и отдельных генов в процессах развития. *Notch*-сигнальная система осуществляет регуляцию ряда ключевых процессов развития, в частности выбор клетками мезодермы нейрального или эпидермального пути развития на ранних эта-



пах эмбриогенеза и детерминацию жилок крыла в имагинальных дисках в процессе морфогенеза. Известна также экспрессия этих генов в фолликулярных клетках на ранних стадиях развития яйца. Исходя из этого, был осуществлен поиск генетических взаимодействий как с ключевым компонентом этой сигнальной системы, геном *Dl*, так и с позитивными (*gp*, *cv*) и негативными (*Odd<sup>22</sup>*) регуляторами активности *N*-сигнализации. У всех полученных нами двойных мутантов развитие эмбрионов протекает без изменений, а фенотип крыла характеризуется наличием как признаков *m*, так и *Dl*, *Odd<sup>22</sup>*, *gp L2*, *cv* одновременно, что свидетельствует об отсутствии генетических взаимодействий в процессе формирования крыла между геном *m* с одной стороны и *Dl*, *Odd<sup>22</sup>*, *gp L2*, *cv* с другой.

**Обсуждение полученных данных.** Эволюционный консерватизм механизмов, регулирующих формирование эпителиальных тканей, показан в работах многих авторов [2]. Механизмы формирования крыла дрозофилы детально изучены, в то время как процессы оплодотворения насекомых изучены сравнительно мало, но, по-видимому, они также характеризуются определенным сходством у позвоночных и насекомых. Белки, содержащие ZP домен, участвуют в различных процессах в организме млекопитающих. В контексте нашей работы внимание привлекают в первую очередь гликопротеины ZP1, ZP2 и ZP3. ZP3 функционирует как рецептор, распознающий сперматозоид и запускающий акросомальную реакцию. ZP2 также исполняет роль рецептора и усиливает взаимодействие сперматозоида и ZP3. Оба белка, совместно с ZP1, формируют белковые филаменты, являясь также и структурными компонентами *zona pellucida* [13]. Мы предполагаем, что белок Min подобным образом может быть задействован в процессе оплодотворения либо функционируя как рецептор, либо выполняя структурную функцию. Принимая во внимание высокий уровень консерватизма последовательностей *miniature* у *D. melanogaster* и *D. virilis*, полагаем, что полученные результаты, вероятно, справедливы и для гена *miniature D. melanogaster*.

Остается открытым вопрос о том, какие гены функционируют совместно с *miniature* и в

процессе формирования кутикулы крыла, и во время регуляции оплодотворения. Поиск компонентов формирования кутикулы, по-видимому, следует проводить среди факторов, кодирующих компоненты цитоскелета или регуляторов его динамики. В первую очередь, в развитии эпителия на разных стадиях развития (как эмбриональной, так и личиночной) участвуют гены *Wnt* сигнального пути [14], и, возможно, именно они являются наиболее вероятными претендентами на роль регуляторов активности *miniature*.

**SUMMARY.** Comparative analysis of two mutant alleles of gene *miniature* in *Drosophila virilis* has been performed. The cytological position of *miniature* gene on salivary gland chromosomes of *Drosophila virilis* using *Drosophila melanogaster* sequence was localized that suggests the high level of the evolutionary conservatism of this gene. The necessity of the functional Min protein for fertilization has been shown. Mutant females produced unfertilized eggs that had the abnormal position on the medium surface. One of the alleles is characterized by temperature sensitive influence on the viability. The search for possible interactions among the genes of *Notch* signal pathway has been performed.

**РЕЗЮМЕ.** Проведено порівняльне дослідження двох мутантних алелів гена *miniature Drosophila virilis*. З використанням послідовностей *Drosophila melanogaster* визначено цитологічне розташування локуса *miniature* на політенних хромосомах *Drosophila virilis*, що свідчить про високий рівень еволюційного консерватизму цього гена. Продемонстровано, що присутність функціонального білка *miniature* необхідна для запліднення, оскільки самки, гомозиготні за одним з алелів, продукують незапліднені яйця, які аномально розташовуються на поверхні поживного середовища. Встановлено температурочутливий вплив іншого з алелів на життєздатність особин. Серед компонентів *Notch* сигнального шляху проведено пошук взаємодіючих генів.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muller H. A. Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila* // Dev. Dyn. – 2000. – 218. – P. 52–67.
2. Payre F. Genetic control of epidermis differentiation in *Drosophila* // Int. J. Dev. Biol. – 2004. – 48. – P. 207–215.
3. Fristrom D., Wilcox M., Fristrom, J. The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development // Development. – 1993. – 117. – P. 509–523.
4. Roch F., Alonso C.R., Akam M. *Drosophila miniature*

- and *dusky* encodes ZP proteins required for cytoskeletal reorganisation during wing morphogenesis // J. Cell Sci. — 2003. — **116**. — P. 1199–1207.
5. Roberts D.B. *Drosophila* a practical approach. — Oxford : Univ. press, 1986. — 414 p.
  6. Campos-Ortega J.A., Hartenstein V. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. — Springer, 1997. — 405 p.
  7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. — 2222 p.
  8. Lim J.K. *In situ* hybridisation with biotinylated DNA // *Drosophila Inf. Serv.* — 1993. — **72**. — P. 73–77.
  9. Gubenko I., Evgen'ev M. Cytological and linkage maps of *Drosophila virilis* chromosomes // *Genetica*. — 1982. — **65**. — P. 127–139.
  10. Kozeretcka I., Gubenko I., Gorb S. New unusual *miniature*-like wing mutation in *Drosophila virilis* // J. Morphol. — 2004. — **219**. — P. 270–275.
  11. Newby L.M., White L., DiBartolomeis S.M. et al. Mutational analysis of the *Drosophila miniature-dusky (m-dy)* locus: effects on cell size and circadian rhythms // *Genetics*. — 1991. — **128**. — P. 571–582.
  12. Jazwinska A, Affolter M. A family of genes encoding zona pellucida (ZP) domain proteins is expressed in various epithelial tissues during *Drosophila* embryogenesis // *Gene Exp. Patterns*. — 2004. — **4**. — P. 413–421.
  13. Bork P., Sander C. A large domain common to sperm receptor (Zp2 and Zp3) and TGF- $\beta$  type III receptor // *FEBS Lett.* — 1992. — **300**. — P. 237–240.
  14. Hatini V., DiNardo S. Divide and conquer: pattern formation in *Drosophila* embryonic epidermis // *TRENDS in Genetics*. — 2001. — **17**. — P. 574–579.

Поступила 13.07.06