

Гены и Чебурашки — генетика возникновения новых форм

Ю. Гольцев



Юрий Гольцев
11-й выпуск биокласса
(Петрашевы), школа
№ 520 (1989 г.), закончил
Физтех (1995 г.), к.б.н.,
научный сотрудник
Калифорнийского универ-
ситета, Беркли,
goltsev@berkeley.edu

Наука и общество

В середине прошлого века, и скорее даже в первой его половине, коренным образом изменилась структура финансирования многих прикладных областей естествознания, связанных прежде всего с военной промышленностью. Огромные средства, вложенные в создание центров физических и химических исследований, неожиданно эффективно оправдали себя. Новые виды вооружений — авиация, отравляющие газы, ядерные бомбы — были незамедлительно применены на практике, что привело к территориальному переустройству мира, общественного сознания и науки в том числе. Многие базовые, традиционно маргинальные с денежной точки зрения области пережили и до сих пор переживают небывалый расцвет, поднявшись на волне всеобщей веры, что развитие фундаментальной науки может быстро оправдать себя, как это было с атомной бомбой, вакцинацией и т.д. Вот, в сущности, история открытия генетического кода, структуры ДНК и появления новых смежных областей науки, которые стали изучать исконные вопросы медицины, физиологии и систематики с молекулярной точки зрения. Биология развития и, в частности, эволюция развития были в числе наук, «пересмотренных» с молекулярной точки зрения: каким образом гены управляют эмбриогенезом? какова динамика аллелей/ДНК последовательностей в популяции? и, наконец, как, на уровне ДНК, возникают новые признаки?

Ответы на эти вопросы важны не только с общенаучной точки зрения. Устранение физического неравенства и боли, продление жизни и

борьба с болезнями — вот одни из спорных целей науки, по крайней мере, с общественной точки зрения. Наша цивилизация вплотную подошла к решению этих задач генетическим способом — исправлению плохих копий генов и внесению генетического материала, способствующего борьбе с болезнями. Один пример — повсеместно распространенные трансгенные растения, несущие гены инсектицидов и устойчивости к заболеваниям. Другой и совсем недавний — создание гипоаллергенной кошки посредством модификации генов, кодирующих аллергенную компоненту шерсти. Применение подобных технологий не всегда удачно. Один из вариантов невирусного иммунодефицита — неизлечимая болезнь SCID-X1 — связана с мутацией гена, ответственного за созревание определенного типа лимфоцитов. Лекарственная или спонтанная коррекция этого синдрома невозможна. Сравнительно недавно был успешно опробован генно-терапевтический способ. Клетки-предшественники, взятые у пациента, заражались ретровирусом, встраивающимся в ДНК и несущим правильную копию гена. Затем эти клетки реинъецировались больному и впоследствии наблюдалось восстановление нормального состава иммунной системы, а главное — дифференцированных лимфоцитов. В одном из многих случаев, когда иммунная система больного была восстановлена, он тем не менее умер от рака крови. Оказалось, что ретровирус встроился и разрушил антираковый ген. Каким образом вносить сбалансированные изменения в генотип? Почему природа может, а мы — нет? Как создавать новые признаки по своему желанию? В конце концов, почему мухи разносят болезни, а сами не болеют?

Генетика и семантика

Однако, есть аспекты более интересные, нежели затронутые в приведенной выше поверхностной аргументации. Вопрос семантического значения гена: есть ли определенная роль у конкретного гена? Насколько роль зависит от контекста? Подавляющее число современных биохимических исследований задаются

вопросом: какова роль/функция того или иного гена? Если биохимик говорит, что данный ген блокирует некую биохимическую реакцию, вызываемую раковым белком, то врач или физиолог идет и проверяет, насколько данный ген способен блокировать образование опухоли. Если же затем биохимик утверждает, что вообще-то данный белок активирует некий третий ген, который вызывает рак, то теперь врач, мало что понимающий в биохимии, рассматривает наш ген в качестве активатора рака. Таким образом, в зависимости от ролевого ярлыка, приклеенного на ген, его изучение будет двигаться в том или ином направлении. По мере усложнения организмов геномы пополняются новыми генами, несущими новые функции, в то же время старые гены, продолжая играть прежнюю роль, берут на себя новые обязанности, совмещая таким образом несколько функций. Понять, какова роль гена, как устроен ген и почему именно так, а не иначе, можно лишь рассмотрев развитие гена в историческом аспекте. Есть ли унифицированные законы эволюции генов? Можем ли мы использовать их в создании новых генов по собственному усмотрению?

Какие вопросы решает данная область науки

Итак, как уже замечено выше, эволюция развития изучает изменение генов по мере возникновения новых признаков. Где и как записано в ДНК, что у одного человека нос длиннее, а у другого короче; у двукрылых насекомых два крыла, а у бабочек — четыре? Если серьезно, то в целом в данной области можно выделить два направления.

Первое в качестве материала берет признаки (скорее, частные аспекты развития или даже отдельные гены), детально изученные с молекулярной и физиологической точек зрения. Наибольший интерес для данного направления представляет реконструкция во временной шкале изменений гена, приведших к возникновению новых признаков, а также установление факторов, благоприятствующих фиксации этих модификаций. Интересно, что одной из наиболее оптимальных моделей для данной области служит ситуация, когда признак не меняется вообще, а гены претерпевают взаимокомпенсирующие модификации (так называемая нейтральная селекция).

Второе направление в качестве начальных данных рассматривает достаточно хорошо изученное событие развития, по-разному выраженное в двух организмах. Детальное знание

генетики процесса в первом «исходном» организме облегчает идентификацию генетической составляющей, лежащей в основе различия по изучаемому признаку, наблюдаемому во втором организме. Таким образом, окончательной целью является а) идентификация генетических различий, приводящих к морфологической разнице; б) доказательство достаточности найденной генетической разницы для реконструкции, пусть даже частичной, элементов, присущих одному организму — в другом. В этой статье мы в основном будем рассматривать второй сценарий. Решение подобных задач лежит на пути к внесению в человеческий или иной организм новых «улучшающих» признаков по нашему усмотрению.

Для рассмотрения подобных задач:

1. Необходим модельный организм, и не один, а два или больше — для установления сравнительной системы.
2. Модельные организмы должны содержать легко отличимые признаки (собственно то, что мы будем изучать).
3. Механизм или, по крайней мере, физиология развития исследуемого признака в обоих организмах должны быть хорошо установлены (иначе прежде придется устанавливать материал для сравнения)
4. Геномная ДНК обоих организмов должна быть отсеквенирована, т.е. известна ее полная последовательность.
5. Организмы не должны отстоять слишком далеко друг от друга на эволюционном древе, наша задача — найти наименьший генетический комплемент, соответствующий возникновению нового признака или фенотипической разнице, поэтому нас интересуют организмы, максимально близкие друг к другу по ДНК, но в то же время анатомически разные.

Найти подобные два организма непросто. Во-первых, исторически, эмбриология стремилась выработать унифицированный язык, подходящий для описания развития в любом организме, и вследствие этого фенотипически разные эмбриогенез зачастую описывается одинаково для филогенетически близких животных. Во-вторых, лишь недавно появилась возможность секвенировать целые геномы и даже теперь количество «отсеквенированных» организмов ограничено.

Тем не менее на данный момент уже выработан определенный консенсус относительно типов молекулярно-эволюционных задач и типов сравнительных систем, подходящих для их решения. Так, например, для изучения нейтральной селекции и выделения консервативных, а следовательно, и функционально важных элементов

ДНК используется выборка родственных видов из насекомых семейства Drosophilidae. Раннее развитие мух данного семейства практически не содержит различий, по крайней мере — в рамках некоторых процессов, генетика которых хорошо изучена. Подобный же анализ применяется к «секвенированным» позвоночным животным (человек, крыса, мышь, рыбка-зебра). Он позволяет идентифицировать законсервированные элементы ДНК, не меняющиеся между этими организмами. Существует мнение, что подобная консервация — признак функциональной значимости ДНК-элементов.

В своей работе я использую сравнительный анализ развития зародышей плодовой мухи *Drosophila melanogaster* и малярийного комара *Anopheles gambiae*. Меня интересует следующий вопрос: каким образом изменение морфологии развития животных отражено в ДНК? Можно ли превратить одно животное в другое путем нескольких генетических модификаций? Каковы законы эволюции генетических сетей, ответственных за формообразование?

Филогенетический метод и реконструкция истории развития вида

Прежде всего введем несколько понятий, важных для чтения этой статьи. Эволюционный взгляд на биологическое формообразование предполагает постепенное возникновение жизни на Земле. Грубо говоря, исторически, каждый момент был представлен в природе определенным разнообразием видов, часть из которых вымирала, а часть служила предшественниками новых видов. Одной из проблем эволюционной биологии является то, что достоверно можно судить лишь о видовом многообразии, существующем на данный момент. Все, что касается прошлого, — область более или менее достоверных гипотез. Как же реконструировать историю возникновения нового вида (или, что то же самое, — нового признака или органа), не имея исторического материала? Используется филогенетический метод. Он состоит в том, что история возникновения вида реконструируется по присутствию в современной фауне признаков, присущих этому виду. Представим себе лежащие на столе пустую тетрадь, заполненную тетрадь, толстую книгу, глянецовый журнал, ежедневник и электронную записную книжку. Все эти предметы, изготовленные в наше время, служат для передачи информации, как правило, в форме слов. Большинство из них сделано из бумаги и вследствие этого имеет одинаковую структуру. Исходя из преобладания в нашей комнате книг над

электроникой, можно предположить, что электронная записная книжка — сравнительно недавнее изобретение. Остальные вещи различаются количеством страниц, но, тем не менее, состоят из них. Из этого можно сделать вывод, что когда-то предшественником этих изделий была книга всего из одной страницы, а переплет — позднейшее изобретение. Двигаясь в подобном ключе, можно также прийти к выводу, что еще более древним предшественником этих изделий является источник целлюлозы, т.е. древесина. В этой статье мы рассмотрим эмбриогенез комара и мухи и, в частности, развитие так называемых *экстраэмбриональных мембран*. У комара их две (амнион и сероза), а у мухи одна (амниосероза). Практически у всех насекомых, кроме небольшого подотряда двукрылых, две мембраны — как у комара. Это позволяет нам предположить, что предшественник современных мух имел две экстраэмбриональные мембраны, и комар является моделью этого предшественника.

Как работает ген?

Несмотря на то, что продукция белка составляет основной результат экспрессии гена, лишь малая его часть участвует в кодировании белка. Этот участок находится внутри зоны, покрытой непрерывной чередующейся последовательностью экзонов и интронов. Интроны удаляются из конечной «кодирующей РНК», а экзоны сшиваются вместе.

Значительная часть гена не транскрибируется в РНК, а содержит компактные зоны, содержащие участки (сайты) связывания транскрипционных факторов (обычно это белки). Эти зоны называются энхансерами. Чем лучше сайты в энхансере, тем сильнее связывание транскрипционного фактора, тем более чувствителен ген к низким концентрациям активаторов (транскрипционных факторов, усиливающих продукцию РНК) или репрессоров (белков, блокирующих продукцию РНК).

На рисунке 1 показан ранний эмбрион мухи, покрашенный специальным образом для детекции РНК гена *eve*. Вторая полоса *eve* детектирована отдельно с помощью синего красителя. Ниже приведена диаграмма гена *eve*, в которой начало транскрибируемой области *eve* показано стрелкой, а конец — нуклеотидной последовательностью конца последнего экзона. Регуляторные участки (энхансеры) обозначены подписанными четырехугольниками. Цифры внутри обозначают номера полос, регулируемых данным энхансером.

Под диаграммой гена размещена диаграмма регуляторного участка, управляющего экспрессией второй полосы. Ниже приведен небольшой фрагмент этого участка и показаны нуклеотиды, вовлеченные в связывание конкретных транскрипционных факторов.

Чем родственнее два организма, тем меньше отличий в последовательности ДНК конкретного гена в обоих геномах (копии одного гена в разных геномах называются ортологами — например, мышьяная ДНК-полимераза является ортологом человеческой). Исследования показали, что некодирующие участки ортологических генов содержат больше отличий, чем кодирующие. Необходимость «удерживать» последовательность белка от мутаций препятствует их накоплению в кодирующих областях. Таким образом, некодирующие участки гена (содержащие энхансеры и другие регуляторные элементы) значительно более пластичны с эволюционной точки зрения. На данный момент преобладает мнение, что формообразование и модификация признаков в первую очередь происходят за счет разницы в некодирующей ДНК. В этой статье рассмотрен подобный пример.

Эмбриогенез насекомых. Генетические сети

Яйца насекомых являются удобной эмбриологической моделью. Во-первых, в силу сравнительной легкости поддержания колонии насекомых и сбором яиц, во-вторых, в связи с относительно быстрыми темпами развития: у плодовых мух — 24 ч от оплодотворения ооцита до вылупления личинки.

Небольшие размеры допускают легкое изготовление срезов, а также зачастую позволяют уместить целый эмбрион в поле зрения микроскопа. Создание описательной базы по раннему развитию насекомых шло по мере развития методов микроскопии. С первой половины XX века применение физиологических методов (пережигания яиц, трансплантации цитоплазмы из разных частей ооцита, трансплантации фрагментов эмбриона) позволило установить наличие эмбриональных центров, производящих растворимые факторы, определяющие судьбу клеток в зоне их действия. Однако истинным прорывом стало применение технологии мутационного скрининга (выработанной на бактериях и дрожжах к 60–70 гг. XX века) к изучению генетики развития плодовых мух *Drosophila melanogaster*. К моменту проведения этих экспериментов было понятно, что гены являются фундаментальной единицей биохимических процессов, ответст-

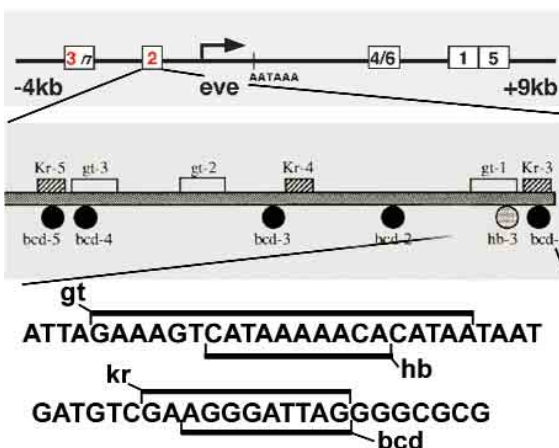


Рисунок 1. Экспрессия гена *eve* в раннем эмбрионе мухи (пояснения в тексте).

венной за отдельный признак в наиболее примитивных случаях. Однако считалось что глобальные признаки (определение эмбриональных осей развития: антеро-каудальной (между головой и хвостом) и дорсо-вентральной (т.е. спинно-брюшной); детерминация типа и числа сегментов; пространственная спецификация конечностей и т.д.) являются полигенными и едва ли будут расшифрованы в ближайшие десятилетия. К удивлению исследователей, в первых же скринингах были получены мутантные мухи, производящие эмбрионы, целиком вентрализованные, дорсализованные, потерявшие строго определенный сегмент или группу конечностей.

На рисунке 2 в верхней панели показаны некоторые последовательные стадии эмбриогенеза плодовой мухи. На всех иллюстрациях в этой статье эмбрионы показаны так, что головной отдел находится слева, а хвостовой — справа. Фотографии сделаны с помощью сканирующей электронной микроскопии. На нижней панели — эмбрион мухи, мутантной по гену *bcd*. Заметно, что головной отдел (слева) копирует морфологию хвостового отдела.

Таким образом, были идентифицированы несколько иерархических групп взаимосвязанных генов, ответственных за раннюю пространственную разбивку эмбриона. По большей части эти гены кодируют транскрипционные факторы. Внутри группы гены нижнего уровня являются мишенью для активации или ингибирования

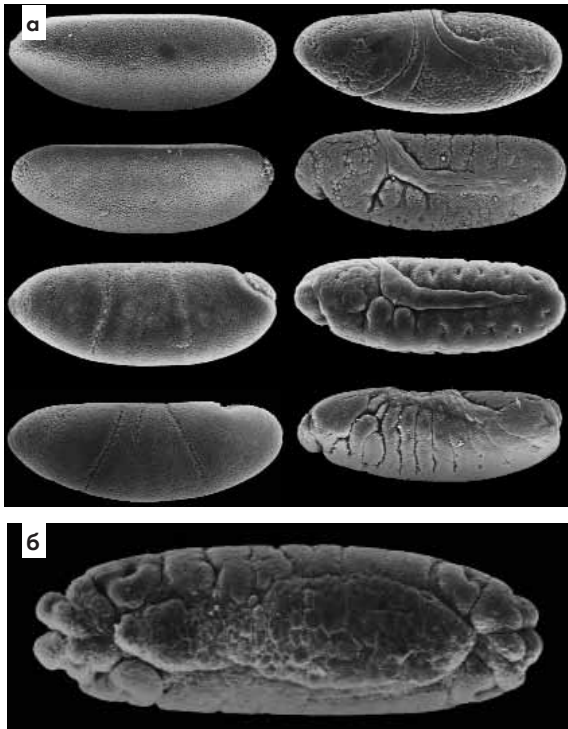


Рисунок 2. (а) — стадии эмбриогенеза мухи (дикий тип); (б) — эмбрион мухи, мутантный по гену *bcd*.

генами, стоящими выше по иерархии. Такая структура групп напоминает компьютерную или нейронную сеть, и далее мы будем называть ее генной сетью. В этой статье я расскажу о вариациях между видами и эволюции двух таких сетей: дорсо-вентральной и антеро-каудальной.

Рассмотрим вкратце генную сеть, управляющую антеро-каудальной разбивкой (рисунок 3). В случае фруктовой мухи исходными элементами этой сети являются гены *bcd* и *nos*. РНК этих генов размещается материнским организмом соответственно в головном и хвостовом отделе яйца. РНК другого важного гена *cad* равномерно распределена по яйцу. Белковый продукт, синтезирующийся с РНК гена *bcd* (транскрипционный фактор BCD), распределен в виде градиента от головы к хвосту по раннему эмбриону. BCD обладает свойством достаточно необычным для транскрипционного фактора — он способен ингибировать трансляцию белка CAD с РНК гена *cad*. Таким образом создается противоположный BCD градиент CAD, исходящий из хвостового отдела яйца. BCD активирует в головном отделе эмбриона экспрессию гена *hb*, которая убывает по мере истощения количества BCD в градиенте. Кроме того, BCD активирует в головном отделе эмбриона экспрессию гена *gt*, которая убывает быстрее, чем *hb*, потому что регуляторная ДНК *gt* менее чувствительна к низким концентрациям *bcd*, чем энхансер *hb* (рисунок 4, заимствовано у

Д. Папаценко — выпуск 1984 г., Терапсиды). В заднем отделе эмбриона *hb* активируется градиентом CAD. *Gt* тоже экспрессируется в хвостовом (каудальном) отделе, причем его зона экспрессии находится впереди зоны *hb*. Механизмы репрессии *hb* и *gt* в полярных отсеках переднего и заднего отделов эмбриона известны, но не будут обсуждаться в этой статье. Ген *Kr* активируется BCD и одновременно ингибируется HB (см. рисунок 4). Регуляторные последовательности (enhancer — энхансер) этого гена более чувствительны к низким концентрациям BCD, нежели энхансер *hb*, поэтому область его экспрессии простирается далее области, занятой HB. Вследствие ингибирования в головном отделе создается характерная колоколообразная зона экспрессии гена *Kr*. Аналогичные механизмы с CAD активатором вместо BCD вовлечены в образование колоколообразного домена экспрессии гена *kni*. Гены *hb*, *Kr*, *kni* в совокупности называются GAP-генами (*gap* — в переводе — пробел). Гены называются так потому, что в случае мутации личинка мухи теряет сегменты, расположенные в зоне нормальной экспрессии GAP-гена.

Сегментация эмбриона является кульминационной ступенью в раннем развитии насекомых. Более того, несмотря на большие различия в предшествующих и последующих стадиях, она наблюдается у всех членистоногих (Arthropoda) и у кольчатых червей (Annelida). Подобные стадии развития называются филотипическими. На

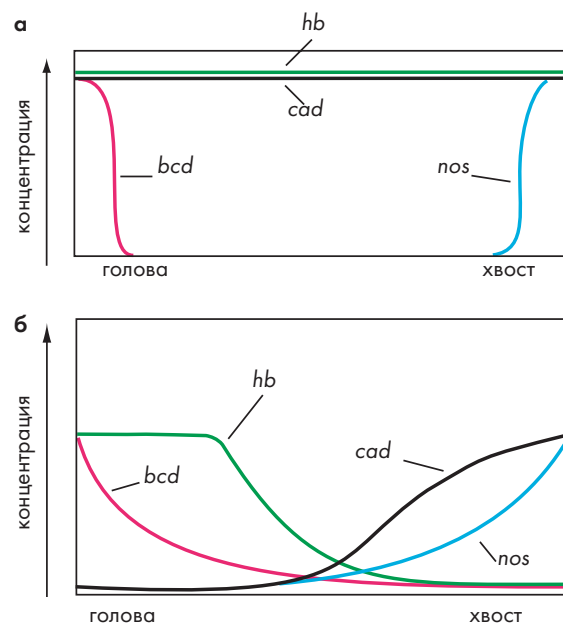


Рисунок 3. Генная сеть, управляющая антеро-каудальной разбивкой.

(а) — распределение РНК генов *hb*, *cad*, *bcd* и *nos* в ооците; (б) — распределение соответствующих белков в раннем эмбрионе.

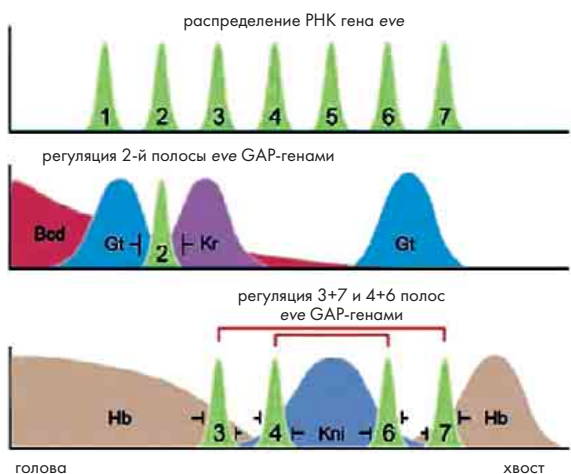


Рисунок 4. Регуляция гена *eve* GAP-генами (пояснения в тексте).

генетическом уровне повторяющиеся сегменты возникают вследствие повторной экспрессии определенных генов вдоль антеро-каудальной оси эмбриона. Примером может служить начальная экспрессия мушиного гена *eve* в каждом четном сегменте зародыша.

Экспрессия генов сегментации, таких как *eve*, непосредственно регулируется GAP-генами. Более того, фактически каждой полоске экспрессии соответствует свой регуляторный элемент, независимо позиционирующий этот домен в эмбрионе. Рассмотрим механизм установления семи полосок экспрессии гена *eve*. Как правило, узкие окончателные зоны экспрессии гена «вырезаются» репрессорами из более широких доменов действия активаторов. Итак (см. рисунок 4), вторая полоска — активатор *bcd*, репрессоры *Kr* и *Gt*; третья и седьмая полоски — активатор неизвестен (по всей видимости, он равномерно распределен по всему эмбриону), репрессоры *hb* и *kni*; четвертая и шестая полоски — активатор неизвестен (по всей видимости равномерно распределен по всему эмбриону), репрессоры тоже *hb* и *kni*.

Похожие и разные стадии в развитии плодовых мух и малярийного комара

На первый взгляд личинки комара и мухи сильно различаются (рисунок 5). Это неудивительно: на стадии личинки комар — водное насекомое, в связи с этим ему необходимы специальные органы дыхания. Кроме того, личинка комара обладает специальным челюстным аппаратом. Личинка плодовой мухи обитает в гниющих фруктах. Ее строение (короткие щетинки на кутикулярной оболочке) оптимально

для облегчения ввинчивания в мякоть плодов. Однако с эмбриологической точки зрения зародыши обоих насекомых практически неразличимы — они содержат одинаковый набор органов и проходят через идентичные ступени развития.

Рассмотрим первые, самые ранние, стадии эмбриогенеза. Вначале оплодотворенное яйцо представляет собой одну гигантскую клетку, заполненную питательным желтком. Первые 14 ядерных делений происходят без дробления ооцита. Ядра выстраиваются по периферии клетки, образуя так называемый ядерный бластомер. После 14-го деления клеточные мембраны стремительно прорастают между ядрами, разделяя их на индивидуальные клетки. Эта стадия называется *клеточный бластомер* (рисунок 6, панель 1). Особенность эмбриогенеза насекомых отряда двукрылых (Diptera) состоит в том, что на стадии клеточного бластомера практически завершена клеточная спецификация и территориально представлены фактически все будущие органы личинки. Иначе говоря, можно предсказать, предшественником или частью какого будущего органа является та или иная клетка. Следующая стадия характеризуется морфологическим обособлением так называемой эмбриональной пластинки. Клеточная бластомер сдвигается в вентральном (брюшном) направлении, таким образом вентральные клетки (предшественники мезодермы, образующей внутренние органы) приобретают колоннообразную форму (вытянутую по вертикальной оси), а дорсальные клетки уплощаются (рисунок 6, панель 2). Интересно, что дорсальные (спинные) клетки и их потомки не будут представлены в личинке. Дорсальные клетки образуют так называемые экстраэмбриональные мембраны, клетки которых отмирают на завершающих стадиях эмбриогенеза. Напротив латерально-вентральные (боковые и брюшные) клетки являются предшественниками всех органов личинки.

Таким образом, континуум клеток-предшественников личинки не замкнут с дорсальной стороны, что и позволяет говорить о так называемой эмбриональной пластинке.

На следующей стадии начинается рост-вытяжение эмбриональной пластинки (рисунок 6, панели 2, 3, 4). До сих пор развитие эмбрионов



Рисунок 5. Личинки мухи и комара выглядят по-разному.

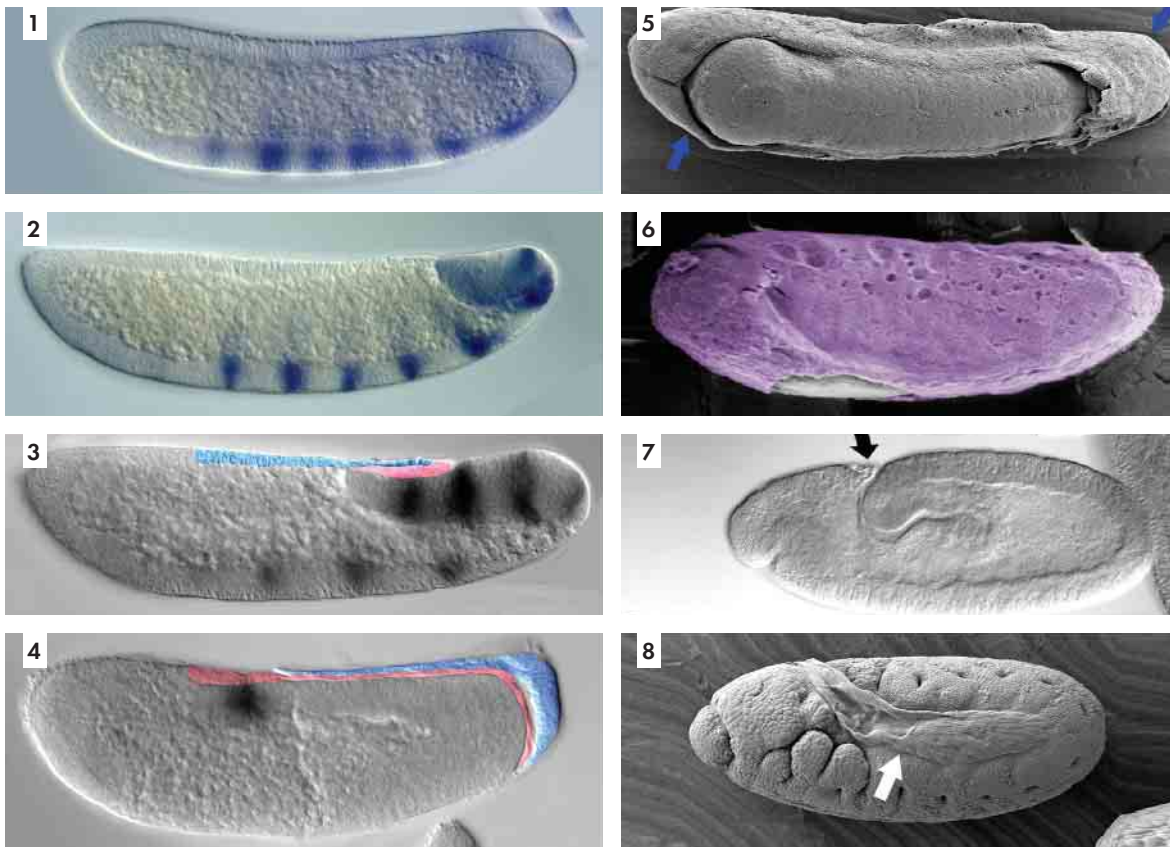


Рисунок 6. Движение эмбриональной пластинки и образование экстраэмбриональных мембран в зародышах мухи и комара (пояснения в тексте).

комара и мухи происходило одинаково, но на этой стадии наиболее наглядно проявится разница. В случае мушиного зародыша эмбриональная пластинка растет, огибая задний полюс яйца. По мере роста она сминает дорсальные клетки (рисунок 6, панель 7, стрелкой показаны сдавленные клетки экстраэмбриональной мембраны, амниосерозы; панель 8 — сканирующая электронная микроскопия той же стадии). В случае комара эмбриональная пластинка не сминает дорсальные клетки, но, напротив, проползает под ними (рисунок 6, панели 2, 3, 4, на панелях 3 и 4 экстраэмбриональные мембраны обозначены голубым — сероза и розовым — амнион). Таким образом, создается зачаток трехслойной структуры. Нижний слой — эмбриональная пластинка, промежуточный слой экстраэмбриональных клеток, который называется амнионом, и внешний (верхний) — сероза. Амнион начинает мигрировать по поверхности эмбриональной пластинки и растягивает вокруг нее серозу (рисунок 6, панели 5 и 6 — две последовательные стадии инкапсуляции эмбриона серозой; на панели 6 сероза обозначена розовым; миграция амниона в головном отделе не видна на панели 4 в силу проблемной фиксации). В итоге эмбрион кома-

ра, как и практически всех остальных насекомых, кроме «высших двукрылых», оказывается внутри серозного мешка. Такая структура очень важна для развития насекомых, особенно тех, чьи яйца должны переживать период засухи (яйца многих видов комаров устойчивы к высыханию). Дополнительная хитинсодержащая оболочка, секретируемая серозой, предохраняет эмбрион от высыхания. Мушинные эмбрионы не используют этот механизм.

Различия генетических сетей управляющих антеро-каудальной разметкой

Таким образом, с анатомической точки зрения развитие мушиного и комариного эмбриона по антеро-каудальной оси происходит одинаково, однако в процессах происходящих вдоль дорсо-вентральной оси наблюдается существенная разница. Есть ли отличия в структуре генетических сетей, управляющих пространственной разбивкой эмбриона по этим осям? Для ответа на этот вопрос мы решили исследовать экспрессию генов, ответственных за эмбриогенез, в зародышах мухи и комара. Для локализации экспрес-

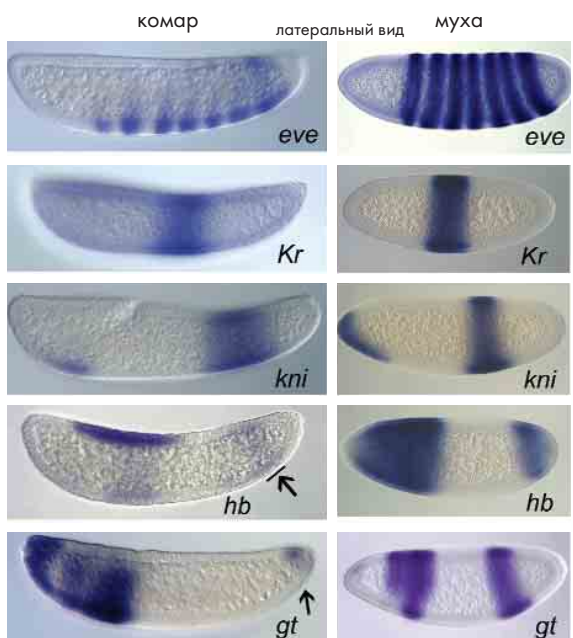


Рисунок 7. Экспрессия генов антеро-каудальной разметки в эмбрионах мухи и комара (пояснения в тексте).

сии использовали химически меченые анти-комплементарные пробы к РНК интересующих нас генов. Ген регулятор сегментации *eve* выглядит одинаково в мушином и комарином зародыше, что соответствует филогенетичности этой стадии у насекомых и членистоногих в целом (рисунок 7). GAP-гены *Kr* и *kni*, регулирующие независимую экспрессию разных полосок *eve*, тоже занимают сравнительно похожие домены. Расположение головных доменов *hb* и *gt* также одинаково. Однако в то время, как у мухи задняя полоска *hb* расположена позади каудального домена *gt*, у комара все наоборот: каудальный домен *gt* расположен позади каудального домена *hb*. Эта, казалось бы, незначительная разница имела бы катастрофические последствия для развития комара, если бы регуляция экспрессии *eve* осуществлялась так же, как у мухи. Дело в том, что шестая и седьмая полоски *eve* у мухи расположены между зонами экспрессии репрессоров *kni* и *hb* (рисунок 8). У комара задние полоски *kni* и *hb* (генов, ингибирующих экспрессию *eve*) оказываются столь близко друг к другу, что поместить даже одну полоску между ними невозможно. По всей видимости, экспрессия шестой и седьмой полоски *eve* у комара регулируется комбинацией *kni* и *gt*. Как уже было замечено выше, у мухи третья и седьмая полоски регулируются одновременно одним энхансером. Аналогично, четвертая и шестая полоски тоже регулируются совместно одним регуляторным элементом. Судя по одинаковому расположению доменов

экспрессии GAP-генов в передней части зародыша, регуляция третьей и четвертой полоски *eve* у мухи и комара не различается. Однако механизмы установления шестой и седьмой полосок различны. Следовательно, у комара есть дополнительные независимые регуляторные элементы (энхансеры), регулирующие шестую и седьмую полоски. То есть у комара в два раза больше энхансеров *eve*, чем у мухи. Плодовая муха — значительно более динамичный организм, чем комар. Мухи откладывают больше яиц и развиваются значительно быстрее. Очевидно, что редукция и оптимизация регуляторных элементов у мухи суть проявления более динамичного жизненного цикла. В данном случае различия в архитектуре генетической сети регуляции гена *eve* не приводят к изменению картины распределения продукта гена в эмбрионе. То есть осуществляется компенсаторная, нейтральная селекция гена, не приводящая к изменениям в морфологии филогенетической стадии. Вопрос — можно ли предсказать альтернативные формы генетических сетей, исходя из знания одного из вариантов? Как происходит компенсаторная эволюция в историческом плане?

Различия генетических сетей управляющих дорсо-вентральной разметкой

Противоположный сценарий реализуется вдоль дорсо-вентральной оси. Основой данного элемента разбивки является внутриядерный градиент транскрипционного фактора DL, который в зависимости от контекста может быть как активатором, так и репрессором (рисунок 9, DL обозначен красным цветом). DL (не путать с белком Delta) активирует серию генов вдоль дорсо-вентральной оси. Чем более чувствителен энхансер гена к белку DL, тем выше расположена зона его экспрессии. Другим кардинальным элементом данной генетической сети является

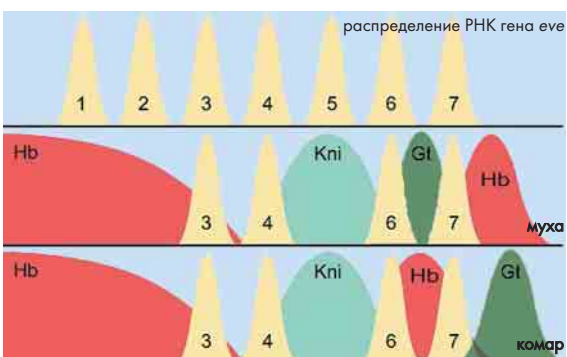


Рисунок 8. Регуляция гена *eve* в эмбриогенезе мухи и комара.

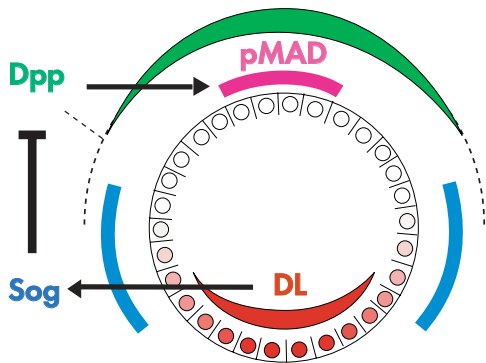


Рисунок 9. Экспрессия генов дорсо-вентральной разметки в эмбрионе мухи (пояснения в тексте).

ген *dpp*. Он кодирует внеклеточный белок, экспрессия которого ингибируется DL (рисунок 9, DPP обозначен зеленым цветом). DPP диффундирует в вентральном направлении и включает в клетках транскрипционный фактор MAD (pMAD — в активной форме), который активирует гены в дорсальной части зародыша. Мушиный *sog* — один из наиболее чувствительных к DL генов (его энхансер содержит очень сильные сайты связывания DL). Зона экспрессии *sog* расположена в латеральной части эмбриона мухи. В вентральных клетках мушиного эмбриона экспрессия *sog* ингибируется DL-зависимым репрессором *sna* (не показан на рисунке). В то время как DPP присутствует во всей дорсо-латеральной зоне эмбриона, DPP-зависимый транскрипционный фактор MAD включается лишь вдоль узкой полоски наиболее дорсальных клеток-предшественников экстраэмбриональных мембран. Ограничение действия DPP вдоль дорсо-вентральной оси происходит за счет того, что белок Sog связывается с ним и блокирует его действие. Таким образом, умозрительно можно предсказать, что чем выше зона экспрессии *sog*, тем уже полоска pMAD (зона действия *dpp*). Так почему же у комара — две экстраэмбриональные мембраны, а у мухи — одна редуцированная? Ответ на этот вопрос дает анализ экспрессии генов на стадии бластодермы.

И у комара, и у мухи часть дорсальных генов, таких как *zen* и *hnt*, одинаково экспрессируются в дорсальном эпителии (рисунок 10, зона предшественников серозы комара обведена красным). Однако другие гены, такие как *tup* и *doc*, образуют петлеобразный рисунок (репрессия в наиболее дорсальном эпителии — предшественнике серозы), отличный от мушиного (рисунок 10). Более того, гены *hb* (рисунок 7) и *emc* (рисунок 10), традиционно детектируемые в головном отделе эмбриона мухи, экспрессиру-

ются в дорсальном эпителии комара как раз там, где наблюдается репрессия *tup* и *doc* (см. рисунок 10). Наконец, самым значительным отличием является то, что у комара *sog* экспрессируется в вентральных клетках эмбриона, а не в латеральной зоне, как у мухи (рисунок 11a). Сдвиг зоны экспрессии *sog*, как уже сказано ранее, должен вызывать расширение зоны активности *dpp*. Это подтверждается специальной покраской, детектирующей активную форму MAD (рисунок 10). Таким образом, зона спецификации экстраэмбриональных мембран у комара значительно шире, чем у мухи. Шире настолько, что в этой зоне уместаются два типа клеток вместо одного. Расхождение клеточных типов дорсальной области эмбриона комара на предшественников амниона и серозы, по всей видимости, происходит за счет привлечения репрессорной активности *hb* (рисунок 7) или *emc* (рисунок 10).

Почему у комара происходит смещение активности гена *sog* к брюшной стороне? Путем компьютерного анализа мы изолировали участок *sog* комара, ответственный за экспрессию гена в вентральной области. Трансгенные мухи, несущие репортерный (т.е. маркерный) ген *LacZ* под контролем комариного энхансера *sog*, экспрессируют этот ген в вентральной области эмбриона мухи (рисунок 11b). Оказывается, сайты связывания *dl* в комарином энхансере значительно хуже, чем в мушином. Кроме того, комариный энхансер, в отличие от мушиного, не содержит сайтов связывания репрессора *sna*, — что позволяет ему работать в вентральной области. Суммируем (рисунок 12), как происходит

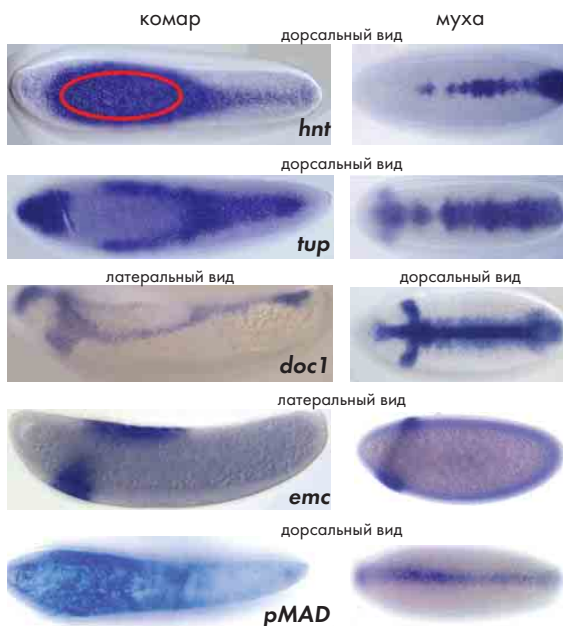


Рисунок 10. Экспрессия генов дорсо-вентральной разметки в эмбрионах мухи и комара. Пояснения в тексте.

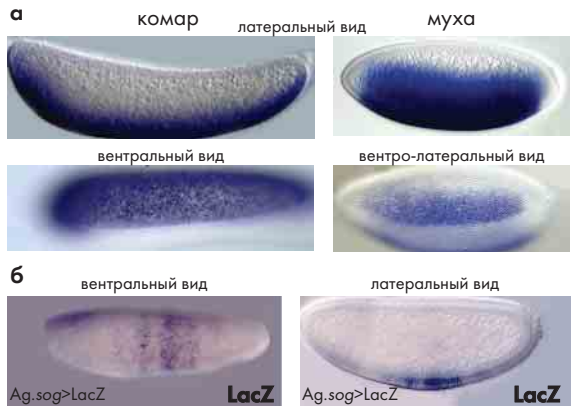
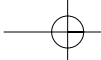


Рисунок 11. (а) — Экспрессия гена *sog* в эмбрионах мухи и комара. (б) — Экспрессия гена репортера под контролем комариного энхансера гена *sog* в эмбрионах трансгенной мухи.

редукция двух типов ткани у комара к одному у мухи. По нашим данным, этот процесс — двухкомпонентный если не в историческом, то по крайней мере в механистическом аспекте. Во-первых, наблюдается эволюция энхансера *sog* у мухи — дрозофилиные сайты связывания *dl* лучше комариных, и вследствие этого уровень экспрессии *sog* у мухи «выше» комариного. При увеличении зоны экспрессии *sog* уменьшается зона активности *dpp*, который определяет участок эмбриона, дифференцирующийся в экстраэмбриональную ткань. Зона *dpp* активности у мухи слишком мала для дифференциации двух типов тканей (как у комара). По-видимому, вследствие потери дорсальной экспрессии *hb* и *etc* происходит слияние двух типов клеток (как у комара) в один (у мухи). Таким образом, мы проследили эволюцию новой ткани от морфологии до генетики.

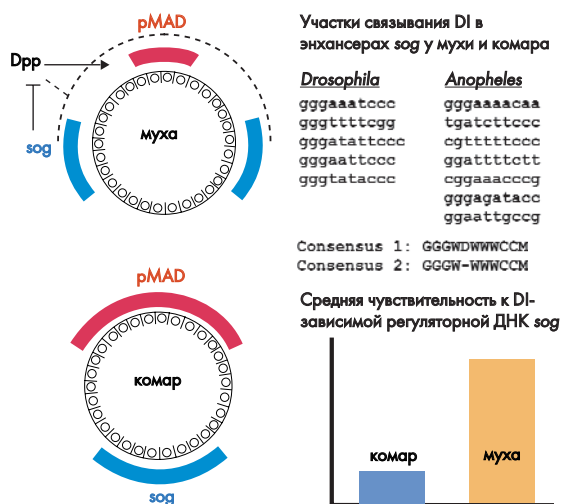


Рисунок 12. Как происходит редукция двух типов ткани у комара к одному у мухи.

Куда же нам плыть?

Что существует вначале — вопросы, на которые хочется ответить, или же материал для исследований? Трудно представить себе первобытного человека, вышедшего из пещеры, взглянувшего на небо и немедленно задавшегося целью построить звездолет, да не простой, а чтоб непременно летал быстрее света. Хотя бы по той причине, что во многих культурах звезды считались светильниками, закрепленными на голубой сфере, не говоря уже о представлении о природе света. Таким образом, научный материал сам по мере изучения предоставляет ученому вопросы, и в этом плане роль науки весьма пассивна.

Тем не менее... Можно ли, сдвинув вентральную мушиную *sog*, воссоздать двухслойную структуру экстраэмбриональных мембран в мухе? Как работает энхансер *sog* у других насекомых? Можно ли, применив филогенетический метод, восстановить историю развития этого генетического элемента? Исходя из восстановленной истории, можно ли составить некоторое представление об экологических силах, вызвавших эти генетические изменения?

Эти и многие другие вопросы... скорее всего отпадут в ходе исследований за ненадобностью, поскольку они — всего лишь светильники на небосводе. Содержание этих вопросов вызвано не научным материалом, а лишь нашим представлением о нем. Так что будем двигаться дальше и посмотрим, какой сюрприз преподнесет нам природа, которую мы изучаем.

Список дополнительных и вспомогательных материалов

FlyMove — очень увлекательный сайт, где можно посмотреть ускоренное кино различных стадий развития мухи. <http://flymove.uni-muenster.de/Homepage.html>

The Interactive Fly — более серьезный, образовательный сайт с описательным разделом по каждому изученному гену. <http://www.sdbonline.org/fly/aimain/1aahome.htm>

Ensemble — интерактивная база данных, где хранятся отсеквенированные геномы. Можно без усилий добраться до нуклеотидной последовательности любого интересующего вас участка ДНК. http://www.ensembl.org/Drosophila_melanogaster/index.html

BDGP in situ — база данных, хранящая фотографии паттернов экспрессии генов мухи во время эмбриогенеза. Для примера введите *bcd* и нажмите Enter. <http://www.fruit-fly.org/cgi-bin/ex/in situ.pl>

FlyBase — научная база данных, содержащая информацию по существующим линиям мух. <http://flybase.org/>

PubMed — база данных по научной литературе. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

