

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ РАЗВИТИЯ МЕХАНОРЕЦЕПТОРОВ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* – ОПИСАНИЕ В БАЗЕ ДАННЫХ «NEUROGENESIS»

Т.А. Бухарина¹, Д.П. Фурман^{1,2}

¹ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: bukharina@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Большие щетинки (макрохеты) располагаются упорядоченным образом на голове и теле дрозофилы и образуют характерный для каждого вида щетиночный узор. Простая организация каждого щетиночного органа, который состоит всего из четырех специализированных клеток, делает макрохеты удобной моделью для исследования закономерностей формирования пространственных структур с фиксированным числом элементов и механизма клеточной дифференцировки.

В работе систематизированы экспериментальные данные об основных генах и их продуктах, контролирующих три этапа формирования щетиночного узора. На основе созданной базы данных реконструированы две генные сети – «Neurogenesis(determination)» и «Neurogenesis(asymmetric division)». Рассмотрены ключевые элементы и механизмы, обеспечивающие функционирование этих генных сетей.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, макрохеты, *achaete-scute* комплекс, сигнальные пути, генные сети, регуляторные контуры.

Введение

Формирование специализированных пространственных структур занимает важное место в реализации онтогенетической программы многоклеточных организмов. Примером такой структуры является щетиночный узор *D. melanogaster*, который образуют на голове и теле насекомого макрохеты (щетинки) – внешние сенсорные органы, выполняющие функцию механорецепторов.

Дефинитивный щетиночный орган состоит из 4 клеток: трихогена (щетинковой клетки), тормогена (гнездовой клетки), нейрона и текогена (клетки оболочки нерва). Все они являются производными одной родительской клетки (SOP – Sensory Organ Precursor cell). В морфогенезе макрохет выделяются три этапа. Первый этап состоит в обособлении из массы эктодермальных клеток крылового имагинального диска пронеуральных кластеров – групп из 20–30 клеток, каждая из которых обладает потенциальной возможностью стать SOP. На втором этапе детер-

минируется родительская клетка и уточняется ее позиция внутри пронеурального кластера. В ходе заключительного этапа происходят два асимметричных деления SOP и дифференцировка дочерних клеток в компоненты щетиночного органа. Каждый этап имеет собственное генетическое обеспечение. За топологию пронеуральных кластеров ответственна группа пронеуральных генов комплекса *achaete-scute* (*AS-C*), локальная экспрессия которых инициируется в определенных районах эктодермы специфичными транскрипционными факторами – продуктами генов *u-shaped*, *pannier* и комплекса *iroquois* (Gymez-Skarmeta *et al.*, 2003). Детерминацию родительской клетки и ее позиционирование в пределах кластера контролируют нейрогенные гены, входящие в Notch сигнальный путь (Lai, 2004); направление дифференцировки каждой из дочерних клеток определяют селекторные гены, в частности *numb* и *neuralized* (Knoblich *et al.*, 1995; Bardin *et al.*, 2004).

Контроль становления щетиночного узора осуществляется сложной молекулярно-генети-

ческой системой (Фурман, Бухарина, 2008). К настоящему времени накоплено значительное число экспериментальных данных по этому вопросу, и актуальность приобретает задача их интеграции, систематизации и анализа.

Материалы и методы

Имеющиеся данные по генетическому контролю развития макрохет сведены в базу данных «Neurogenesis», созданную на основе аннотирования 339 литературных источников. В настоящее время база содержит информацию о 90 генах и 124 продуктах этих генов – 119 белках и 5 РНК.

С помощью технологии GeneNet (Ananko *et al.*, 2005) на основе базы данных «Neurogenesis» реконструированы две генные сети, описывающие два первых этапа (сеть «Neurogenesis (determination)») и третий этап (сеть «Neurogenesis (asymmetric division)») морфогенеза макрохет. Основные характеристики двух генных сетей приведены в табл. 1.

Генная сеть «Neurogenesis (determination)» доступна по адресу: http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenet/viewer/Neurogenesys_determination.html.

Генная сеть «Neurogenesis:determination» анализировалась на предмет поиска ключевых объектов и замкнутых регуляторных контуров – основных характеристик генных сетей. При анализе использовались средства технологии GeneNet, основанные на методах теории графов (Колчанов и др., 2000).

Результаты и обсуждение

Анализ генной сети «Neurogenesis (determination)» показал, что она характеризуется крайне малым количеством ключевых объектов –

компонентов с максимальными степенями связанности с другими объектами. Таких объектов всего два: комплекс генов *AS-C* и гетеродимерный транскрипционный фактор *AC/DA* (Achaete/Daughterless) с 19 и 10 связями соответственно (рис. 1).

Действительно, экспериментально показано, что инактивация генов комплекса *achaete-scute* влечет утрату всех или части макрохет стандартного набора (Garcia-Bellido, Santamaria, 1978). Нейтральный путь развития клеток предопределяется содержанием в них пронеуральных белков – продуктов генов комплекса *achaete-scute*. В клетках пронеурального кластера оно

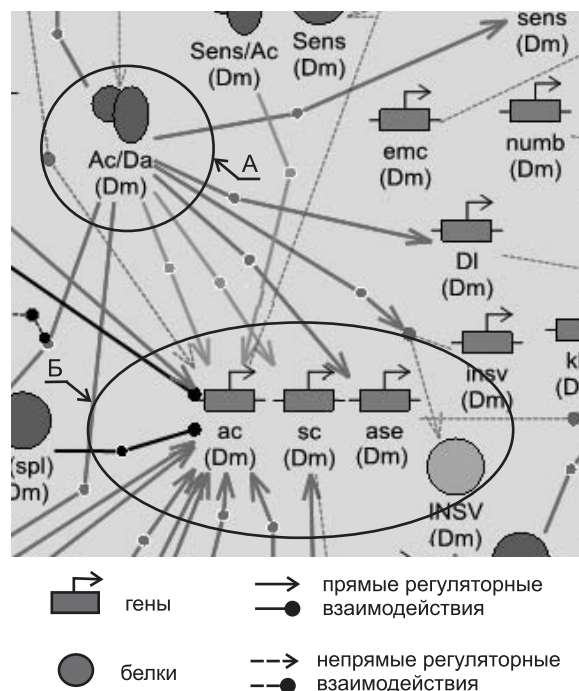


Рис. 1. Фрагмент генной сети «Neurogenesis (determination)» с ключевыми объектами: транскрипционным фактором *AC/DA* (А) и *AS-C* (Б).

AC/DA – Achaete/Daughterless; *ac* – *achaete*, *sc* – *scute*, *ase* – *asense* (пронеуральные гены, входящие в состав *AS-C*).

Таблица 1

Основные характеристики генных сетей «Neurogenesis:determination» и «Neurogenesis:asymmetric division»

Название сети	Количество белков	Количество генов	Количество РНК	Количество связей	Аннотировано статей
Neurogenesis:determination	90	71	5	220	226
Neurogenesis:asymmetric division	68	46	2	121	120

выше, чем в окружающих клетках эктодермы, а в родительской клетке достигает максимального значения (Reeves, Posakony, 2005).

В генной сети «Neurogenesis (determination)» существуют два типа регуляторных взаимодействий, позволяющих изменять экспрессию генов *AS-C*. Первый тип функционирует при участии регуляторных контуров (с положительными или отрицательными обратными связями), определяющих экспрессию внутри одной клетки. Второй тип связан с межклеточной регуляцией экспрессии генов *AS-C* через регуляторные контуры, включающие сигнальные пути EGFR и Notch.

К первому типу относятся авто- и трансрегуляция экспрессии генов комплекса *AS-C*. Позитивная авторегуляция осуществляется гетеродимерами AC/DA, негативная – гетеродимерами AC/EMC. Трансрегуляция транскрипционной активности комплекса осуществляется через взаимодействие с активаторами (Senseless, Charlatan) и репрессорами (Hairy в комплексе с кофактором Groucho) (рис. 2). Для процессов авторегуляции и позитивной трансрегуляции показано наличие элементарных замкнутых кон-

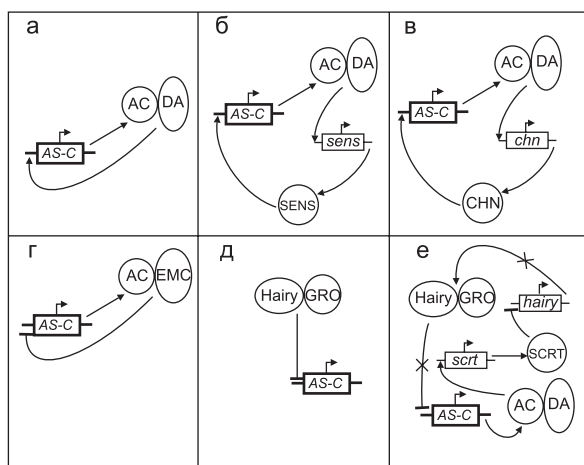


Рис. 2. Схема внутриклеточной регуляции активности генов *AS-C*.

а – позитивная авторегуляция; б, в – позитивная трансрегуляция, г – негативная авторегуляция, д – негативная регуляция репрессором Hairy; е – дополнительный регуляторный контур, подавляющий воздействие репрессора Hairy. Курсивом обозначены названия генов, прямым шрифтом – названия белков. *AS-C* – *achaete-scute* комплекс, AC – Achaete, sens – senseless, GRO – Groucho, EMC – Extramacrochaetae, DA – Daughterless, chn – charlatan, sct – scratch. Стрелками указана активация, линиями с обрубленными окончаниями – репрессия процессов.

туров, тогда как для процесса негативной трансрегуляции найти такой контур не удалось.

В системе регуляции экспрессии генов *achaete-scute* выявляется более сложный замкнутый контур, регулирующий активность *AS-C* через блокировку экспрессии гена *hairy*. Блокировка является результатом воздействия на этот ген репрессора, кодируемого геном *scratch*, экспрессия которого активируется пронейральными белками (рис. 2, е).

Благодаря активации и репрессии внутриклеточных механизмов регуляции активности генов *AS-C*, в клетках пронейрального кластера, а затем и в клетке SOP достигается и поддерживается уровень белков этого комплекса, необходимый для дальнейшего развития щетиночного органа (Cabreza, Alonso, 1991; Cabrera *et al.*, 1994; Van Doren *et al.*, 1994; Vaessin *et al.*, 1994; Roark *et al.*, 1995; Smith, Cronmiller, 2001; Escudero *et al.*, 2005).

Наряду с внутриклеточными функционируют и межклеточные механизмы регуляции активности генов *AS-C* через EGFR- и Notch сигнальные пути, которые оказывают противоположное влияние на транскрипционную активность комплекса. EGFR-сигнальный путь завершается синтезом белка Pointed – транскрипционного фактора, активирующего экспрессию генов комплекса *achaete-scute* в клетках пронейрального кластера (Culi *et al.*, 2001). В то же время пронейральные белки активируют ген *argos*, продукт которого блокирует передачу EGFR-сигнала в окружающие эктодермальные клетки, что способствует увеличению различий по содержанию белков *AS-C* между клетками кластера и окружающими клетками эктодермы (Golembo *et al.*, 1996; Culi *et al.*, 2001) (рис. 3).

Notch-сигнальный путь опосредует процесс латерального ингибирования, закрывающий возможность дифференцировки по нейральному типу всем клеткам кластера, кроме одной (Schweisguth *et al.*, 2004). Финальными событиями в трансдукции сигнала по Notch-пути являются инициация транскрипции генов комплекса *Enhancer of split (E(spl))* и подавление репрессорными белками E(spl)-C транскрипции генов *AS-C* и/или их генов-мишеней во всех клетках пронейрального кластера, кроме будущей клетки SOP, где экспрессия генов *AS-C* продолжается в прежнем режиме (рис. 3).

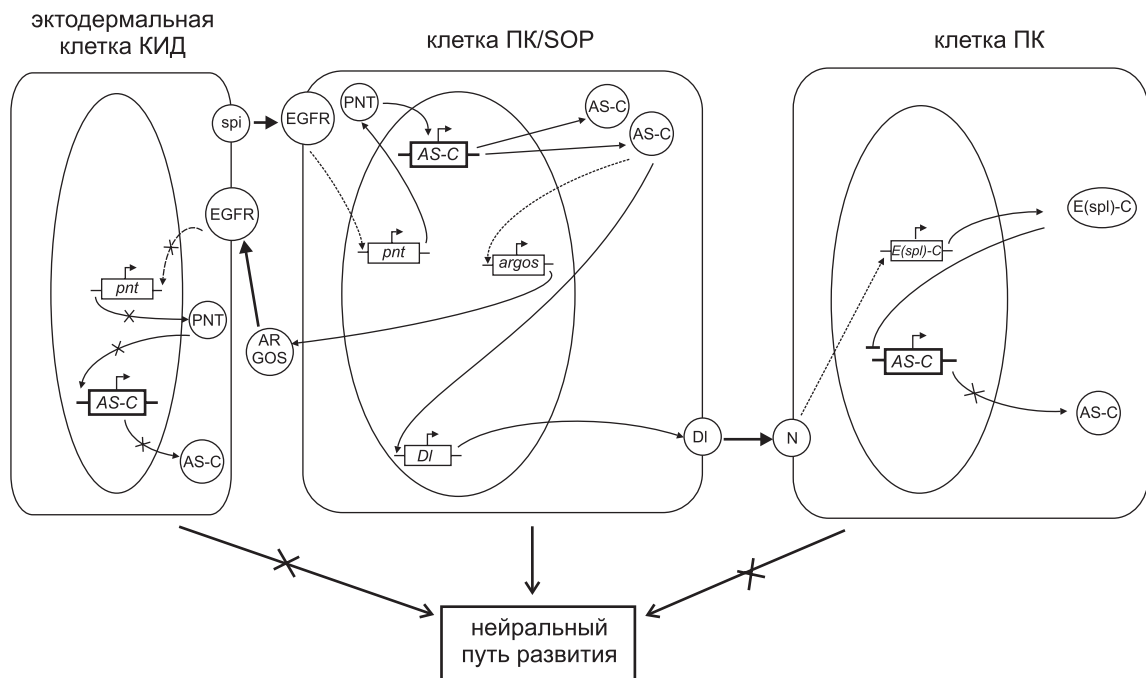


Рис. 3. Схема участия EGFR- и Notch-сигнальных путей в регуляции экспрессии генов комплекса *achaete-scute* в эктодермальных клетках КИД и различных типах клеток пронеурального кластера.

pnt – pointed, spi – spitz, EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor, DI – Delta, E(spl)-C – Enhancer of split complex. Остальные обозначения соответствуют обозначениям на рис. 2.

Помимо прямого подавления активности генов *AS-C* репрессорными белками E(spl)-C белки Notch-каскада запускают дополнительные регуляторные механизмы в клетках пронеурального кластера, окружающих клетку SOP. В результате в этих клетках прекращается экспрессия гена

daughterless и активируется экспрессия гена *extramacrochaetae*, что приводит к блокировке позитивной авторегуляции экспрессии генов комплекса *AS-C* (Takahisa *et al.*, 1996; Wesley, Saez, 2000) (рис. 4, а). Одновременно с этим происходит снятие запрета на трансляцию РНК

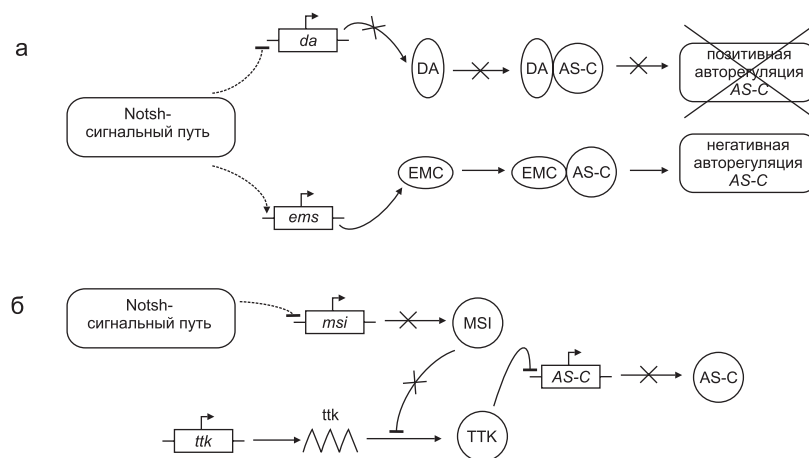


Рис. 4. Дополнительные контуры, регулирующие экспрессию генов комплекса *achaete-scute*, активирующиеся с участием белков N-каскада.

msi – musashi, ttk – tramtrack. Остальные обозначения соответствуют обозначениям на рис. 2.

tramtrack, который является репрессором пронеуральных генов, через подавление транскрипции гена *musashi* (Badenhorst *et al.*, 2002) (рис. 4, б).

Таким образом, сочетанное действие внутри- и межклеточных механизмов, регулирующих экспрессию генов *AS-C*, приводит к дифференциальной активности генов этого комплекса в разных клетках пронеурального кластера. В результате достигается критический уровень содержания белков *AS-C* в единственной клетке кластера, что является необходимым условием для ее детерминации как родительской клетки щетиночного органа.

На третьем этапе морфогенеза макрохет происходят два последовательных деления клетки SOP, в результате которых возникают 4 дочерние клетки. Далее они дифференцируются в разные компоненты щетиночного органа: трихоген, тормоген, нейрон и текоген. Этот этап поддерживается генной сетью, насчитывающей около 50 генов.

Ключевыми объектами сети «Neurogenesis (asymmetric division)» являются белки Notch и Numb. Значительную роль в процессе асимметричного деления играют интернализация белков Sanpodo, Delta и Notch (Seto *et al.*, 2002), а также процессы, обеспечивающие правильную ориентацию веретена деления клетки относительно оси распределения белковых детерминант Numb, Neuralized (NEUR), α -Adaptin (Bowman *et al.*, 2006).

Именно асимметричное распределение белковых детерминант задает направление передачи Notch-сигнала между дочерними клетками и определяет дальнейшее направление их дифференцировки (рис. 5) (Jan Y., Jan L., 2001; Bardin *et al.*, 2004).

После первого митотического деления распределение Numb, NEUR и Notch в дочерних клетках оказывается различным вследствие преимущественной сегрегации этих белков в одну из них (Knoblich *et al.*, 1995; Hutterer, Knoblich, 2005; Le Borgne *et al.*, 2005) (рис. 5).

Дочерняя клетка, в которую попали Numb и NEUR, пойдет по пути нейральной специализации, поскольку Numb будет блокировать передачу Notch-сигнала внутрь нее, а NEUR способствовать передаче сигнала во вторую клетку, свободную от Numb и NEUR. В последующем она даст начало нейрону и текогену.

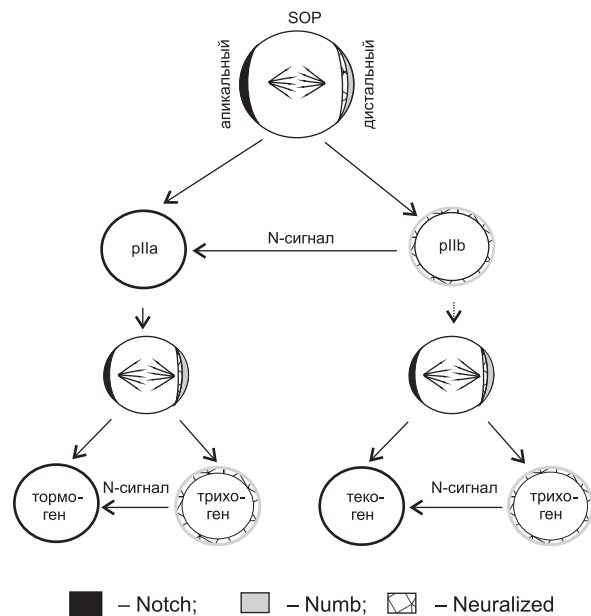


Рис. 5. Схема распределения белков Numb, Neuralized, Notch и направлений передачи N-сигнала при асимметричном делении родительской клетки сенсорного органа и ее дочерних клеток.

pIIa и pIIb – дочерние клетки SOP.

Отсутствие Numb и NEUR во второй дочерней клетке предопределяет возможность нормального восприятия ею Notch-сигнала, что закроет для нее нейральную ветвь развития. После второго митотического деления она даст начало трихо- и тормогену (Frise *et al.*, 1996; Jafar-Nejad *et al.*, 2002).

Позиционирование белковых детерминант в родительской клетке определяется формированием специфических белковых комплексов на противоположных полюсах клетки SOP. В апикальной части клетки SOP образуется комплекс, состоящий из белков, связывающихся с гетеродимером Partner of inscuteable (Pins) и α -субъединицы G белка (Gai). Это белки Discs Large 1 (Dlg), нефосфорилированная форма белка Lethal(2) giant larvae (Lgl), Partner of Numb (Pon) и Numb. В дистальной части клетки располагается комплекс, состоящий из атипичной протеинкиназы C (aPKC), Par6, Bazooka и фосфорилированного LGL. Экспериментально показано, что именно фосфорилирование LGL с помощью aPKC нарушает связь этого белка с мембраной клетки и препятствует кортикальной локализации белковых детерминант (Betschinger *et al.*, 2003).

Обязательным условием асимметричного деления является определенное расположение веретена деления относительно полярно распределенных белковых детерминант. Комплекс Pins, Gai и белка Mushroom body defect (Mud), ответственный за связывание с микротрубочками веретена, усиливает их полимеризацию и обеспечивает правильную ориентацию веретена деления в клетке (Bowman *et al.*, 2006).

Общая схема регуляции асимметричного деления клеток представлена на рис. 6.

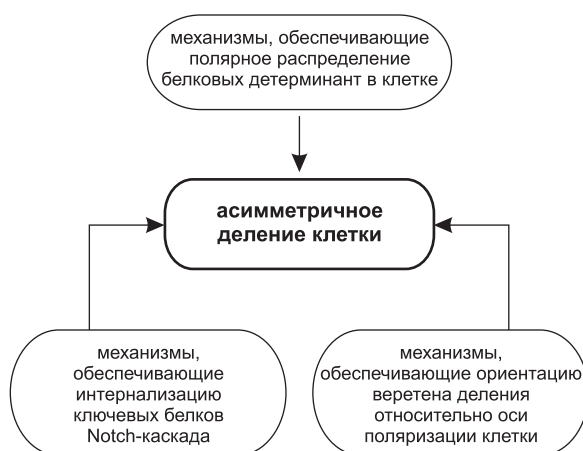


Рис. 6. Общая схема процессов, обеспечивающих асимметричное деление клеток.

Формирование дефинитивного щетиночного органа является результатом последовательного ограничения формообразовательных потенциалов эктодермальных клеток крылового имагинального диска. После определения топологии пронейральных кластеров система генетического обеспечения морфогенеза макрохет начинает работать на увеличение содержания пронейральных белков сначала в клетках пронейрального кластера, а затем в единственной родительской клетке. Контроль этого процесса обеспечивается как внутриклеточной регуляцией активности генов *AS-C*, так и межклеточными событиями, опосредуемыми сигнальными путями EGFR и Notch. Асимметричное деление родительской клетки детерминирует последующее направление специализации дочерних клеток. Асимметричность деления определяется положением специфических белковых комплексов на полюсах родительской клетки,

ориентацией веретена деления относительно этих белковых комплексов, а также процессом интернализации ряда мембранных белков.

В молекулярно-генетическую систему контроля морфогенеза макрохет вовлечено несколько десятков генов.

Благодарности

Работа была поддержана проектом № 10.7 «Компьютерное моделирование и экспериментальное конструирование генных сетей» по программе РАН «Молекулярная и клеточная биология»; проектом № 18.13 «Эволюция молекулярно-генетических систем: компьютерный анализ и моделирование» по программе РАН «Происхождение и эволюция биосферы»; государственным контрактом 10104-37/П-18/110-327/180608/015 на выполнение НИиОКР по теме «Экосистемно-биоценологические и генетические механизмы биологической эволюции и корреляция биологических событий» по подпрограмме 2 программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Происхождение и эволюция биосферы» и грантом НШ-2447.2008.4 «Биоинформатика и системная компьютерная биология».

Литература

- Колчанов Н.А., Ананьо Е.А., Колпаков Ф.А. и др. Генные сети // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. № 4. С. 533–544.
- Фурман Д.П., Бухарина Т.А. Генетический контроль развития макрохет // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 4. С. 245–258.
- Ananko E.A., Podkolodny N.L., Stepanenko I.L. *et al.* GeneNet in 2005 // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. P. D425–D427.
- Badenhorst P., Finch J.T., Travers A.A. Tramtrack cooperates to prevent inappropriate neural development in *Drosophila* // Mech. Dev. 2002. V. 117. P. 87–101.
- Bardin A.J., Le Borgne R., Schweisguth F. Asymmetric localization and function of cell-fate determinants: a fly's view // Curr. Opin. Neurobiol. 2004. V. 14. P. 6–14.
- Betschinger J., Mechtler K., Knoblich J.A. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl // Nature. 2003. V. 422. P. 326–330.
- Bowman S.K., Neumüller R.A., Novatchkova M. *et al.* The *Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates

- spindle orientation in asymmetric cell division // *Dev. Cell*. 2006. V. 10. P. 731–742.
- Cabrera C.V., Alonso M.C. Transcriptional activation by heterodimers of the *achaete-scute* and *daughterless* gene products of *Drosophila* // *EMBO J*. 1991. V. 10. P. 2965–2973.
- Cabrera C.V., Alonso M.C., Huikeshoven H. Regulation of scute function by extramacrochaete *in vitro* and *in vivo* // *Development*. 1994. V. 120. P. 3595–3603.
- Culi J., Martin-Blanco E., Modolell J. The EGF receptor and N signaling pathways act antagonistically in *Drosophila* mesothorax bristle patterning // *Development*. 2001. V. 128. P. 299–308.
- Escudero L.M., Caminero E., Schulze K.L. *et al.* Charlatan, a Zn-finger transcription factor, establishes a novel level of regulation of the proneural *achaete/scute* genes of *Drosophila* // *Development*. 2005. V. 132. P. 1211–1222.
- Frise E., Knoblich J.A., Younger-Shepherd S. *et al.* The *Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 11925–11932.
- Garcia-Bellido A., Santamaria P. Developmental analysis of the *achaete-scute* system of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1978. V. 88. P. 469–486.
- Golembo M., Schweitzer R., Freeman M., Shilo B.Z. *argos* transcription is induced by the *Drosophila* EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop // *Development*. 1996. V. 122. P. 223–230.
- Gymez-Skarmeta J.L., Campuzano S., Modolell J. Half a century of neural prepatterning: the story of a few bristles and many genes // *Nat. Rev. Neurosci*. 2003. V. 4. P. 587–598.
- Hutterer A., Knoblich J.A. Numb and alpha-Adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs // *EMBO Rep*. 2005. V. 6. P. 836–842.
- Jafar-Nejad H., Norga K., Bellen H. Numb: «Adapting» notch for endocytosis // *Dev. Cell*. 2002. V. 3. P. 155–156.
- Jan Y.N., Jan L.Y. Asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system // *Nat. Rev. Neurosci*. 2001. V. 2. P. 772–779.
- Knoblich J.A., Jan L.Y., Jan Y.N. Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division // *Nature*. 1995. V. 377. P. 624–627.
- Lai E.C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate // *Development*. 2004. V. 131. P. 965–973.
- Le Borgne R., Remaud S., Hamel S., Schweisguth F. Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in *Drosophila* // *PLoS Biol*. 2005. V. 3. P. e96.
- Reeves N., Posakony J.W. Genetic programs activated by proneural proteins in the developing *Drosophila* PNS // *Dev. Cell*. 2005. V. 8. P. 413–425.
- Roark M., Sturtevant M.A., Emery J. *et al.* *Scratch*, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to snail, promotes neuronal development // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 2384–2398.
- Schweisguth F. Regulation of Notch signaling activity // *Curr. Biol*. 2004. V. 14. P. R129–138.
- Seto E.S., Bellen H.J., Lloyd T.E. When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways // *Genes Dev*. 2002. V. 16. P. 1314–1336.
- Smith J.E., Cronmiller C. The *Drosophila daughterless* gene autoregulates and is controlled by both positive and negative cis regulation // *Development*. 2001. V. 128. P. 4705–4714.
- Takahisa M., Togashi S., Suzuki T. *et al.* The *Drosophila tamou* gene, a component of the activating pathway of *extramacrochaetae* expression, encodes a protein homologous to mammalian cell-cell junction-associated protein ZO-1 // *Genes Dev*. 1996. V. 10. P. 1783–1795.
- Vaessin H., Brand M., Jan L.Y., Jan Y.N. *daughterless* is essential for neuronal precursor differentiation but not for initiation of neuronal precursor formation in *Drosophila* embryo // *Development*. 1994. V. 120. P. 935–945.
- Van Doren M., Bailey A.M., Esnayra J. *et al.* Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of *achaete* // *Genes Dev*. 1994. V. 8. P. 2729–2749.
- Wesley C.S., Saez L. Analysis of notch lacking the carboxyl terminus identified in *Drosophila* embryos // *J. Cell Biol*. 2000. V. 149. P. 683–696.

**GENETICAL CONTROL OF MECHANORECEPTORS FORMATION
IN *D. MELANOGASTER* – THE DESCRIPTION
IN DATABASE «NEUROGENESIS»**

T.A. Bukharina¹, D.P. Furman^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: bukharina@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Large bristles (macrochaetae) are orderly located on drosophila head and body and form the species-specific bristle pattern. A simple organization of each bristle organ, comprising only four specialized cells, makes macrochaetes a convenient model for studying the development patterns of spatial structures with a fixed number of elements and the mechanism of cell differentiation.

The experimental data on the main genes and their products that are involved in the control of three stages of bristle pattern formation were systematized in the work. Two gene networks «Neurogenesis(determination)» and «Neurogenesis(asymmetric division)» were reconstructed on the basis of generated data base. The crucial elements and mechanisms acting in these gene networks are discussed.