

Лекция 7

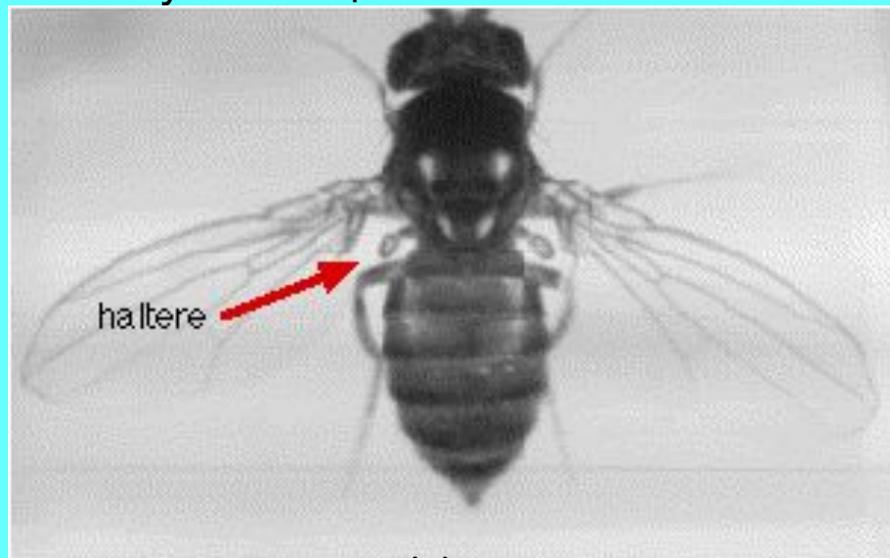
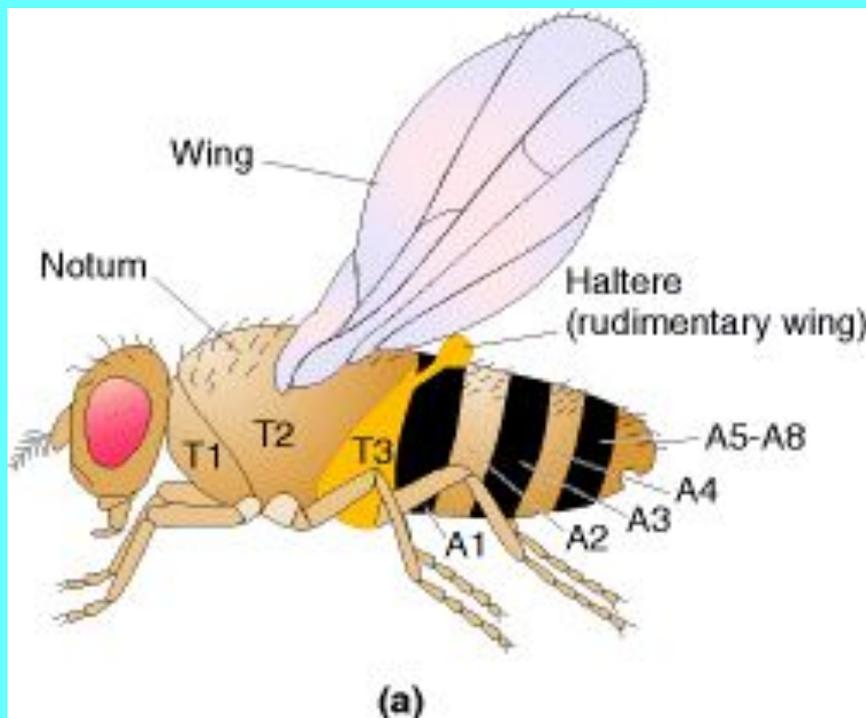
ФОРМИРОВАНИЕ ОСЕЙ ЗАРОДЫША ДРОЗОФИЛЫ И СПЕЦИФИКАЦИЯ СТРУКТУР ТЕЛА ВДОЛЬ ОСЕЙ (продолжение)

Гомейозисные (гомеотические) мутации впервые были описаны в 1894 Вильямом Бейтсоном (Willam Bateson) и характеризуются изменением места расположения известных структур вдоль продольной оси тела животного.

За характеристику гомеотических (гомейозисных) генов у дрозофилы Э. Льюис (E. V. Lewis) был удостоен в 1995 г. Нобелевской премии.

Было установлено, что гомеотические гены начинают функционировать на ранних этапах развития зародыша и могут оставаться активными в некоторых отделах взрослого организма

Гомейозисная мутация гена *Ultrabithorax* у дрозофилы (подавление активности гена *ultrabithorax*) приводит к образованию второй пары крыльев вместо жужжалец



wildtype

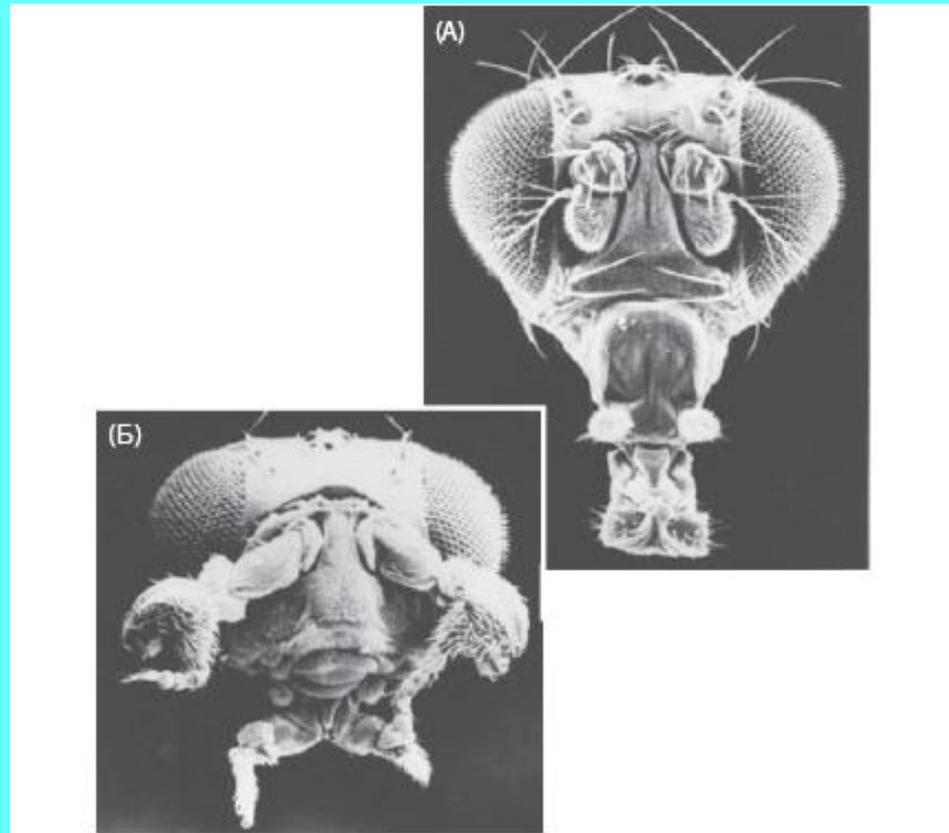


Ultrabithorax



Эта четырёхкрылая плодовая мушка была получена, сведением во-едино трёх мутаций в *цис*-регуляторных элементах гена *ultrabithorax*. Мутации такого рода эффективно трансформируют третий торакаль-ный сегмент в дополнительный второй (то есть превращают жуж-жальца в крылья). Фото E. B. Lewis.

Эктопическая активность **гомеотического гена** *Antennapedia* (gain of function) в головном отделе (в норме активного во втором торакальном сегменте) превращает антенну в ногу (см. рисунок). В случае мутации гена *Antennapedia* (*loss of function*) во втором торакальном сегменте вместо ноги образуется антенна, благодаря активности более «антериорных» гомеотических генов.

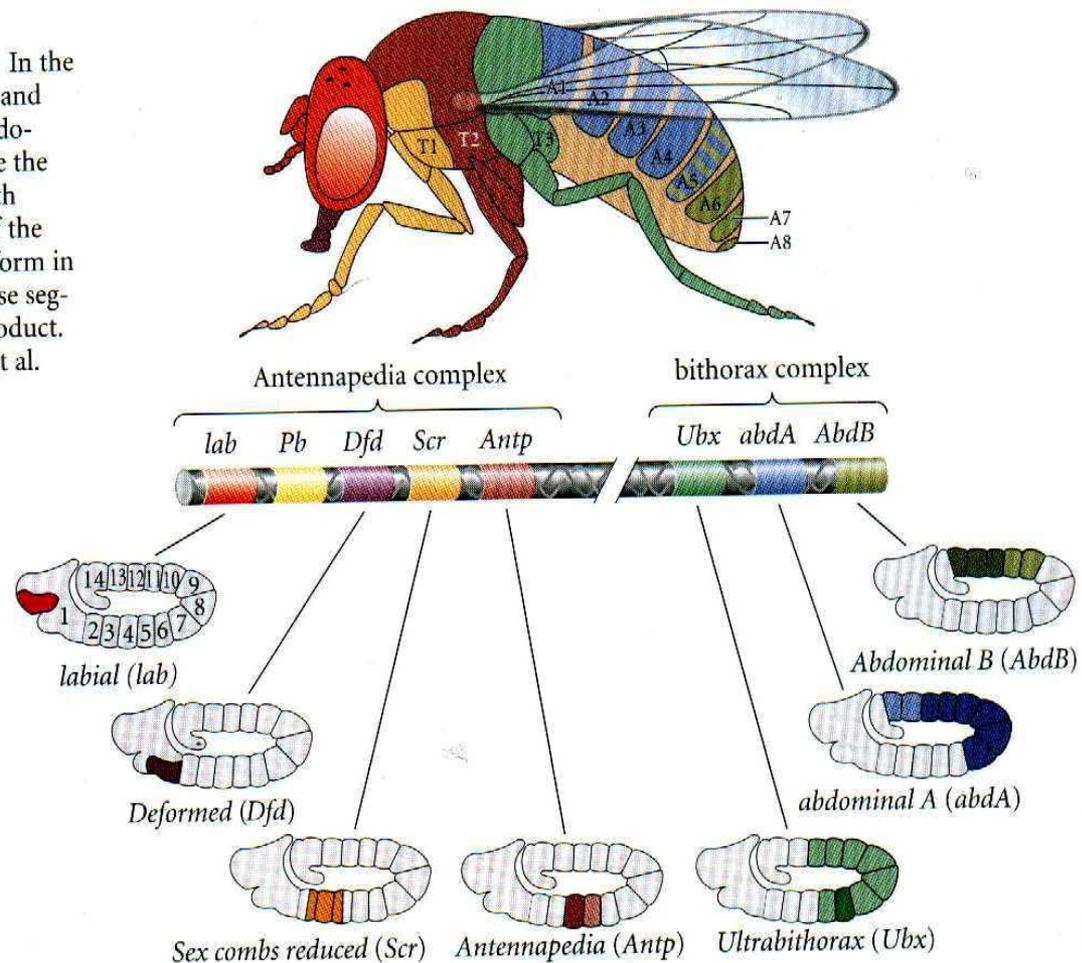


А — Голова мушки дикого типа. Б — Голова мушки, несущей мутацию *Antennapedia*, превращающую антенны в ноги. По Kaufman et al. 1990; фото Т. С. Kaufman.

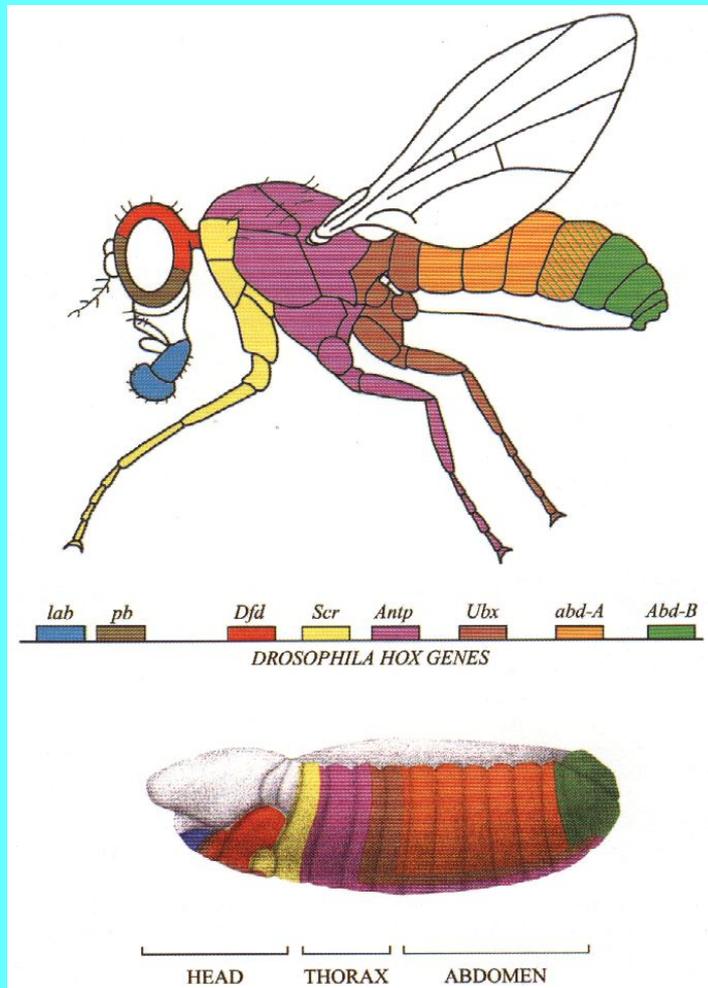
Кластер гомеотических генов дрозофилы – *Hom-C* на 3-й хромосоме. Активность генов в зародыше и во взрослой особи. Последовательное расположение генов в кластере определяет последовательность их экспрессии в парасегментах вдоль передне-задней оси

Figure 9.27

Homeotic gene expression in *Drosophila*. In the center are the genes of the Antennapedia and bithorax complexes and their functional domains. Below and above the gene map are the regions of homeotic gene expression (both mRNA and protein) in the blastoderm of the *Drosophila* embryo and the regions that form in the adult fly. Darker shaded areas are those segments or parasegments with the most product. (After Dessain et al. 1992 and Kaufman et al. 1990.)



8 гомеотических (гомейозисных) генов дрозофилы контролируют идентичность тела как у эмбриональной так и взрослой форм насекомого



labial (lab)

proboscipedia (pb)

Deformed (Dfd)

Sex combs reduced (Scr)

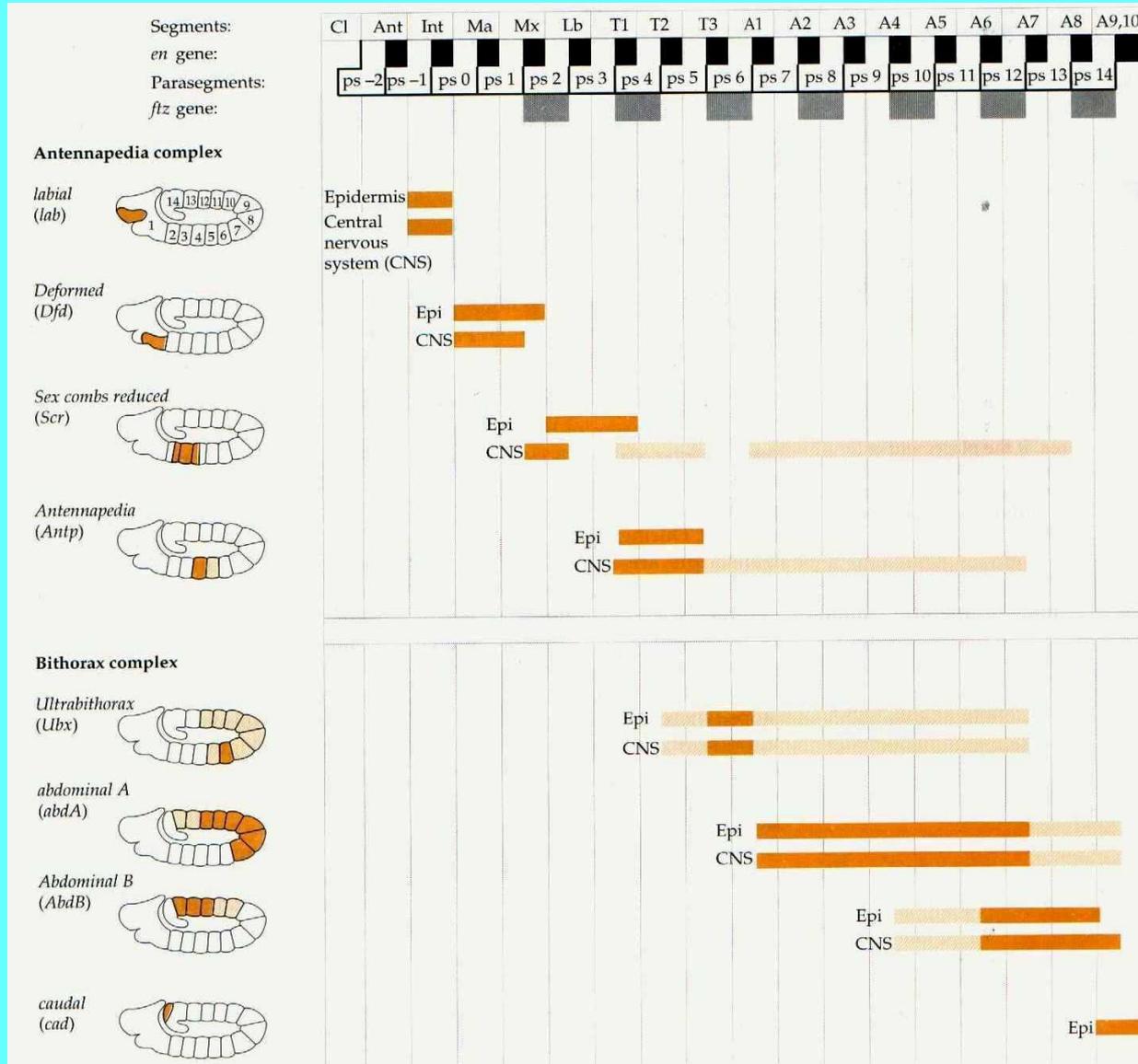
Antennapedia (Antp)

Ultrabithorax (Ubx)

abdominal A (abd-A)

Abdominal B (Abd-B)

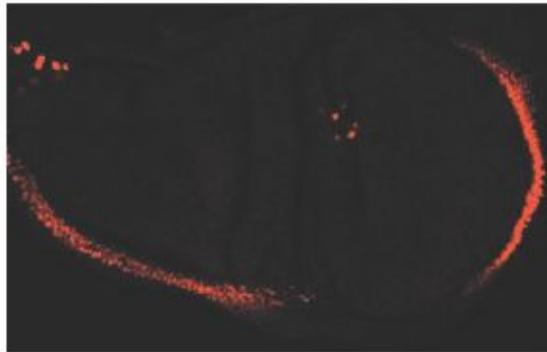
Районы экспрессии гомеотических генов в бластодерме зародыша дрозофилы и несколькими часами позже в нервной системе (тёмные полосы - белок, светлые - иРНК)



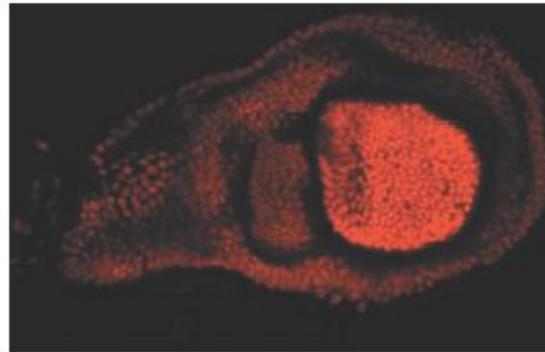
Гомеотические ены

Активности гомеотических генов инициируются продуктами экспрессии генов сегментации (*gap* и *pair rule*) и полярности сегментов, а затем поддерживаются независимо от них.

(А)



(Б)



Специфическое окрашивание с помощью антител к белку *Ultrabithorax* дрозофилы: А — Окрашивание в имагинальном диске крыла и (Б) в имагинальном диске жужжалец личинки третьей возрастной стадии. Из этих клеток образуются соответственно крылья и жужжальца. В имагинальном диске крыла белок *Ultrabithorax* выявляется только в клетках, которые образуют периподиальную мембрану, но не в клетках, которые формируют собственно крыло. В имагинальном диске жужжальца *Ultrabithorax* обнаруживается в клетках, составляющих большую часть жужжальца. По Weatherbee et al. 1998; фото S. D. Weatherbee и S. Carroll.

Гомеотические гены кодируют транскрипционные факторы -ТФ, содержащие ДНК- связывающий гомеодомен (60 а.о.), имеющий структуру - спираль-поворот-спираль- **Helix-Turn-Helix (НТН)**. Участок ДНК, кодирующий гомеодомен - гомеобокс (180 н.п.). Не все гомеобокс-содержащие гены - гомеотические, а только входящие в состав кластера генов - **Ном-С**. Все гомеодомен-содержащие ТФ одинаково узнают центральную последовательность **ТААТ-пар нуклеотидов**, но различаются по узнаванию фланкирующих ТААТ пар нуклеотидов.

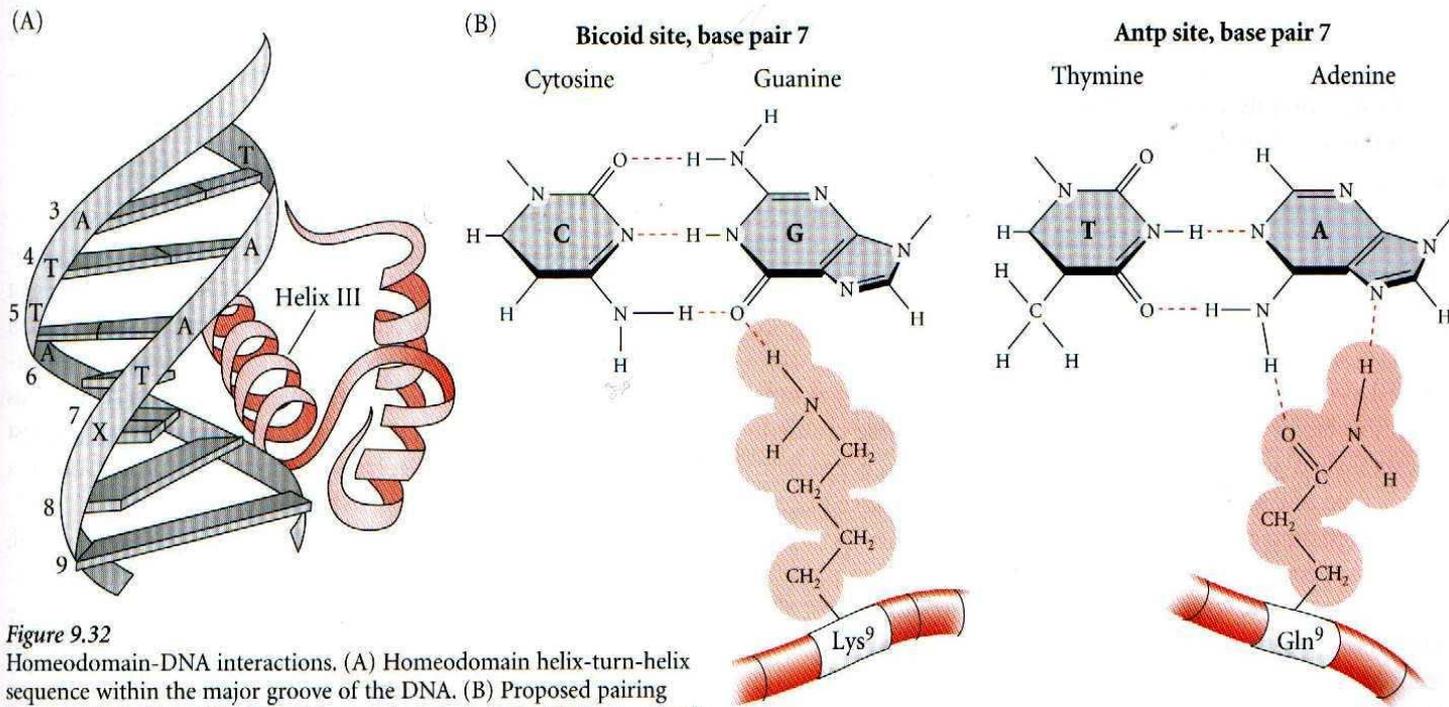


Figure 9.32
Homeodomain-DNA interactions. (A) Homeodomain helix-turn-helix sequence within the major groove of the DNA. (B) Proposed pairing between the lysine of the Bicoid homeodomain and the CG base pair of its recognition sequence, and between the glutamine of the Antennapedia homeodomain and the TA base pair of its recognition sequence. In both cases, the ninth amino acid of the homeodomain helix bonds with the base pair immediately following the TAAAT sequence. (A after Riddihough 1992; B after Hanes and Brent 1991)

Первоначальную экспрессию кластера гомеотических генов инициируют сегментационные гены: gap-гены и гены pair-rule.

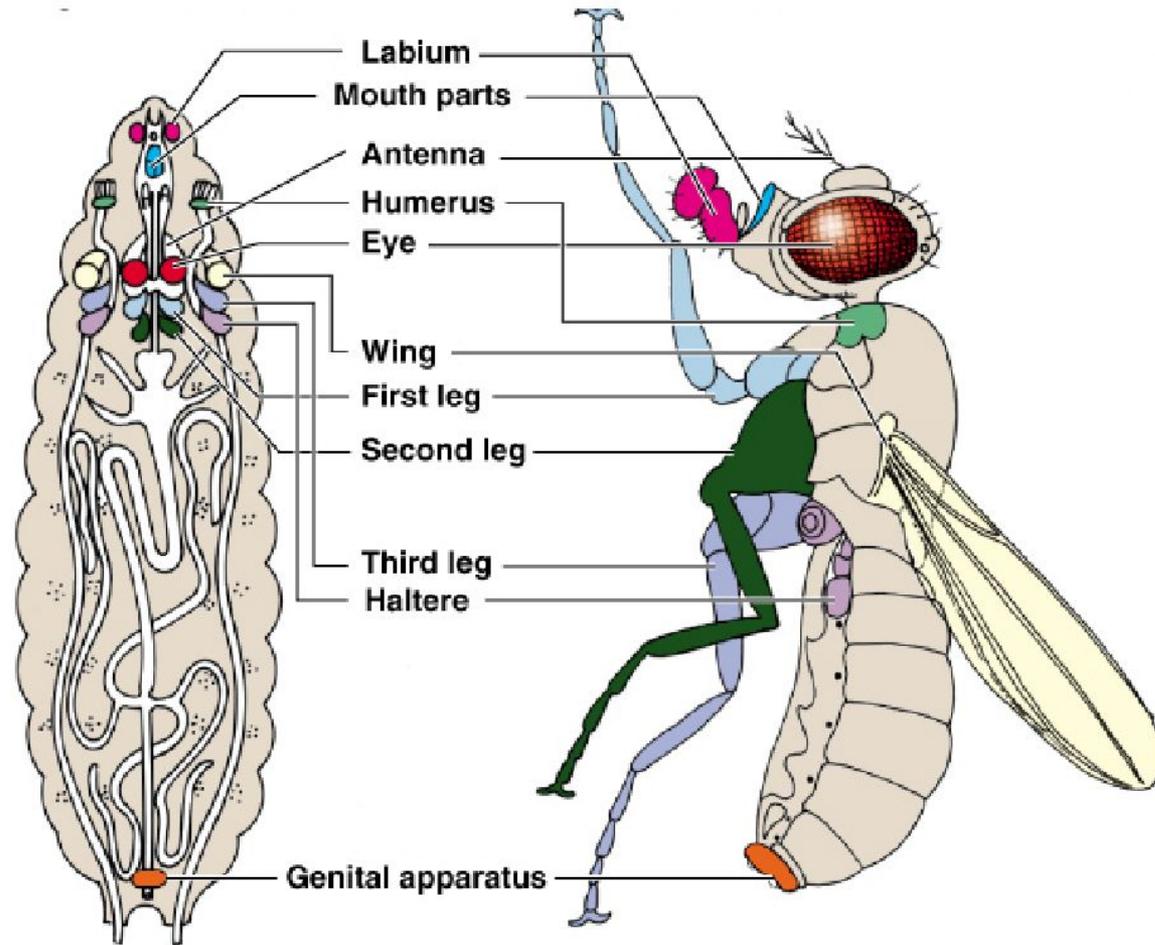
В дальнейшем за экспрессию гомеотических генов у дрозофилы негативно отвечают гены **Polycomb** - их белковые продукты, локально изменяя конформацию хроматина, **подавляют экспрессию** генов Hom-C, и дают возможность осуществлять экспрессию этих генов лишь в отдельных участках развивающегося организма

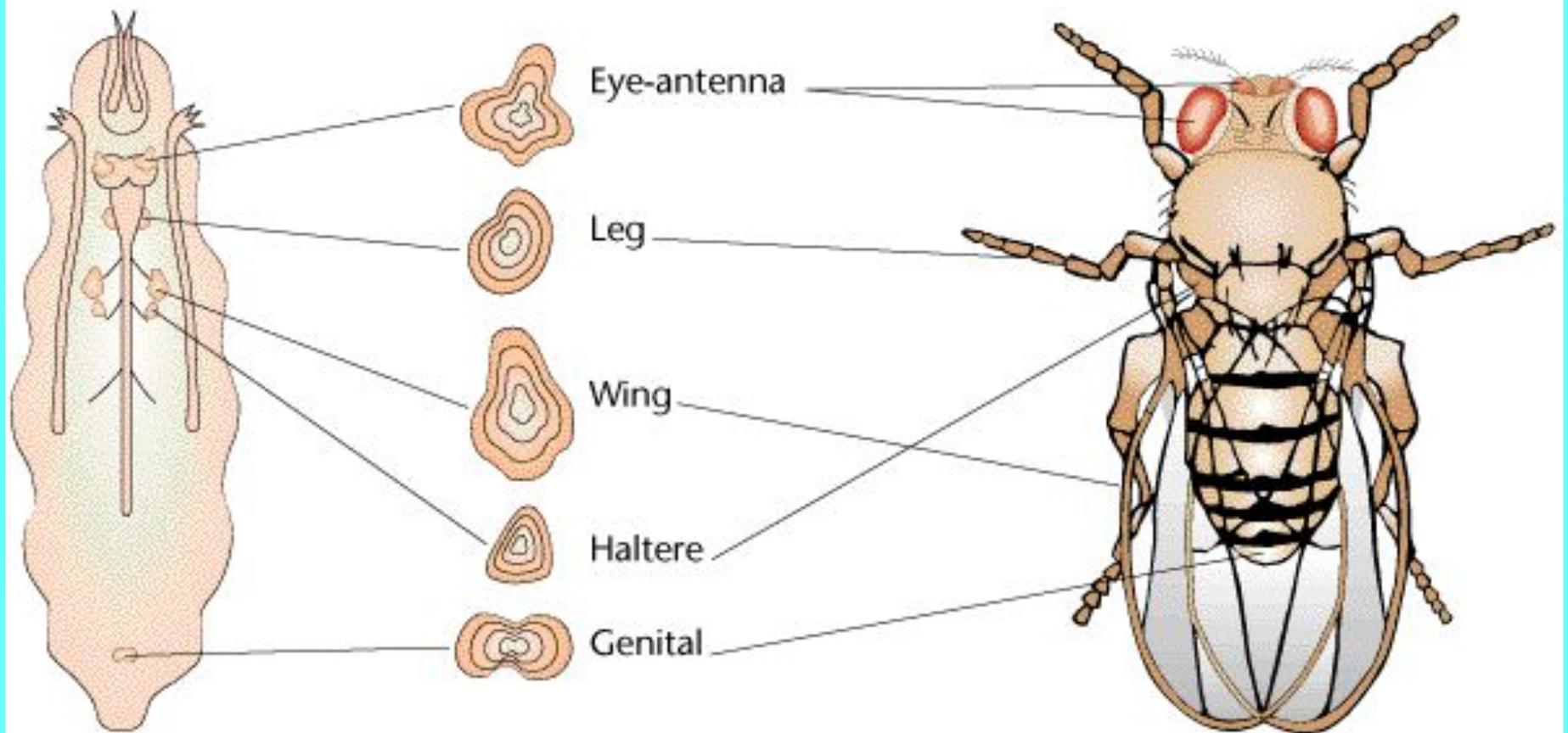
За постоянную позитивную **активность** генов Hom-C отвечают белки семейства **Trithorax**, поддерживающие определенные участки хроматина в активном состоянии и позволяют тем самым экспрессироваться определенным генам кластера Hom-C..

Постериорно функционирующие гомеотические гены действуют через свои белковые продукты (ТФ) как **репрессоры** более антериорных генов кластера

Некоторые гомеотические гены (*lab*, *dfd*) позитивно поддерживают свою экспрессию собственными белковыми продуктами – ТФ.

Имагинальные диски позиционированы в отношении сегментов личинки, что объясняет корреляцию сегментов личинки и взрослой мухи



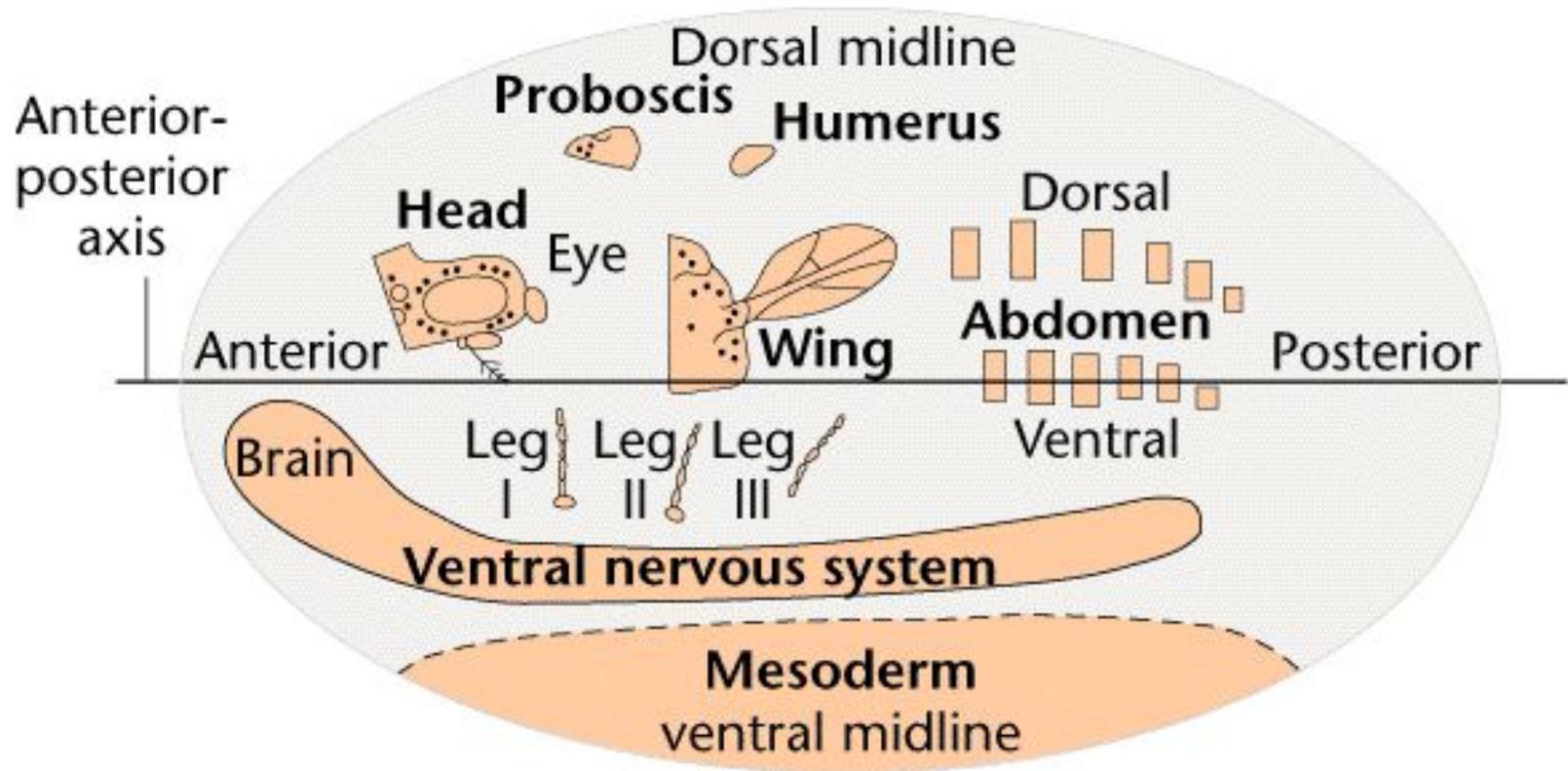


Imaginal discs in *Drosophila*

(Klug & Cummings 1997)

Карта судьбы имагинальных дисков и гистобластов дрозофилы, отвечает за спецификацию структур, формирующихся из них.

Fate map of Drosophila

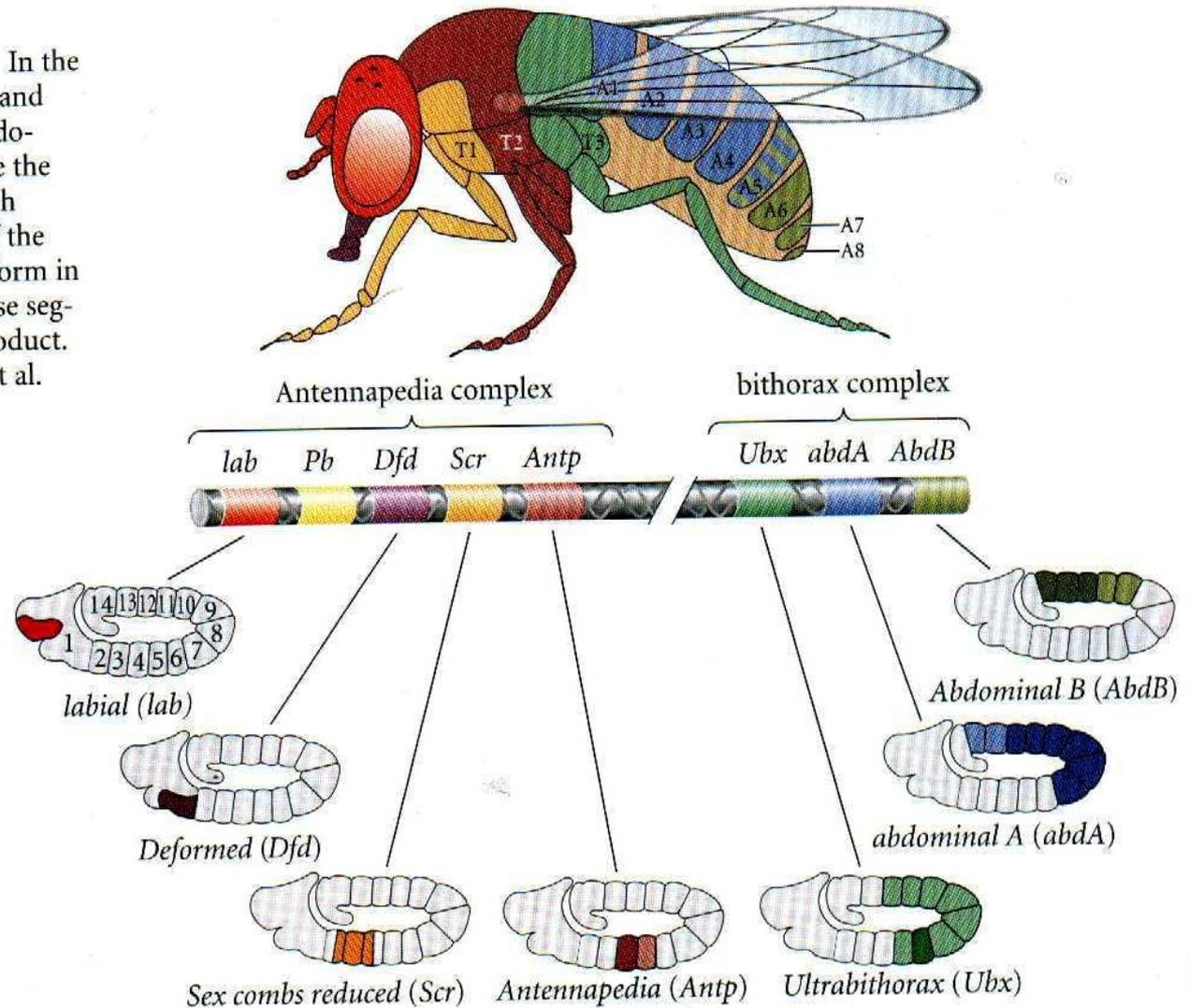


(Klug & Cummings 1997)

Кластер гомеотических генов дрозофилы - *Not-C*. Активность генов в зародыше и во взрослой особи. Последовательное расположение генов в кластере (на 3-й хромосоме) определяет последовательность их экспрессии в парасегментах вдоль передне-задней оси

Figure 9.27

Homeotic gene expression in *Drosophila*. In the center are the genes of the Antennapedia and bithorax complexes and their functional domains. Below and above the gene map are the regions of homeotic gene expression (both mRNA and protein) in the blastoderm of the *Drosophila* embryo and the regions that form in the adult fly. Darker shaded areas are those segments or parasegments with the most product. (After Dessain et al. 1992 and Kaufman et al. 1990.)



Кластеры гомеотических генов **высоко консервативны**. Они сформированы в явном виде у *Bilateria* и присутствуют в организмах **всех типов животных, включая человека**.

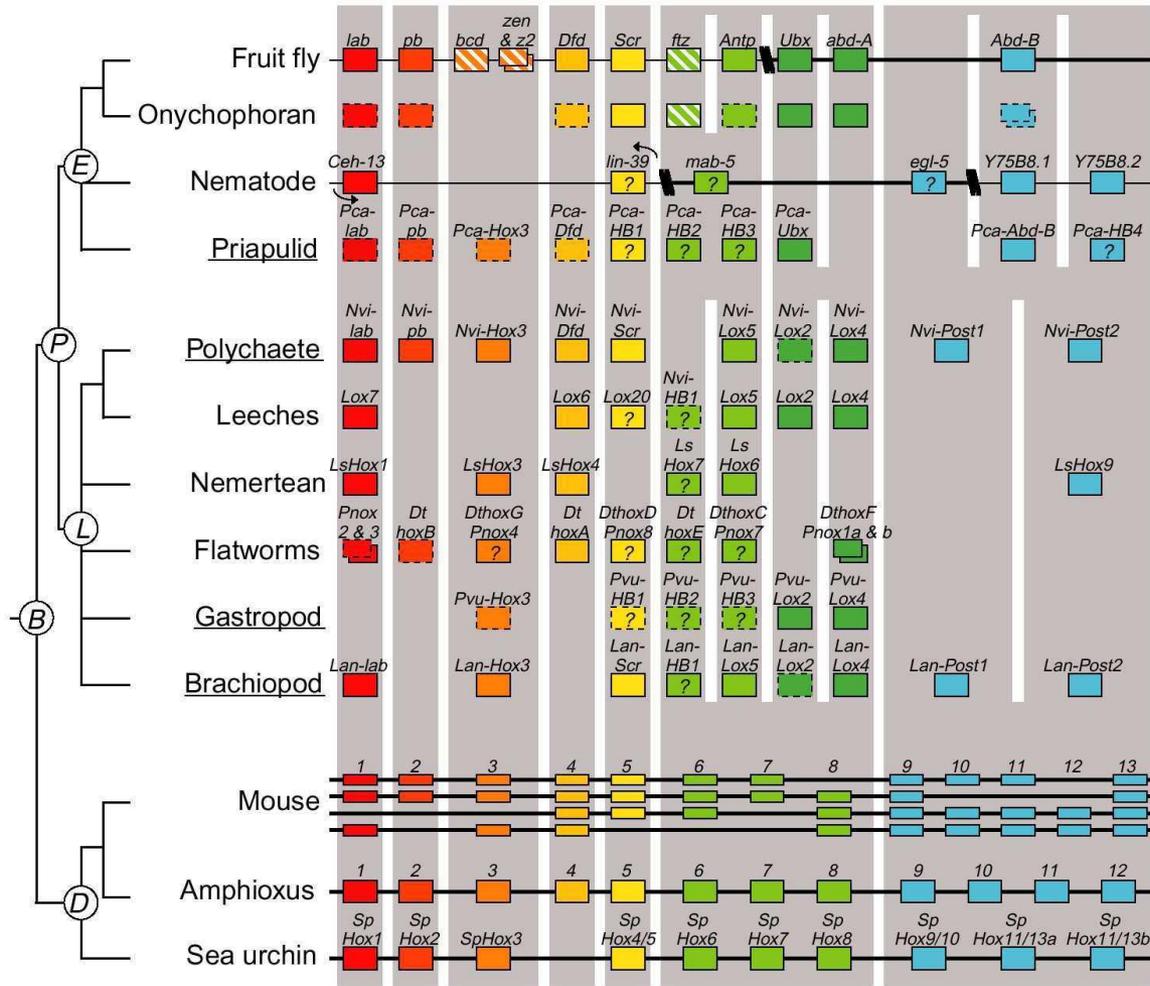


Figure 3 Distribution of Hox genes in bilaterians. The tree on the left summarizes the 18S rDNA phylogeny of Aguinaldo *et al.*². B, common bilaterian ancestor; D, common deuterostome ancestor; E, stem ecdysozoan; L, stem lophotrochozoan; P, common protostome ancestor. Horizontal black lines indicate mapping data (when available). Vertical white bars delineate orthologous genes or groups of

genes. Uncertain orthology relationships are indicated by question marks, dashed boxes indicate short PCR fragments, solid boxes indicate complete or almost complete homeoboxes, and striped colours indicate fast-evolving arthropod Hox sequences. The organisms studied in this paper are underlined.

- Ортологичные гомеотические гены у всех животных (включая и саму дрозофилу) обозначаются сейчас как гены семейства Нох (Нох-гены)

У позвоночных выявляется не менее четырех кластеров паралогичных гомеотических генов. Число генов в Нох – кластерах позвоночных больше, чем у беспозвоночных, но не все паралогичные гены в Нох-кластерах позвоночных сохраняются в отдельных кластерах.

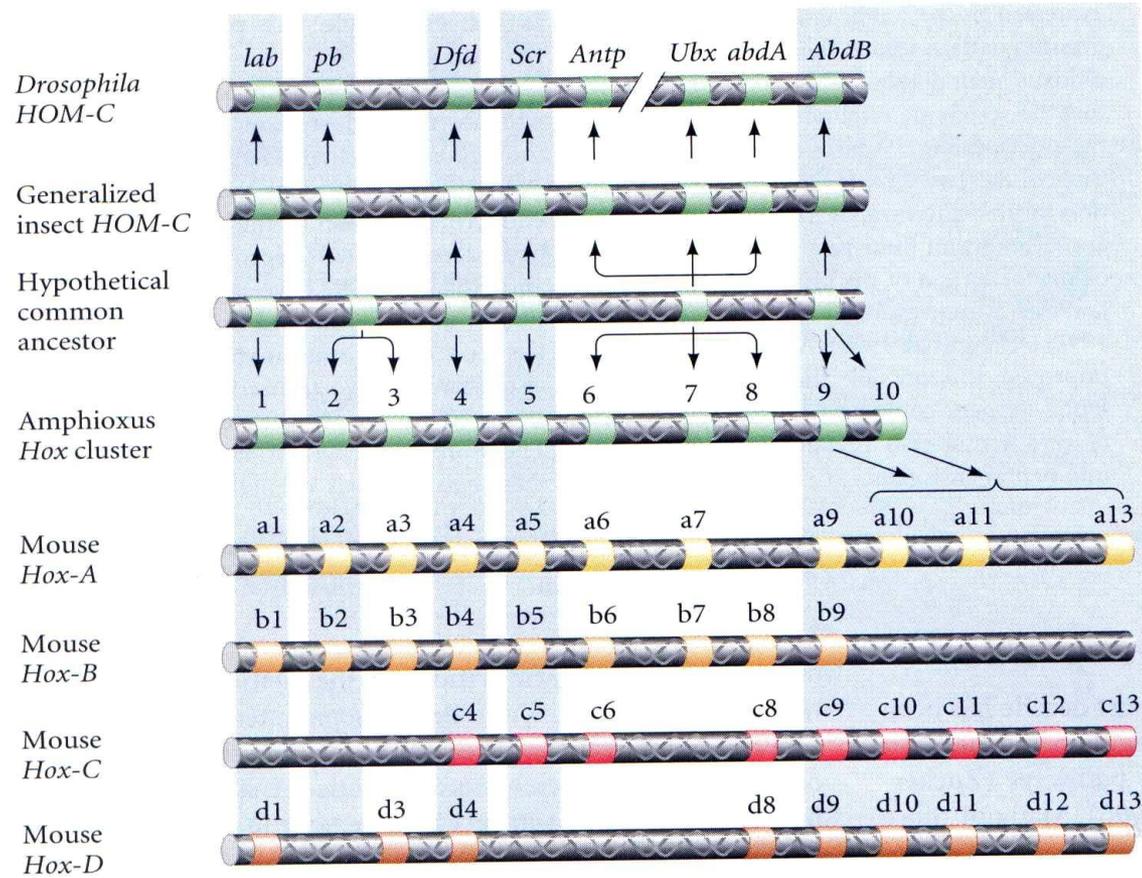


Figure 22.11

Postulated ancestry of the homeotic genes from a hypothetical ancestor of both deuterostomes and protostomes. Amphioxus has only one cluster, similar to that of insects. Vertebrates have four clusters, none of which is complete. (After Holland and Garcia-Fernández 1996.)

Гены гомеотических кластеров Нох-С мыши и НОХ-С человека контролируют метамерию заднего отдела головного мозга и формирование спинного мозга

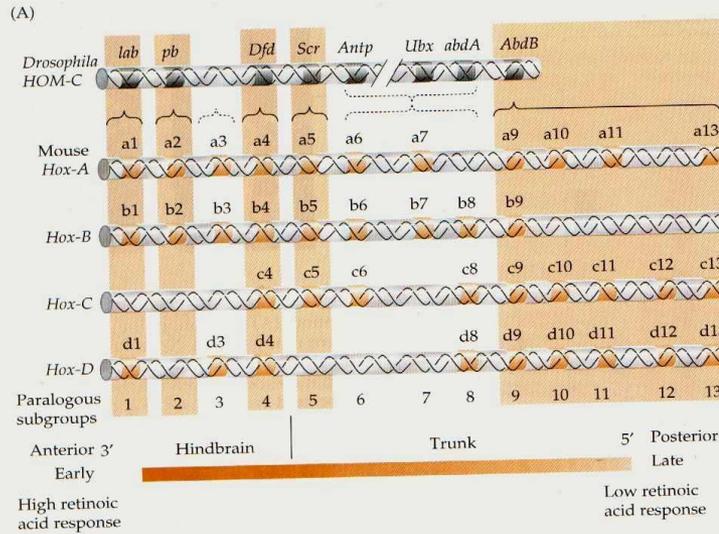
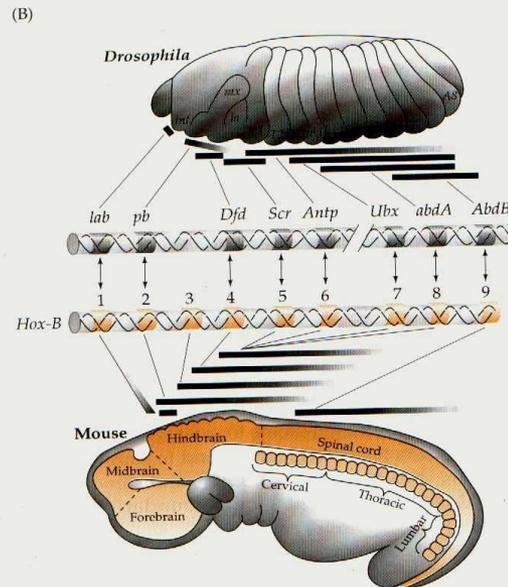


Figure 16.3

Evolutionary conservation of homeotic gene organization and transcriptional expression in flies and mice. (A) Conservation between the homeobox cluster on *Drosophila* chromosome 3 and the four *Hox* gene clusters in the mouse genome. The shaded regions show particularly strong structural similarities between species, and one can see that the order on the chromosomes has been conserved. Those genes at the 5' end (since all mouse homeobox genes are transcribed in the same direction) are those that are expressed more posteriorly, are expressed later, and can be induced only by high doses of retinoic acid. Genes having similar structures, the same relative positions on each of the four chromosomes, and similar expression patterns belong to the same paralogous group. (B) Comparison of the transcription patterns of the HOM-C and *Hox-B* genes of *Drosophila* (10 hours) and mice (12 days), respectively. Another set of genes that controls the formation of the fly head (*orthodenticle* and *empty spiracles*) have homologues in the mouse that show expression in mid-brain and forebrain. The homologous human genes are called (capitalized) HOX genes. (A after Krumlauf, 1993; B after McGinnis and Krumlauf, 1992.)



Гомеотические гены в кластере работают в гнездовом режиме. Кластеры гомеотических генов *Hox-C* мыши и *HOX-C* человека контролируют формирование позвоночника. Их экспрессия определяется градиентом ретиноевой кислоты (возрастающим в передне-заднем направлении).

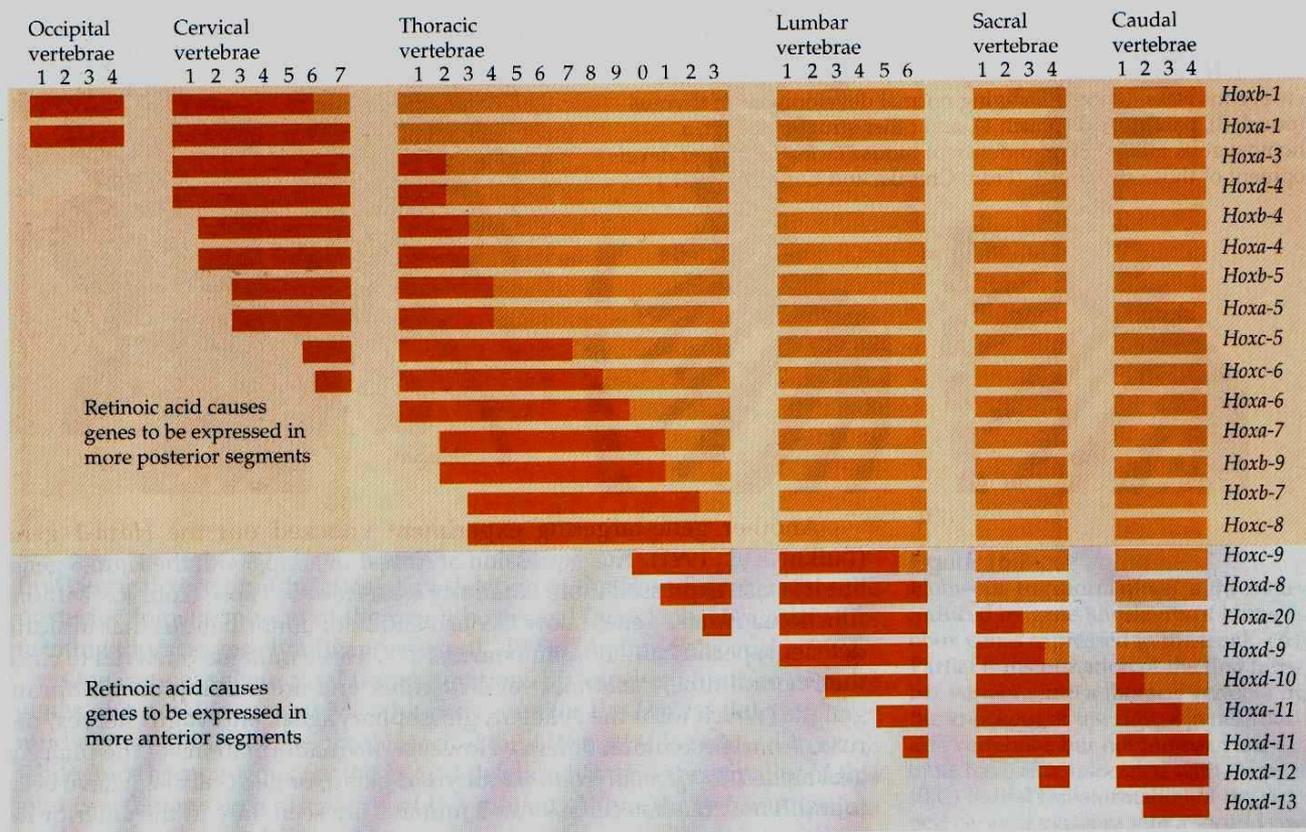


Figure 16.5

The somite *Hox* code in the trunk and neck of the mouse embryo. Areas of major expression are indicated in darker color, while the posterior regions of expression are not as defined as might be suggested by the lighter color. The effect of retinoic acid is to push anterior gene expression more posteriorly and posterior gene expression more anteriorly. (After Kessel, 1992.)

Предполагаемая макроэволюционная роль гомеозисных мутаций - вклад биологии развития в эволюционную теорию. Однократная мутация одного или группы Hom-C генов может привести к образованию (утрате) пары крыльев или ножек

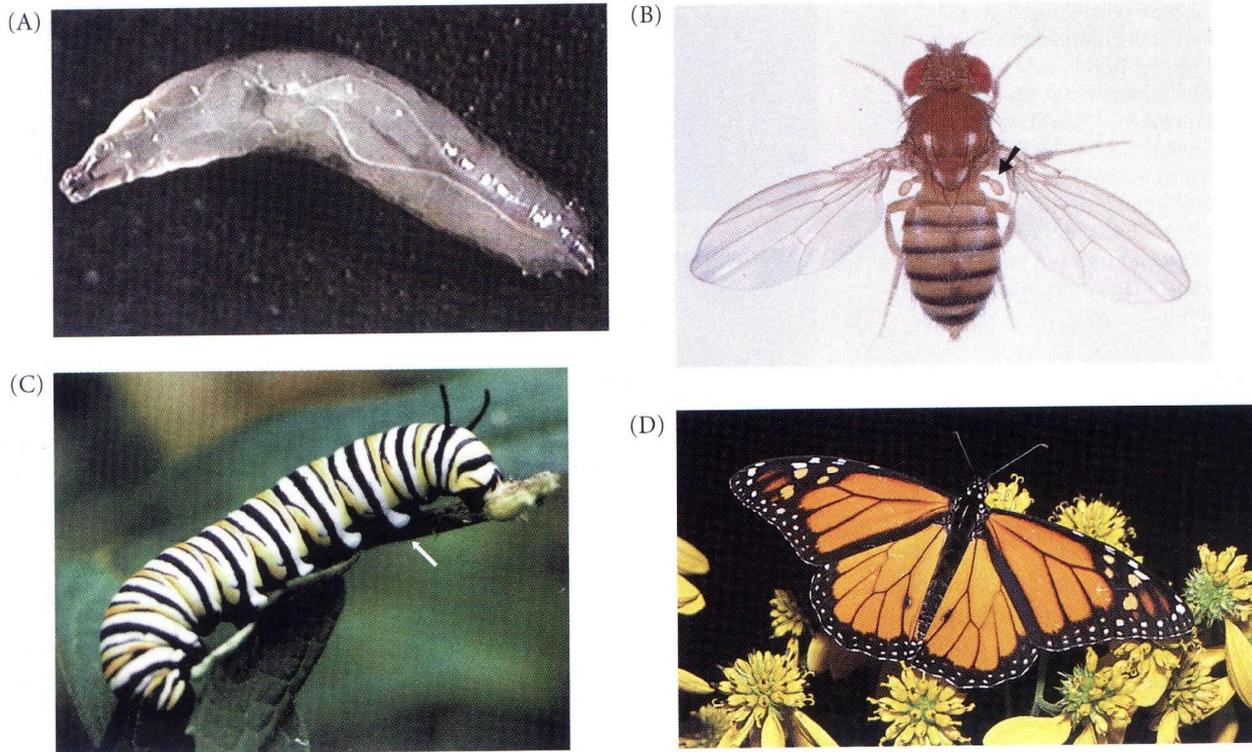


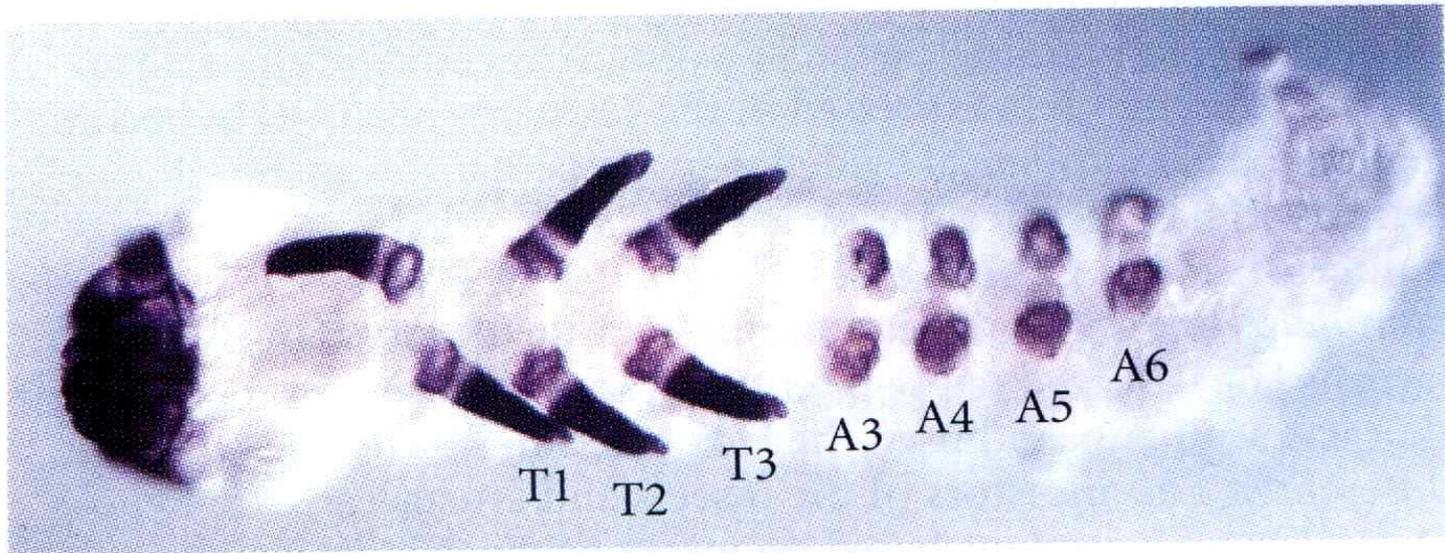
Figure 22.4

Differences in larval and adult morphology due to Hox gene differences. (A, B) Larva and adult of *Drosophila*, a dipteran. An arrow points to one of the halteres of the adult. The larva lacks prolegs; its anterior end is at the left. (C, D) Larva and adult of *Danaus plexippus*, the monarch butterfly, a lepidopteran. The anterior of the caterpillar is to the left, and a proleg is indicated by an arrow. The adult has hindwings rather than halteres. The regulation of Hox genes determines the presence of prolegs, and the targets of Hox genes determine whether the third thoracic segment is to generate halteres or hindwings. (A courtesy of M. Tyler; B courtesy of E. B. Lewis; C courtesy of G. Savage; D by Bill Beatty/Visuals Unlimited.)

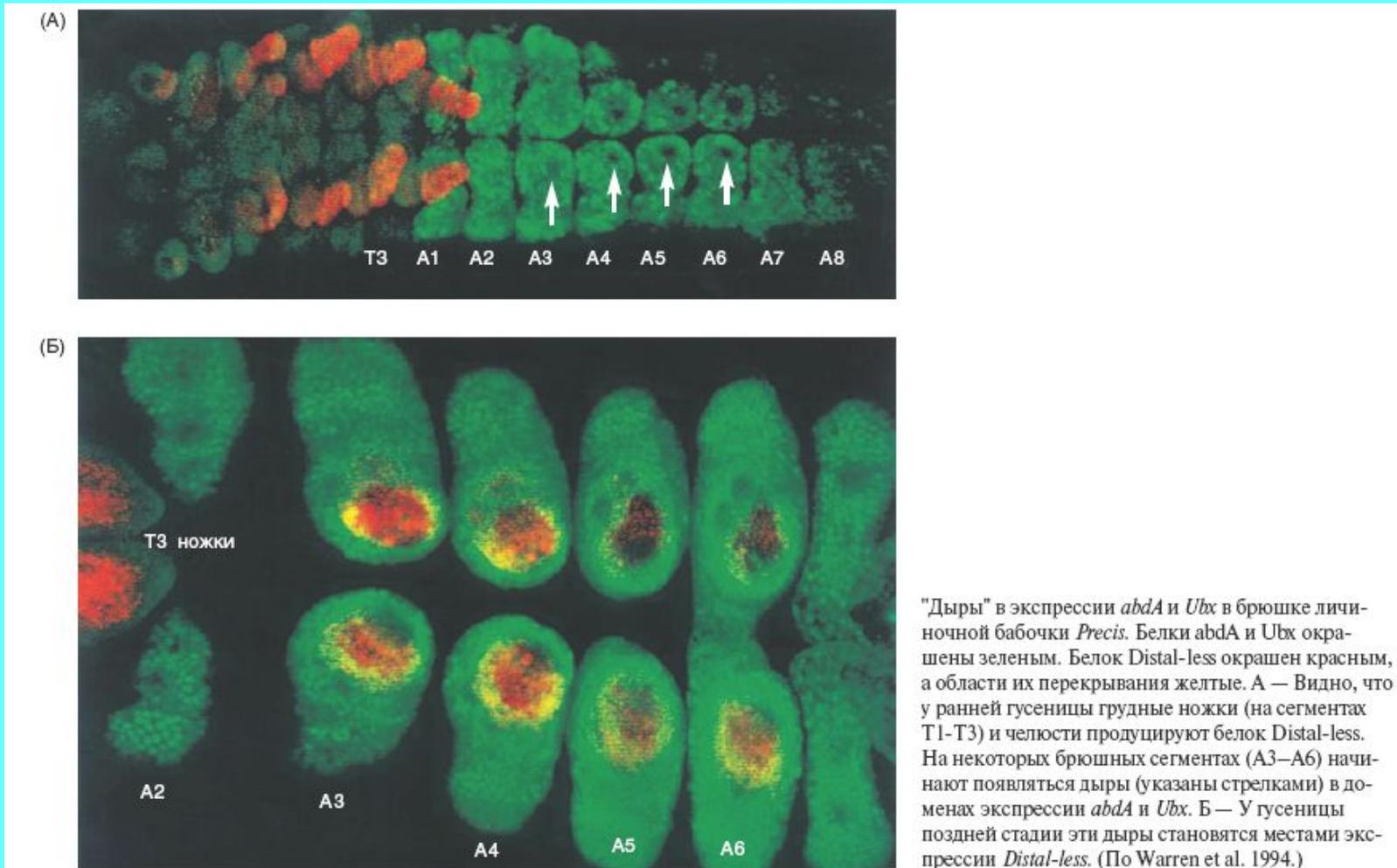
Экспрессия гена *Distal-less* важна для образования конечностей у насекомых, в том числе и для образования ложных ножек у личинки бабочки.

Figure 22.5

Distal-less gene expression in the larva of the buckeye butterfly *Precis*. By 40% of the way through embryonic development, *Dll* expression in *Precis* has diverged significantly from that of *Drosophila* in that *Dll* expression is also seen in abdominal segments 3–6. (From Panganiban et al. 1994; courtesy of the authors.)



Отсутствие экспрессии гомеотических генов *Abd A* и *Ubx* даёт возможность гену *Distal-less* экспрессироваться (маркировка красным цветом) в брюшных сегментах личинки бабочки и обуславливать формирование ложных ножек. Нарушение экспрессии *AbdA* и *Ubx* в ряде мест на брюшных сегментах критично для эволюции личиночных форм высших насекомых



Формирование дорсо-вентральной оси у *Drosophila*.

Дорсо-вентральная полярность зародыша формируется позднее передне-задней, хотя за неё также отвечают продукты экспрессии материнских генов, главный из которых *Dorsal*. Его белковый продукт - фактор транскрипции (синтезируется спустя 90 минут после оплодотворения при трансляции иРНК *Dorsal*, запасённой в ооците).

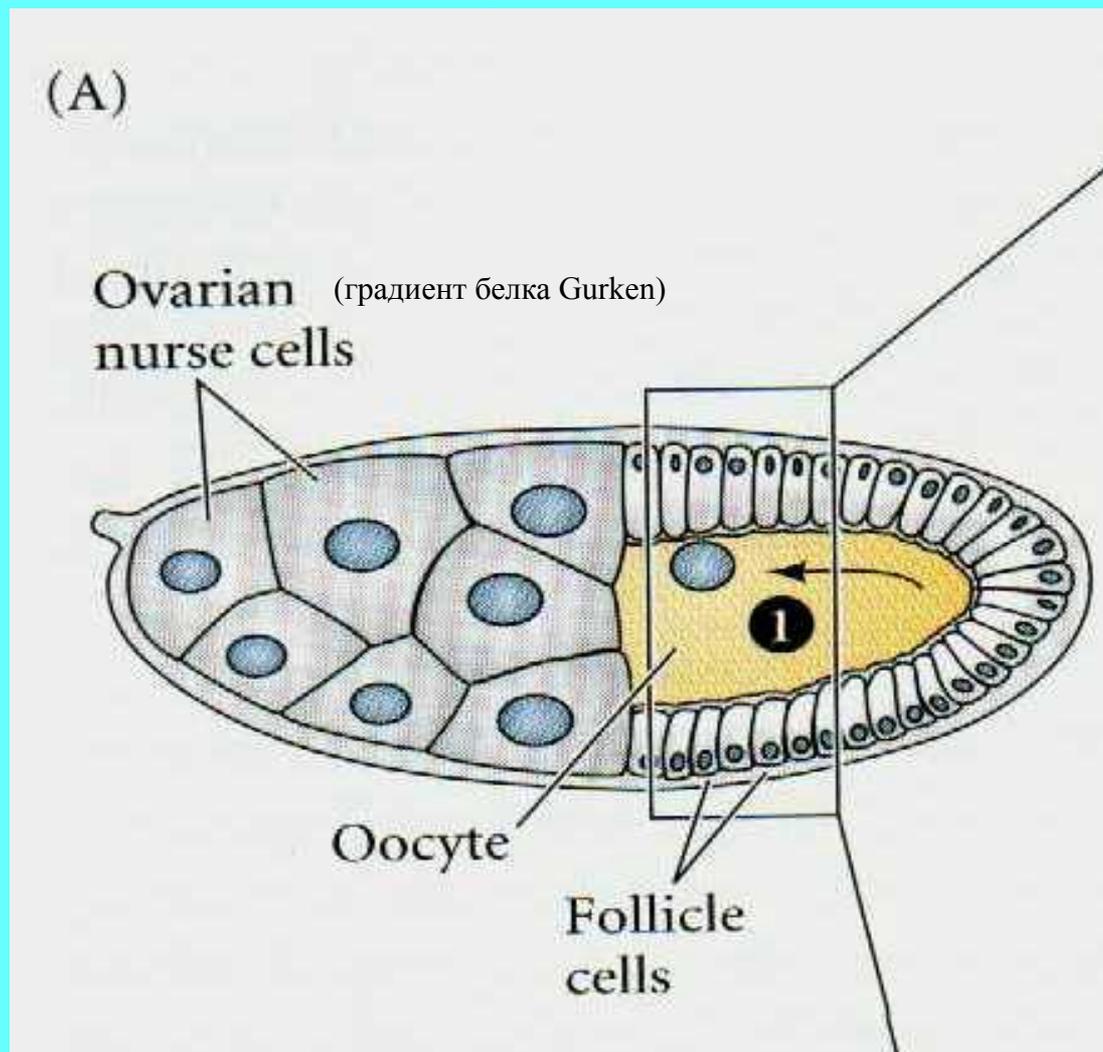
За формирование дорсо-вентральной оси отвечает 11 генов материнского эффекта

Число и характер генов, принимающих участие в формировании общего плана строения зародыша Drosophila

Three general classes of genes specify the body plan:

1. **Maternal effect genes** (~33).
2. **Segmentation genes** (~25).
3. **Homeotic selector genes** (~25).

Начальный этап дорсолизации (проходит до оплодотворения) - миграция ядра ооцита из постериорного района ближе к трофоцитам и дорсальным фолликулярным клеткам, начало экспрессии гена *gurken* с установлением градиента белка Gurken в этой области яйцеклетки



Градиент Gurken (белок, родственный эпидермальному ростовому фактору-EGF) в дорсальной части мембраны ооцита воспринимается фолликулярными клетками с помощью рецептора Torpedo (родственного рецептору EGF). Экспрессия гена *Gurken* подтверждается результатами гибридизации *in situ* и иммунохимическим окрашиванием

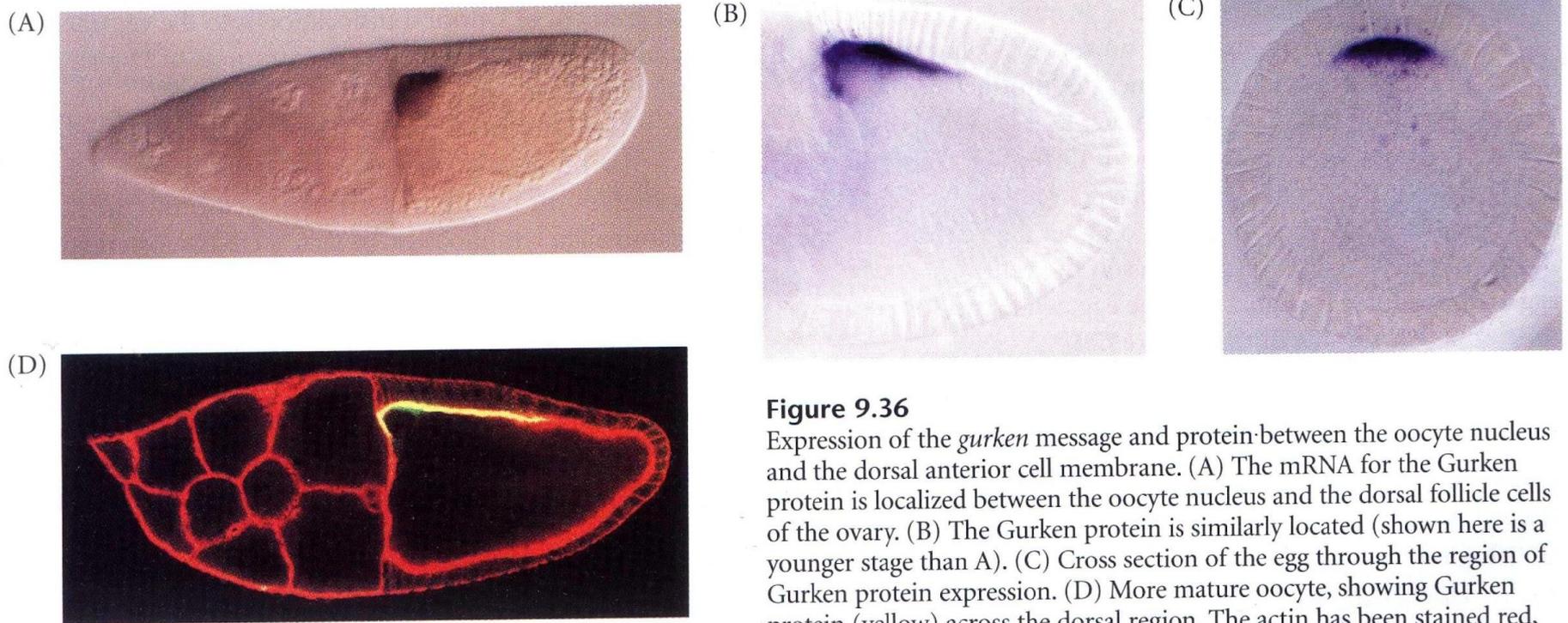
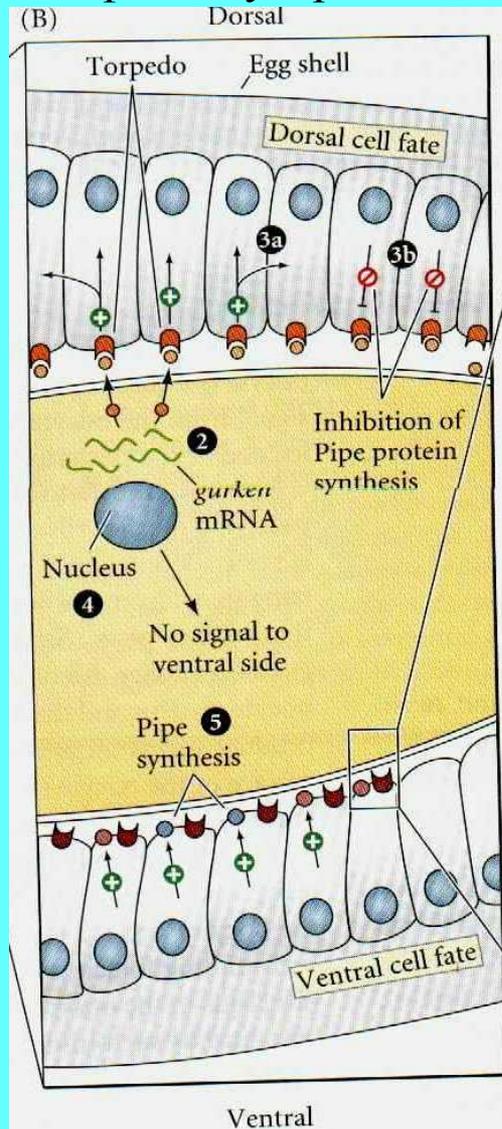


Figure 9.36

Expression of the *gurken* message and protein between the oocyte nucleus and the dorsal anterior cell membrane. (A) The mRNA for the Gurken protein is localized between the oocyte nucleus and the dorsal follicle cells of the ovary. (B) The Gurken protein is similarly located (shown here is a younger stage than A). (C) Cross section of the egg through the region of Gurken protein expression. (D) More mature oocyte, showing Gurken protein (yellow) across the dorsal region. The actin has been stained red, showing cell boundaries. As the oocyte grows, follicle cells migrate across the top of the oocyte, becoming exposed to Gurken. (A after Ray et al. 1996, courtesy of T. Schüpbach; B and C after Peri et al. 1999, courtesy of S. Roth; D courtesy of C. van Buskirk and T. Schüpbach.)

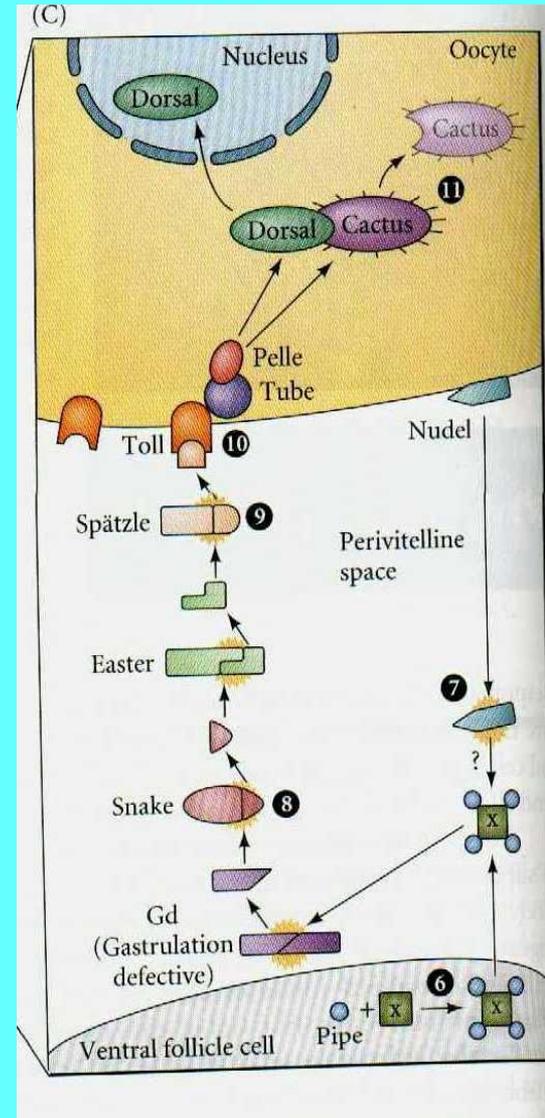
Комплекс взаимодействий Gurken (ооцит)- Torpedo (фолликулярные клетки) приводит к поляризации клеток фолликулярного эпителия на дорсальные и вентральные, благодаря односторонней активации синтеза белка Pipe в фолликулярных клетках с будущей вентральной стороной зародыша



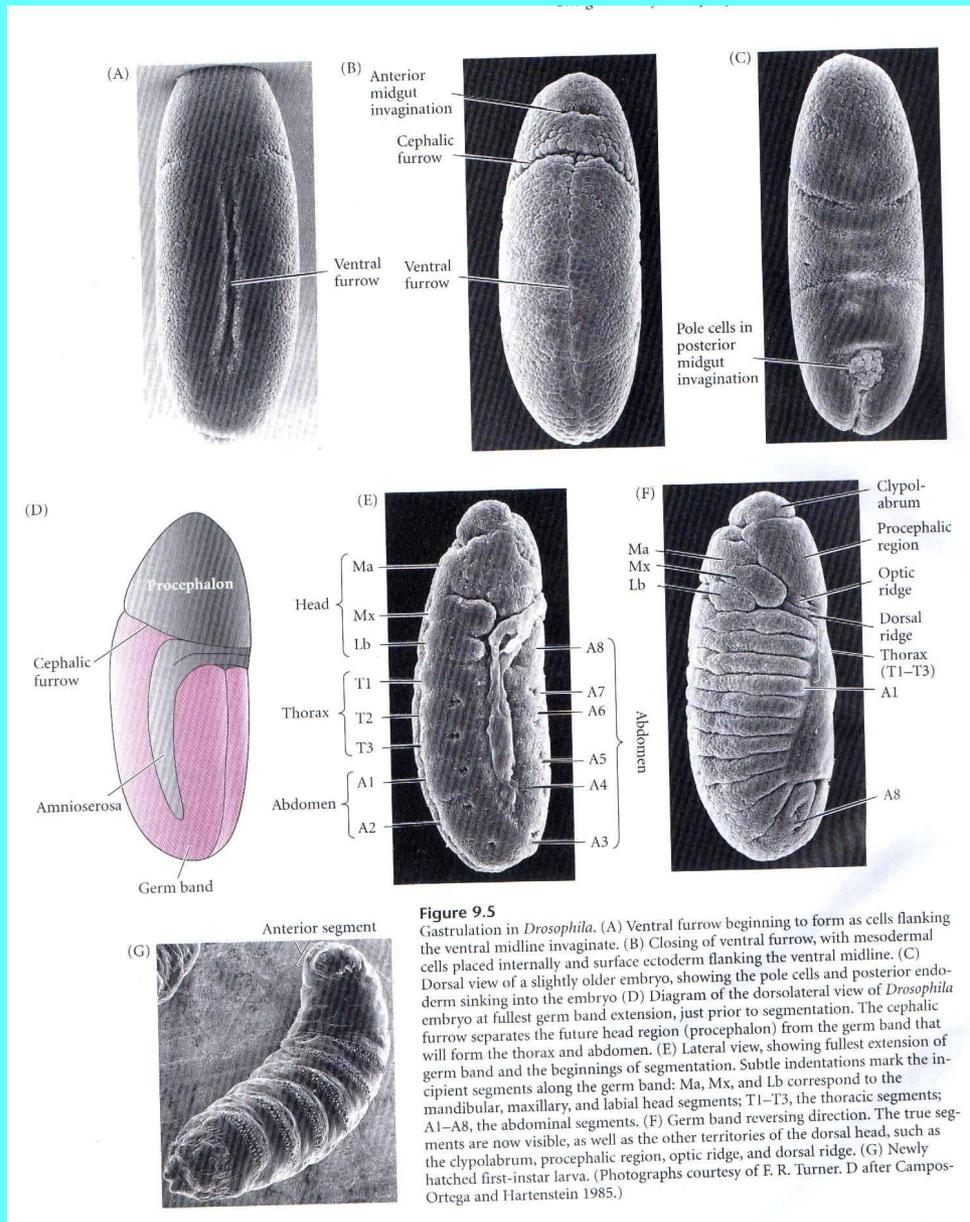
- 1 Oocyte nucleus travels to anterior dorsal side of oocyte. It synthesizes *gurken* mRNA which remains between the nucleus and the follicle cells.
- 2 *gurken* messages are translated. The Gurken protein is received by Torpedo proteins during mid-oogenesis.
- 3a Torpedo signal causes follicle cells to differentiate to a dorsal morphology.
- 3b Synthesis of Pipe protein is inhibited in dorsal follicle cells.
- 4 Gurken protein does not diffuse to ventral side.
- 5 Ventral follicle cells synthesize Pipe proteins.

Сигнал из вентральных фолликулярных клеток в цитоплазму зародыша. События происходят в перивителлиновом пространстве уже после оплодотворения. Взаимодействие **Nudel**- и **x**-факторов (модифицированно участием **Pipe**) запускает каскад активации протеаз с сигналингом через **Toll**-рецептор. ТФ - **Dorsal** освобождается из комплекса с **Cactus** (последний разрушается после фосфорилирования пртеинкиназой **Pelle**), **Dorsal** транслицируется в ядро. Формируется ядерный градиент **Dorsal**, вентрализирующий зародыш

- 6 In ventral follicle cells, Pipe completes the modification of unknown factor (x).
- 7 Nudel and factor (x) interact to split the Gastrulation-deficient (Gd) protein.
- 8 The activated Gd protein splits the Snake protein, and the activated Snake protein cleaves the Easter protein.
- 9 The activated Easter protein splits Spätzle; activated Spätzle binds to Toll receptor protein.
- 10 Toll activation activates Tube and Pelle, which phosphorylate the Cactus protein. Cactus is degraded, releasing it from Dorsal.
- 11 Dorsal protein enters the nucleus and ventralizes the cell.



Гастрюляция и дальнейшее развитие зародыша дрозофилы



Формирование дорсо-вентальной оси дрозофилы происходит в ходе гаструляции

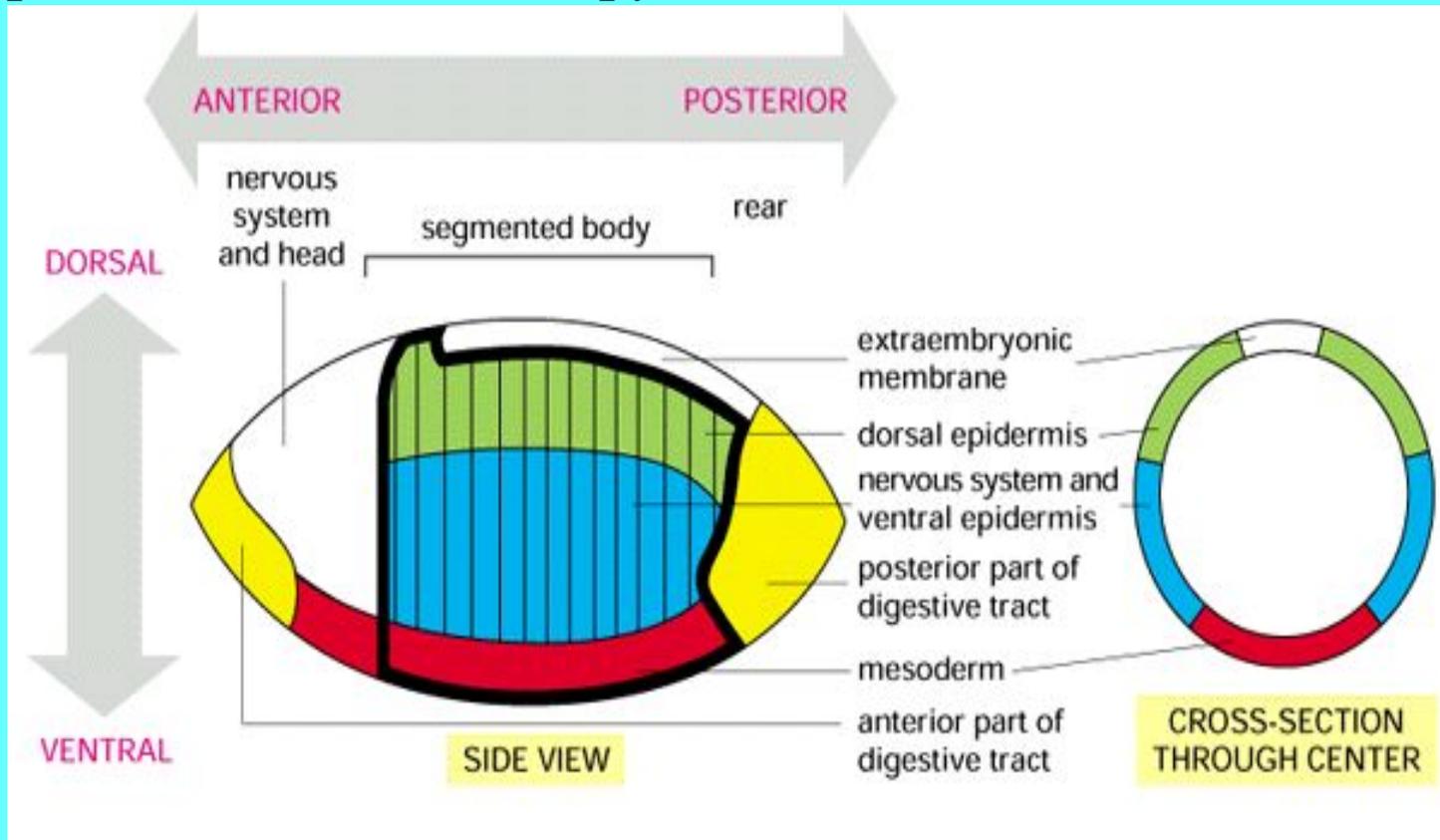
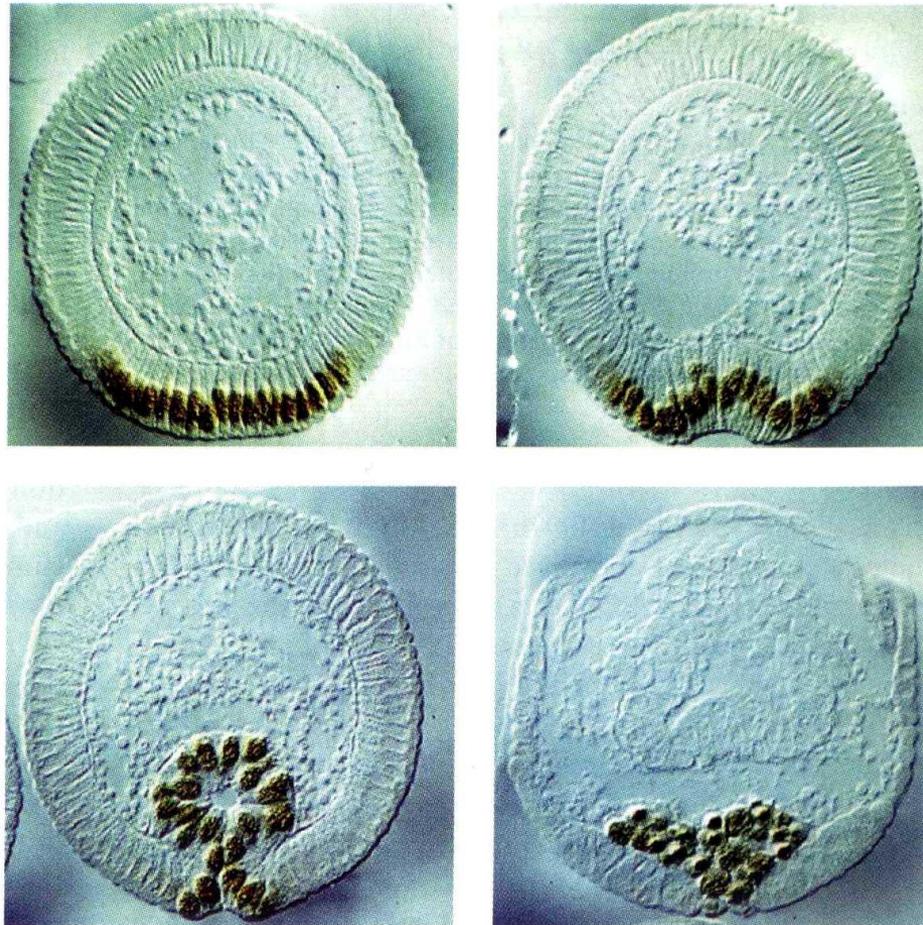


Figure 21-52. Fate map of a *Drosophila* embryo at the cellular blastoderm stage. The embryo is shown in side view and in cross-section, displaying the relationship between the dorsoventral subdivision into future major tissue types and the anteroposterior pattern of future segments. A heavy line encloses the region that will form segmental structures. During gastrulation the cells along the ventral midline invaginate to form mesoderm, while the cells fated to form the gut invaginate near each end of the embryo. Thus, with respect to their role in gut formation, the opposite ends of the embryo, although far apart in space, are close in function and in final fate. (After V. Hartenstein, G.M. Technau, and J.A. Campos-Ortega, *Wilhelm Roux' Arch. Dev. Biol.* 194:213-216, 1985.)

Начало **гастроуляции** у *Drosophila*: 16 наиболее вентральных клеток мигрируют внутрь зародыша и образуют в дальнейшем мезодерму (регистрируется по образованию «мезодермальных» белков Twist и Snail) . Энтодерма закладывается путём впячивания с антериорной и постериорной сторон зародыша.

Figure 9.39

Gastrulation in *Drosophila*. In this cross section, the mesodermal cells at the ventral portion of the embryo buckle inward, forming a tube, which then flattens and generates the mesodermal organs. The nuclei are stained with antibody to the Twist protein. (From Leptin 1991a; photographs courtesy of M. Leptin.)



Схематическое представление гаструляции

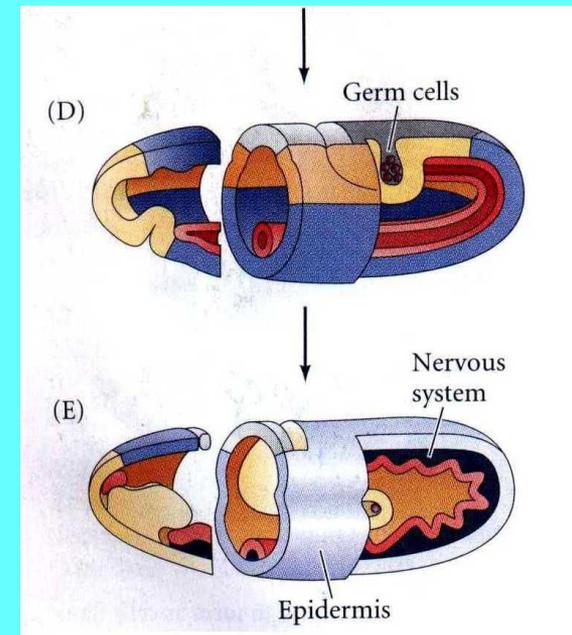
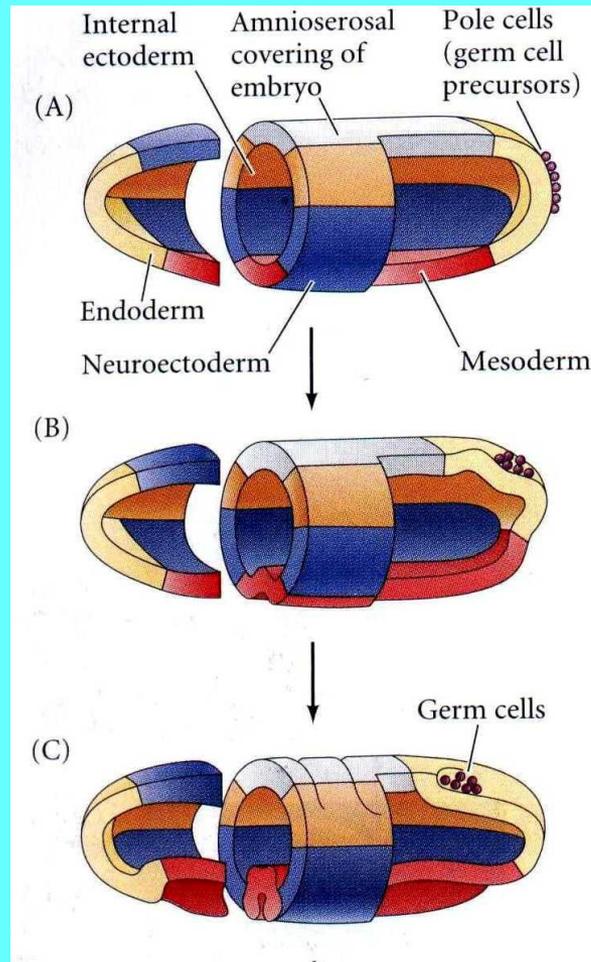
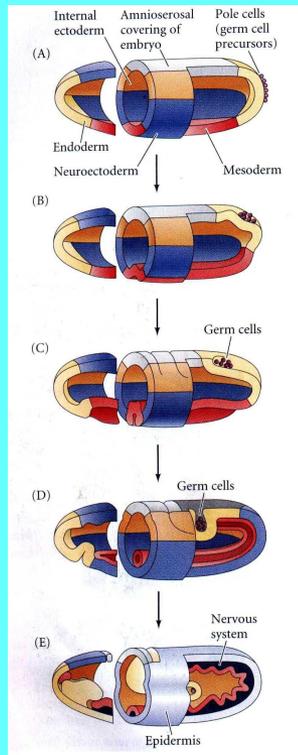


Figure 9.6

Schematic representation of gastrulation in *Drosophila*. (A) and (B) are surface and cut-away views showing the fates of the tissues immediately prior to gastrulation. (C) shows the beginning of gastrulation as the ventral mesoderm invaginates into the embryo. (D) corresponds to Figure 9.5A, while (E) corresponds to 9.5B and C. In (E), the neuroectoderm is largely differentiated into the nervous system and the epidermis. (After Campos-Ortega and Hartenstein 1985.)

Действие градиента Dorsal определяет дорсо-вентральную полярность в ходе гаструляции. Dorsal – транскрипционный фактор, по разному регулирует экспрессию генов, ответственных за спецификацию структур вдоль дорсо-вентральной оси зародыша

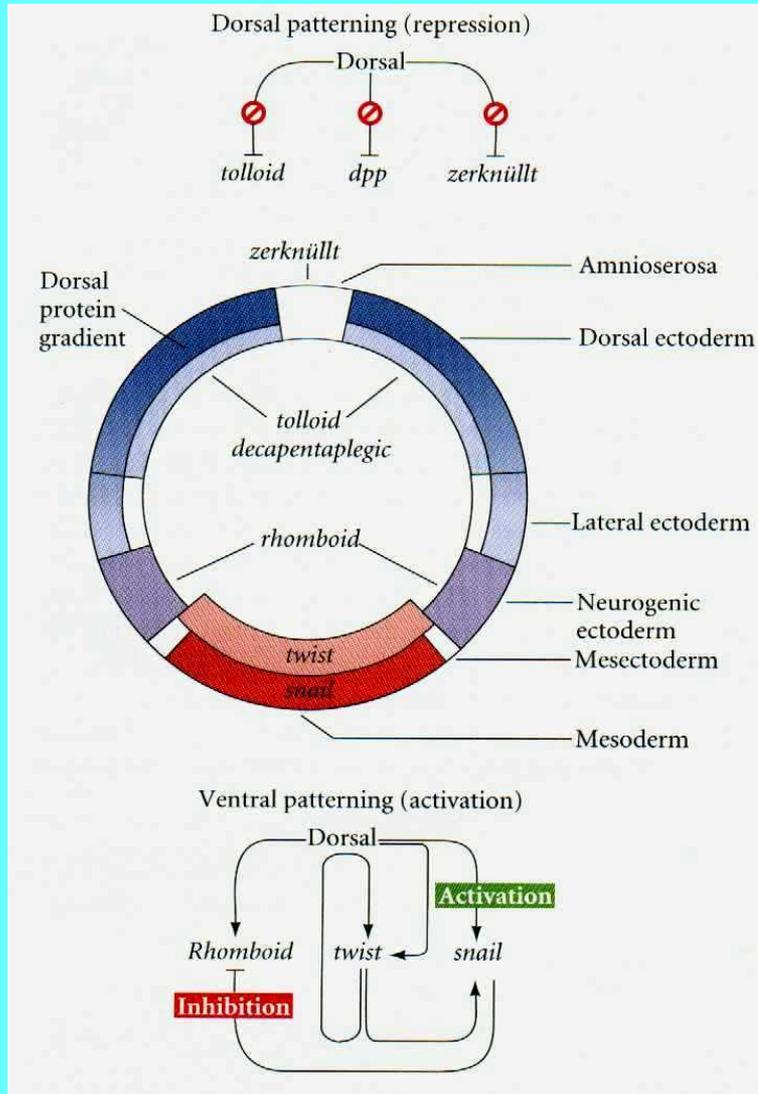


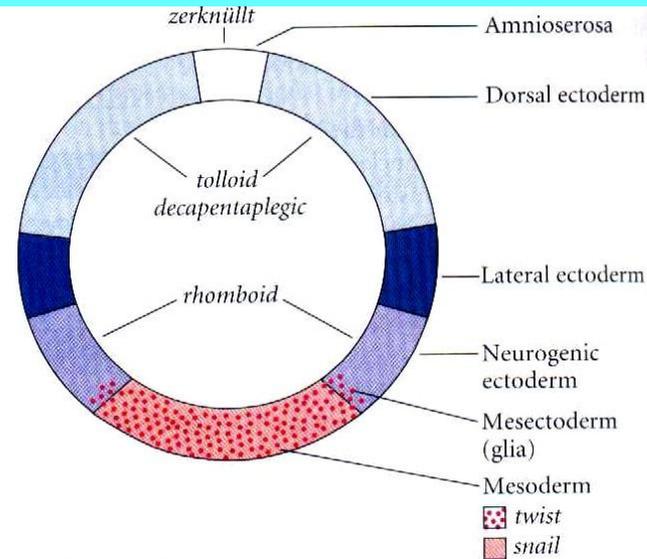
Figure 9.40

Subdivision of the dorsal-ventral axis by the gradient of Dorsal protein in the nuclei. The Dorsal protein activates the zygotic genes *rhomboid*, *twist*, and *snail*, depending on its nuclear concentration. The Snail protein, formed most ventrally, inhibits the transcription of the Rhomboid protein. The Dorsal protein also inhibits the expression of the *tolloid*, *decapentaplegic*, and *zerknüllt* genes in the ventral region. Differing concentrations of Zerknüllt protein determine the fates of the dorsal cells. (After Steward and Govind 1993.)

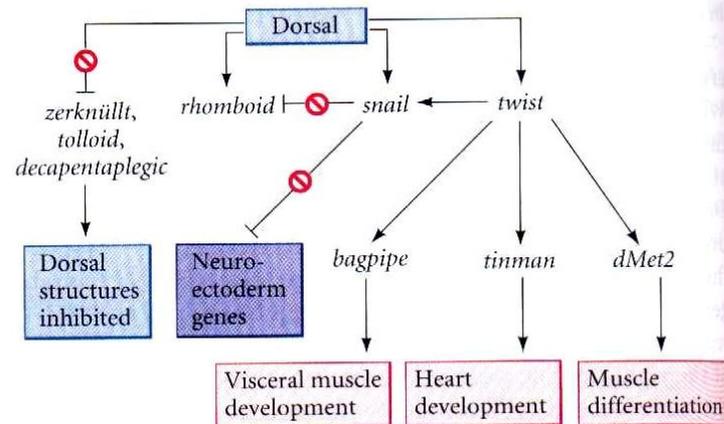
Действие градиента **Dorsal** определяет дорсо-вентральную полярность в ходе гаструляции. **Dorsal** – транскрипционный фактор, по разному регулирует экспрессии генов, ответственных за спецификацию структур вдоль дорсо-вентральной оси зародыша

Figure 9.41

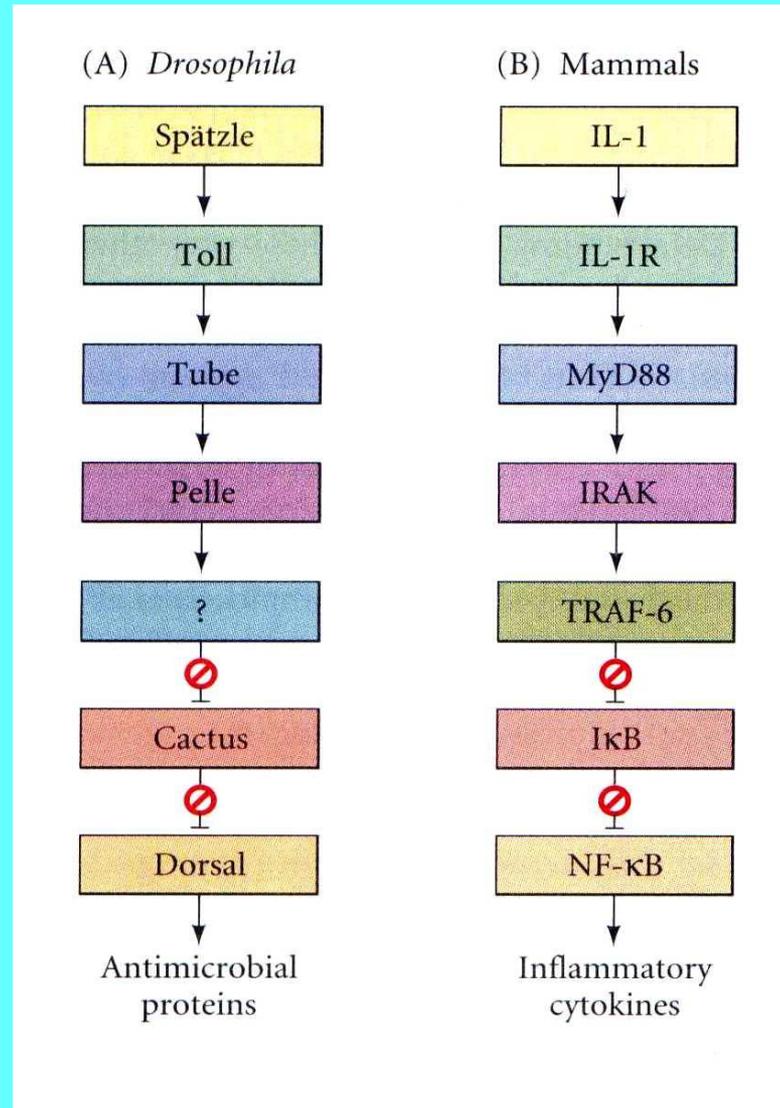
Subdivision of the *Drosophila* dorsal-ventral axis by the gradient of Dorsal protein in the nuclei. (A) Dorsal protein activates the zygotic genes *rhomboid*, *twist*, and *snail*, depending on its nuclear concentration. The mesoderm forms where Twist and Snail are present, and the glial cells form where Twist and Rhomboid interact. Those cells with Rhomboid, but no Snail or Twist, form the neurogenic ectoderm. (B) Interactions in the specification of the ventral portion of the *Drosophila* embryo. Dorsal protein inhibits those genes that would give rise to dorsal structures (*tolloid*, *decapentaplegic*, and *zerknüllt*) while activating the three ventral genes. Snail protein, formed most ventrally, inhibits the transcription of *rhomboid* and prevents ectoderm formation. Twist activates *dMet2* and *bagpipe* (which activate muscle differentiation) as well as *tinman* (heart muscle development). (A after Steward and Govind 1993; B after Furlong et al. 2001.)



(B) VENTRAL PATTERNING



Консерватизм сигнальной цепочки, действующей через Toll- рецепторы у дрозофилы и млекопитающих (эффект коопции). Сигнальная цепочка, действующая через Toll-рецептор, используется для запуска воспалительного ответа у млекопитающих и для активации антифунгального и антибактериального действий у личинок и взрослых мух. Гомологичные белки отмечены одинаковым цветом



Использование гомологичных компонентов сигнальной цепочки, включая ТФ: Dorsal/Dif /Relish, в иммунных реакциях у дрозофилы (антифунгальный-Relish и антибактериальный-Dif ответы) и у человека (NF-kappaB)

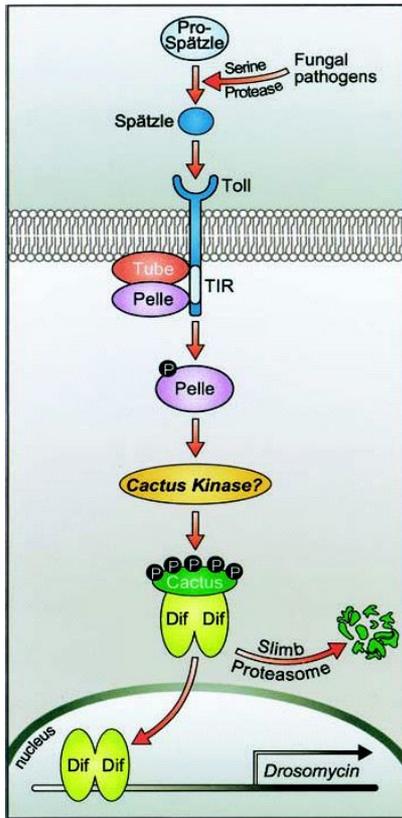


Figure 1. The *Drosophila* Toll/antifungal signaling pathway. This model highlights current understanding of the Toll signaling pathway as it functions during the immune response. The pattern recognition receptors that recognize fungal pathogens are unknown, but they are believed to activate a serine protease cascade, culminating in the cleavage of the Toll ligand Spätzle. Ligand binding to Toll leads to the recruitment of two proteins, the adaptor Tube and the kinase Pelle. Recruitment of Pelle is thought to cause its activation and disassociation from Toll. Activated Pelle may then activate, directly or indirectly, a Cactus kinase that is responsible for signaling the proteasome-mediated degradation of Cactus. Currently, the biochemical steps between Pelle and Cactus degradation remain undetermined, and the Cactus kinase has not yet been identified.

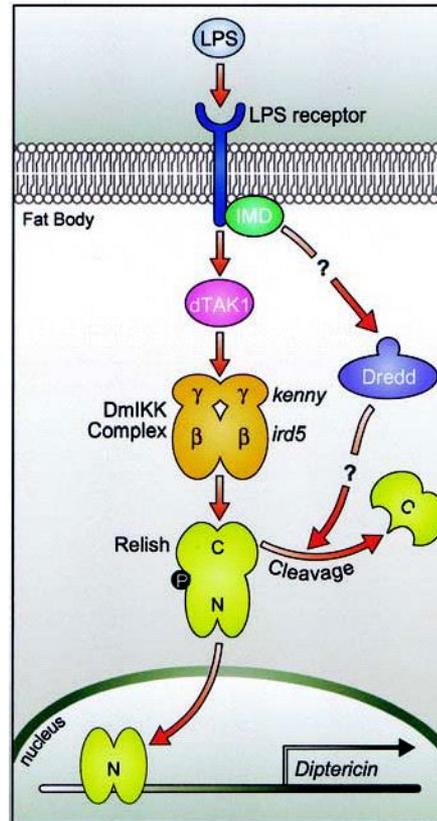


Figure 2. The *Drosophila* antibacterial signaling pathway. In this model the signaling pathway is activated by LPS through unidentified receptor(s) and leads to Relish cleavage. Downstream of the receptors, this signaling pathway bifurcates. One part leads to activation of the *Drosophila* IKK complex, which then phosphorylates Relish. The other part functions through the caspase Dredd and leads to the cleavage of phosphorylated Relish. At present it is not known whether Dredd acts directly or indirectly to cleave Relish. The IMD protein may function in one or both of these pathways. (N) Amino-terminal domain; (C) carboxy-terminal domain.

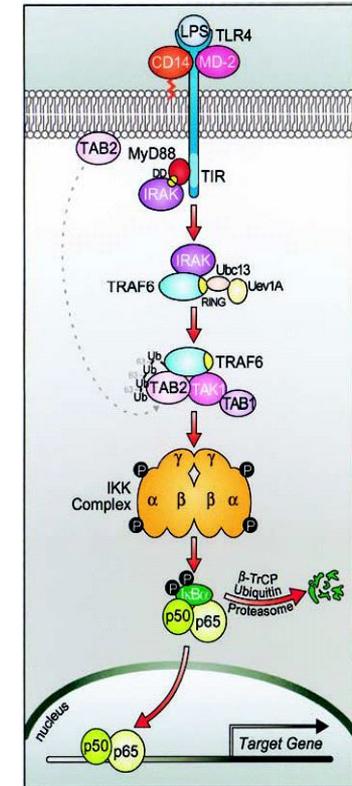


Figure 3. The LPS signaling pathway in mammals. In this model LPS is recognized by a complex of three proteins, CD14, MD-2, and TLR4. TLR4 activates the intracellular signaling cascade by recruiting MyD88 and IRAK to the membrane. IRAK associates with the receptor complex transiently, once released IRAK can associate with and activate TRAF6. The TRAF6 RING finger, in combination with Ubc13 and Uev1A, mediates the K63-extended polyubiquitination of TRAF6 itself. The TAK1/TAB1/TAB2 complex is activated by its association with ubiquitinated TRAF6. Interestingly, the TAK1-associated protein TAB2 translocates from the membrane fraction to the cytoplasmic fraction upon treatment with IL-1. Once activated, the TAK1 complex phosphorylates and activates the IKK complex. The activated IKK complex then phosphorylates IκBα, leading to its ubiquitination and degradation by the proteasome.

Декартовы координаты районов экспрессии генов, задаваемые пересечением передне-задней и дорсо-вентральной осей, определяют закладку органов и участков тела насекомого (на примере закладки слюнной железы)

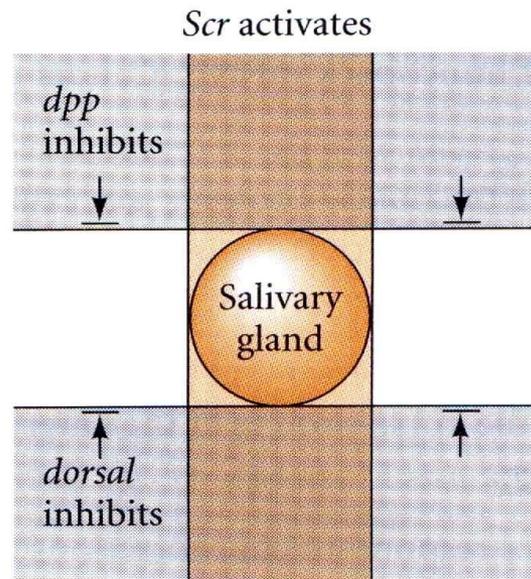


Figure 9.41

Cartesian coordinate system for the expression of genes giving rise to *Drosophila* salivary glands. These genes are activated by the protein product of the *sex combs reduced* (*scr*) homeotic gene in a narrow band along the anterior-posterior axis, and they are inhibited in the regions marked by *decapentaplegic* (*dpp*) and *dorsal* gene products along the dorsal-ventral axis. This pattern allows salivary glands to form in the midline of the embryo in the second parasegment. (After Panzer et al. 1992.)