

И.С. ГУБЕНКО¹, Р.П. СУББОТА¹, Е.С. ЗЕЛЕНЦОВА²

¹ Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

² Институт молекулярной биологии
Академии наук Российской Федерации, Москва
E-mail: maliuta@imbg.org.ua

***Notch*¹²², МУТАЦИЯ ЛОКУСА *Notch*
ТИПА *ABRUPTEX*
У *DROSOPHILA VIRILIS* :
ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ**



Природа и функциональные особенности аллелей Notch типа Abruptex до сих пор не выяснены. У дрозофилы в известных Abruptex линиях обнаруживается высокий уровень фенотипического полиморфизма аллелей. Кроме мутантов с отсутствием функции Notch, присутствуют гипоморфные, гиперморфные, антиморфные аллели, которые часто обнаруживают усиленную клеточную пролиферацию и нарушения процессов дифференцировки клеток крыла. Считается, что аллели Abruptex могут служить моделью для изучения причин и последствий наследственных заболеваний у человека (в том числе CADASIL), которые, как можно предположить, связаны с модификациями активности Notch и взаимодействиями генов в Notch сигнальной системе.

© И.С. ГУБЕНКО, Р.П. СУББОТА, Е.С. ЗЕЛЕНЦОВА, 2010

Введение. Notch белки — это семейство больших, активируемых лигандами трансмембранных рецепторов.

Гены, связанные с Notch сигнализацией (N-сигнализацией), известны как эволюционно консервативные компоненты эукариотических организмов и как важные регуляторы процессов развития и дифференцировки клеток [1, 2]. Нормальная функция Notch необходима в оогенезе, при формировании нервной системы, при спецификации клеток глаза, мышц, а также в ходе других многочисленных процессов развития тканей и органов [2–6].

У дрозофилы N-сигнализация регулирует дифференцировку клеток нервной системы, глаза, крыла, щетинок. Одной из самых характерных особенностей Notch сигнальной системы является обилие разных механизмов, используемых для активации и регуляции функций этого локуса. Центральными компонентами Notch сигнализации являются белок клеточной поверхности Notch (N) и его лиганды Delta и Serrate. У дрозофилы белок N содержит 36 EGF (Epidermal Growth Factor) повторов, подобных эпидермальному фактору роста [2]. Два из них, а именно повторы 11 и 12, необходимы для связывания Notch с его лигандами Delta и Serrate.

Генетический и молекулярный анализы позволили обнаружить многочисленные мутации локуса N; даже единичные аминокислотные замены способны влиять на N-сигнализацию.

У *D. melanogaster* известны несколько классов мутаций локуса Notch: рецессивные нелетальные аллели с разными специфическими фенотипами; летальные в гомозиготе аллели, часто обнаруживающие плейотропный эффект; *Abruptex* аллели (*Ax* аллели) *Notch*, которые существенно влияют на развитие и жизнеспособность особей [7, 8]. На фоне общего фенотипического полиморфизма идентифицированы гиперморфные, гипоморфные и антиморфные варианты *Ax* аллелей локуса *Notch*. В ряде случаев фенотипы *Ax* аллелей можно рассматривать как противоположные классам аллелей первых двух типов. Результаты анализа генетических комбинаций *Ax* аллелей у *D. melanogaster* позволили обнаружить существование трех типов *Ax* аллелей: жизнеспособных супрессоров фенотипа N, жизнеспособных энхансеров и летальных *Ax* аллелей.

Целью настоящей работы является характеристика особенностей организации одного из мутантов *Notch* у *D. virilis*, обнаруживающего признаки *Ax* аллелей.

Материалы и методы. Для генетического, цитологического и молекулярного анализов использовали линии из фонда мух *D. virilis* Института молекулярной биологии АН РФ (Москва) и из нашей коллекции. Родоначальницей линии, используемой в нашей работе и после тщательной проверки получившей название *Notch*¹²² (см. «Результаты и обсуждение»), была самка, изолированная Е.С. Зеленцовой из потомства одного из дисгенных скрещиваний самок линии 9 (дикий тип) с самцами линии 160, маркированной рецессивными мутациями *broken* (*b*:2–188.0), *gapL2* (*gp*:3–118.5), *cardinal* (*cd*: 4–32.5), *peach* (*pe*: 5–203.0) и *glossy* (*gl*: 6–1) по всем аутосомам.

Для генетического анализа использовали линию с мутациями *Beadex* (*Bx*: 1–94.5) и *white* (*w*: 1–105.0) в хромосоме X.

Цитологический анализ проводили на давленных препаратах политенных хромосом клеток слюнных желез 0-часовых предкуколок или личинок 3-го возраста после окраски их ацеторсеином.

Для идентификации районов политенных хромосом пользовались фотографической картой *D. virilis* [9].

Анализ «фараонов» осуществляли по методу, предложенному для дрозофилы. Мумифицированных особей, оставшихся после окончательного вылета мух из пробирок, смывали со стенок пробирки водой и накапливали, а неповрежденных куколок фиксировали путем погружения в кипящую воду на 1–2 мин, а затем анализировали [10].

Для анализа генетических взаимодействий использовали полученную ранее [11, 12] коллекцию мутантов локуса *Delta D. virilis*.

Результаты исследований. Мутация, обнаруженная в потомстве одного из дисгенных скрещиваний у *D. virilis* и получившая название *Notch*¹²² (*N*¹²²), имеет хорошо выраженный мутантный имагинальный фенотип с характерными наплывами на продольных жилках крыла, особенно на L5 у края крыла. Скрещивания самок, несущих эту мутацию, с нормальными самцами дикого типа позволили устано-

вить, что *N*¹²² ведет себя как сцепленная с полом летальная в гомозиготе и гемизиготе крыловая мутация в хромосоме X, имагинальный фенотип которой свидетельствует о существовании многочисленных дефектов развития у этого аллеля.

Уровень жизнеспособности мутантных аллелей резко снижается: заметно уменьшается число гетерозиготных по мутации самок в потомстве скрещиваний с нормальными самцами, а класс гемизиготных по мутации самцов вообще полностью отсутствует.

Кроме того, выяснилось, что после окончательного вылета жизнеспособных мух в пробирках остаются мумифицированные куколки («фараоны», *pharaoh adults*) (см. «Материалы и методы»), число которых сильно варьирует в разных выборках. Можно поэтому предположить, что в линии *N*¹²² в отличие от контроля (дикого типа) происходит гибель мутантных особей на эмбриональной стадии. Число таких особей составляет не менее 10–15 % общего числа особей в пробирках.

Характерные особенности фенотипов мух в линии *N*¹²²

Сильные утолщения L5 у края крыла	100, %
Утолщены L3 и L5 у края крыла	100, %
Крылья слегка растопырены и приподняты вверх	100, %
Обрывы по краю крыла	~20, %
Delta-подобные расширения L2	~30, %
Вырезки края крыла между L4 и L5	~20, %
Разные нарушения щетинок	~15, %
Уменьшения размеров глаз вплоть до полного исчезновения обоих глаз	2–5

Итак, в потомстве после скрещивания самок *N*¹²² с самцами дикого типа с разной частотой появляются мухи-самки, имеющие наплывы на жилках крыла, нарушения ориентации щетинок и положения крыльев. Довольно редко, но регулярно появляются также мухи с маленькими глазами и даже совсем безглазые. Частота появления особей с необычным фенотипом в разных опытах сильно варьирует и, похоже, заметно зависит от температуры (данные не приводятся).

В целом, можно еще раз подчеркнуть, что в результате многократных скрещиваний мутантных самок *N*¹²² с нормальными самцами единственная самка с наплывами на жилках крыла

оказалась родоначальницей отдельной линии, в которой присутствуют мухи с разными гиперморфными, гипоморфными и антиморфными признаками, проявляющимися с различной частотой у разных особей.

В ходе цитологического анализа мы прежде всего пытались выяснить, не связаны ли мутантные признаки аллеля *N¹²²* с нарушениями структуры хромосом и хромосомными перестройками. Нам не удалось наблюдать таких изменений политенных хромосом, в том числе и в районе 13, где цитологически локализован локус *N* у *D. virilis* [13].

В процессе генетического анализа этой линии выяснилось, что при скрещивании самок *N¹²²* с белоглазыми самцами (линия *white* из нашей коллекции) в потомстве появляются белоглазые самки. Это однозначно свидетельствует о том, что в хромосоме X мутанта *N¹²²* присутствует, кроме *N*, еще и вторая мутация — *white*. Хорошо известно, что и у других видов *Drosophila* локусы *white* и *Notch* тесно сцеплены и почти не разделяются кроссинговером. Существует предположение [14] о том, что структурные конфигурации этих двух локусов устойчиво сохраняются в ходе эволюции у разных видов.

Локус *N* хорошо изучен и локализован в хромосоме X нескольких видов дрозофилы. Цитогенетический анализ результатов гибридизации *in situ* клонированных последовательностей ДНК *D. melanogaster* с политенными хромосомами *D. virilis* позволяет предположить, что локус *N* у *D. virilis* расположен в районе 13В7 цитологической карты в центральной области хромосомы X в непосредственной близости от локусов *w* и *Bx* [9]. У *D. melanogaster*, как хорошо известно [15], локус *N* находится в дистальной области хромосомы X в районе 3С1–2.

На рисунке (из работы [14]) приведена схема, отражающая результаты сравнительного анализа расположения генов и транскрипционной активности (пuffy) хромосом в области, включающей гены *w* и *N* у двух видов — *D. virilis* и *D. melanogaster*. Совершенно очевидно, что в этой области хромосомы X произошла транспозиция набора генов у одного из видов. Тем не менее обнаруживается коллинеарность (линейное соответствие) гомологичных мар-

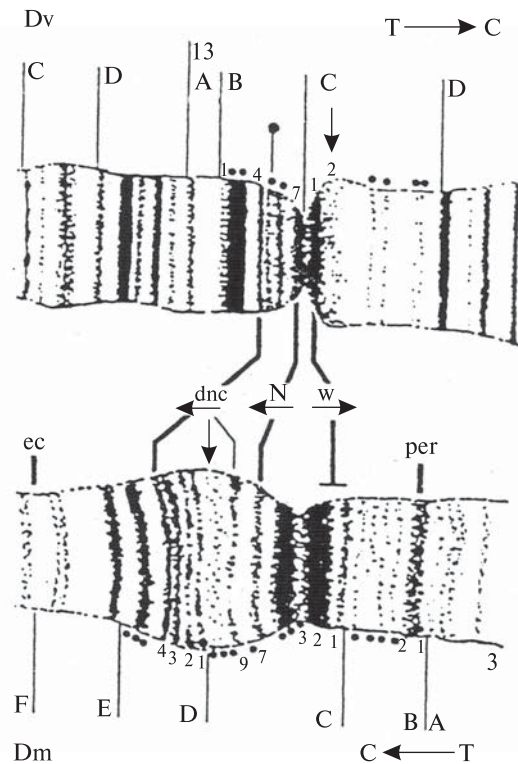


Схема сравнительного анализа расположения генов, морфологии хромосом и транскрипционной активности пuffed политенных хромосом в области *white-Notch* (в центре рисунка) у *D. virilis* (Dv) и *D. melanogaster* (Dm): Т — теломера; С — центромера

керов, которая сохраняется в эволюции. Можно предположить, что транспозиции наборов генов не являются случайными, а отдельные конфигурации генов высококонсервативны в эволюции.

Тот факт, что гомологичные последовательности и их конфигурации у разных видов устойчиво сохраняются на протяжении десятков миллионов лет независимой эволюции этих видов, свидетельствует о том, что процесс эволюции включает не только сохранение отдельных функционально важных генов, но и целых комплексов генов, транскрипционных единиц и наборов генов. Консерватизм последовательностей в области *wN* у *D. virilis* и *D. melanogaster* свидетельствует в пользу представлений о консерватизме структурной эволюции генома [14].

Генетические взаимодействия с Delta. Мы пытались проверить, существуют ли взаимодействия между *N¹²²* и аллелями *Delta*. Во-первых,

считается, что *Delta* является наиболее вероятным кандидатом на роль генов, взаимодействующих с *Notch*, и, во-вторых, ранее нами была получена целая коллекция разных *Dl*-мутантов [11, 12]. Все эти мутантные аллели *Delta* имели хорошо выраженный *Dl*-фенотип с наплывами на продольных жилках крыла (чаще всего на L2) и обнаруживали рецессивную летальность. Дигетерозиготные комбинации $N^{122}/+$; $Dl^m/+$ жизнеспособны, по крайней мере если в скрещивании использовали линии Dl^s , Dl^l , Dl^{AS} и Dl^{T2} из нашей коллекции [11]. Результаты молекулярного анализа (Тютюнникова и др., готовится к печати) показали отсутствие каких-либо изменений в повторах EGF 11 и 12, ответственных за взаимодействие с *Notch*.

У *D. melanogaster* аллель N^{M1} , фенотип которого поразительно сходен с N^{122} , нежизнеспособен в дигетерозиготных комбинациях $N^{122}/+$; $Dl^N/+$ [7]. Молекулярный анализ показал присутствие аминокислотных замен Glu→Val в области EGF-повтора 12, который, как известно, взаимодействует с *Delta*.

Отсутствие результатов полного секвенирования N^{122} последовательностей у *D. virilis* затрудняет интерпретацию этих данных.

Обсуждение и заключение. Генетический анализ позволил обнаружить три наиболее функционально важные области Notch белка у дрозофилы [8]. Одна из них сконцентрирована в повторах 11 и 12, используемых для связывания лигандов с Notch белком. Другая область генетически обнаружена при мутациях *Abruptex* и идентифицирована в EGF-повторах 24 и 25. Предполагается, что мутации в этой области либо увеличивают сигнализацию Delta, либо влияют на другие функции Notch белка. И, наконец, еще одна важная область хорошо известна в последовательностях, богатых цистеином и получивших название LNG-повторов. Мутации или делеции в этой области вызывают появление повышенной активности Notch белка [8]. Особенности геномной организации локуса *N* до конца не изучены.

Недавно были охарактеризованы функциональные домены Notch у двух разных видов дрозофилы — *D. melanogaster* и *D. simulans*; одновременно были идентифицированы еще не-

сколько белков, участвующих в N сигнализации [16].

Секвенированы транскрипты локуса *N*, размеры которых составляют 30 ко геномной ДНК. Для молекулярного анализа использовали два фрагмента, обозначенных как 5'-область (экзоны 3 и 4, а также соседний с ними интрон) и 3'-конец (экзон 6). Экзоны 3 и 4 кодируют несколько EGF-подобных повторов внеклеточного домена N, которые, как известно, осуществляют взаимодействия N с его лигандами — Delta и Serrate. Как оказалось, 3'-область экзона 6 представляет собой начало внутриклеточного домена N. Эта высококонсервативная в эволюции область после связывания с лигандами осуществляет начало активации N-пути при взаимодействии с другими клеточными белками. Более высокий уровень дивергенции последовательностей и хромосомного полиморфизма обнаруживает 3'-область у *D. melanogaster*.

Кроме белков, кодируемых геном *Notch* и его аллелями типа *Abruptex*, на роли последовательностей, взаимодействующих с другими белками, справедливо претендует класс белков, известных под названием LIM only (LMO). Они хорошо известны своими мутациями в 3'-регуляторной области, взаимодействуют в клетке с разными адапторами, конкурентами, кофакторами и онкогенами, а также играют важную роль в пролиферации и дифференцировке клеток.

Выводы. Выделен и генетически охарактеризован мутант *Notch¹²²Drosophila virilis*, обнаруживающий явное сходство с аллелями *Notch* типа *Abruptex* у *Drosophila melanogaster*. Обсуждаются особенности генетических взаимодействий *Notch* аллелей типа *Abruptex*.

I.S. Gubenko,

R.P. Subbota, E.S. Zelentsova

Notch¹²², MUTATION OF *Notch*

LOCUS *ABRUPTEX* TYPE IN *DROSOPHILA VIRILIS*:
CHARACTERISTICS
OF GENETIC INTERACTIONS

A *Drosophila virilis Notch¹²²* mutant has been isolated and genetically identified which is similar to *Notch Drosophila melanogaster Abruptex* type alleles. Some possible peculiarities of genetic interactions of *Notch* alleles of *Abruptex* type are discussed.

І.С. Губенко, Р.П. Суббота, Є.С. Зеленцова

*Notch*¹²², МУТАЦІЯ ЛОКУСУ *Notch*
ТИПУ *ABRUPTEX* У *DROSOPHILA VIRILIS*:
ОСОБЛИВОСТІ ГЕНЕТИЧНИХ ВЗАЄМОДІЙ

Виділено та охарактеризовано мутант *Notch*¹²² *Drosophila virilis*, який проявляє очевидну схожість з алелями *Notch* типу *Abruptex* у *Drosophila melanogaster*. Обговорюються особливості генетичних взаємодій *Notch* алелів типу *Abruptex*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., Lake R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development // *Science*. – 1999. – **284**. – P. 770–776.
2. Kopan R., Ijagan M.X.G. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism // *Cell*. – 2009. – **137**. – P. 216–233.
3. Fre S., Pallavi S.K., Huyghe M., La M., Janssen K.-P., Robine S., Artavanis-Tsakonas S., Louvard D. Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2009. – **106**. – P. 6309–6314.
4. Joshi I., Minter L.M., Telfer J., Demarest R.M., Capobianco A.J., Aster J.C., Sicinski P., Fauq A., Golde T.E., Osborne B.A. Notch signaling mediates G₁/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases // *Blood*. – 2009. – **113**. – P. 1689–1698.
5. Peralta S., Gómez Y., González-Gaitán M.A., Moya F., Vinás J. Notch down-regulation by endocytosis is essential for pigment cell determination and survival in the *Drosophila* retina // *Mech. Develop.* – 2009. – **126**. – P. 256–269.
6. Takeuchi H., Haltiwanger R.S. The role of O-Glycosylation in Notch signaling // *Trends Glycosc. and Glycotechn.* – 2008. – **20**. – P. 159–170.
7. Celis J.F. de, Barrio R., Arco A. del, Garcia-Bellido A. Genetic and molecular characterization of a Notch mutation in its Delta- and Serrate-binding domain in *Drosophila* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1993. – **90**. – P. 4037–4041.
8. Brennan K., Tateson R., Liaber T., Couso J.P., Zecchini V., Arias A.M. The *Abruptex* mutations of *Notch* disrupt the establishment of proneural clusters in *Drosophila* // *Develop. Biol.* – 1999. – **216**. – P. 230–242.
9. Gubenko I.S., Evgen'ev M.B. Cytological and linkage maps of *Drosophila virilis* chromosomes // *Genetica*. – 1984. – **65**. – P. 127–139.
10. Curtiss J., Heilig J.S. Establishment of *Drosophila* precursor cells is controlled by the *arrowhead* gene // *Development*. – 1995. – **121**. – P. 3819–3825.
11. Губенко І.С., Рыбцова Н.А., Зеленцова Е.С., Лезин Г.Т., Корочкин Л.И., Евгеньев М.Б. Локус *Delta* у *Drosophila virilis*: клонирование и хромосомная локализация // Докл. Академии наук РФ. – 1998. – **358**. – С. 567–569.
12. Губенко І.С. Локус *Delta* в *Notch* сигнальній системі: Організація і плейотропна функція в розвитку дрозофіли // Цитологія і генетика. – 2001. – **35**, № 4. – С. 59–80.
13. Lozovskaya E.S., Petrov D.A., Hart D.L. A combined molecular and cytogenetic approach to genome evolution in *Drosophila* using large-fragment DNA cloning // *Chromosoma*. – 1993. – **102**. – P. 253–266.
14. Kress H. The salivary gland chromosomes of *Drosophila virilis*: a cytological map, pattern of transcription and aspects of chromosome evolution // *Chromosoma*. – 1993. – **102**. – P. 734–742.
15. Lindsley D.L., Zimm G.G. The Genome of *Drosophila melanogaster*. – New York: Acad. press, 1992.
16. Bauer DuMont V., Fay J.C., Calabrese P.P., Aquadro Ch.F. DNA variability and divergence in the *Notch* locus in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: a case of accelerated synonymous site divergence // *Genetics*. – 2004. – **167**. – P. 171–185.
17. Rétaux S., Bachy I. A short history of LIM domains (1993–2002) // *Mol. Neurobiol.* – 2002. – **26**. – P. 1–13.
18. Губенко І.С. Гени, кодируючі белки с LIM-доменами у *Drosophila*: Організація, функції, взаємодії // Цитологія і генетика. – 2006. – **40**, № 4. – С. 44–67.
19. Chen H.-Y., Xu J., Safarour F., Steward A.F.R. LMO4 mRNA stability is regulated by extracellular ATP in F11 cells // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – **357**. – P. 56–61.

Поступила 14.10.09