

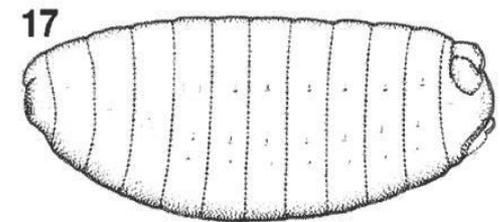
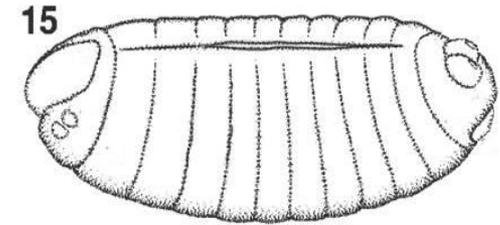
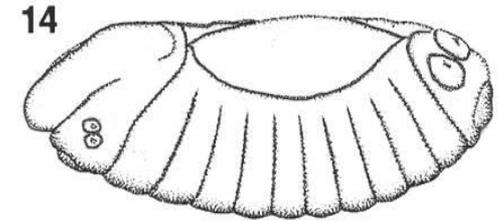
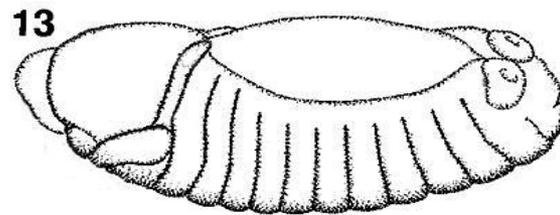
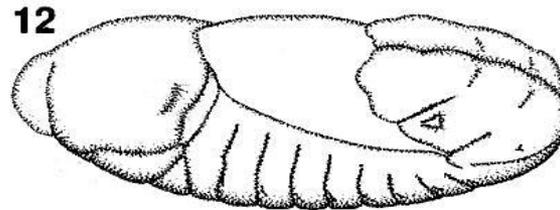
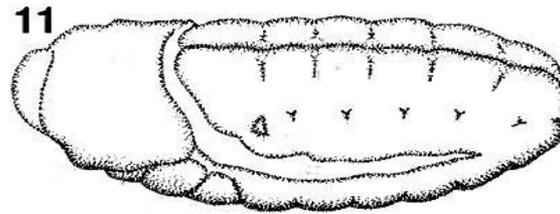
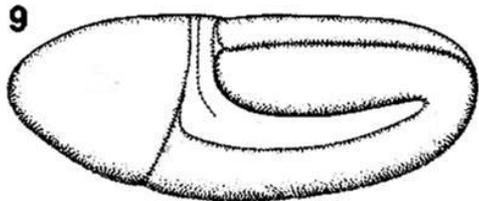
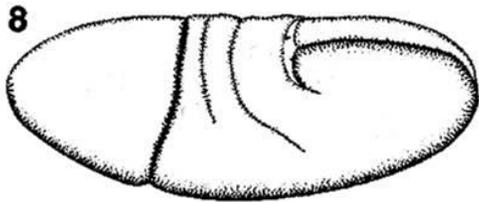
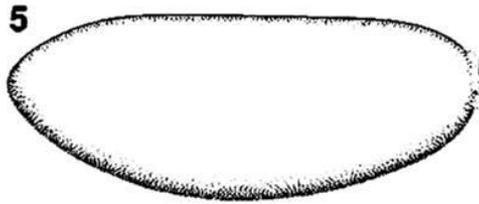
Гены сегментации

- Детерминация D/V оси эмбриона у дрозофилы
- Генетический контроль сегментации вдоль A/P оси у дрозофилы:



1. gap-гены, 2. гены pair-rule, 3. гены segment polarity

Стадии эмбриогенеза *Drosophila melanogaster*



клеточной бластодермы

- Формирование вентральной борозды

- Удлинение зародышевой полоски сопровождаемое образованием амниосерозы

- Сегментация и укорочение длинной оси эмбриона («сокращение зародышевой полоски»)

- Завершение спинного закрытия

- Амниосероза инвагинирует и дегенерирует

Дорсовентральная система – контроль концентрации ядерного морфогена

- Продукт гена *Dorsal* является морфогеном, который способствует установлению различий между вентральной и дорсальной сторонами эмбриона.
- мРНК *Dorsal* поступает в ооцит из трофоцитов, но транслироваться начинает спустя 90 мин после оплодотворения и по всему эмбриону.

Почему *Dorsal* является морфогеном?

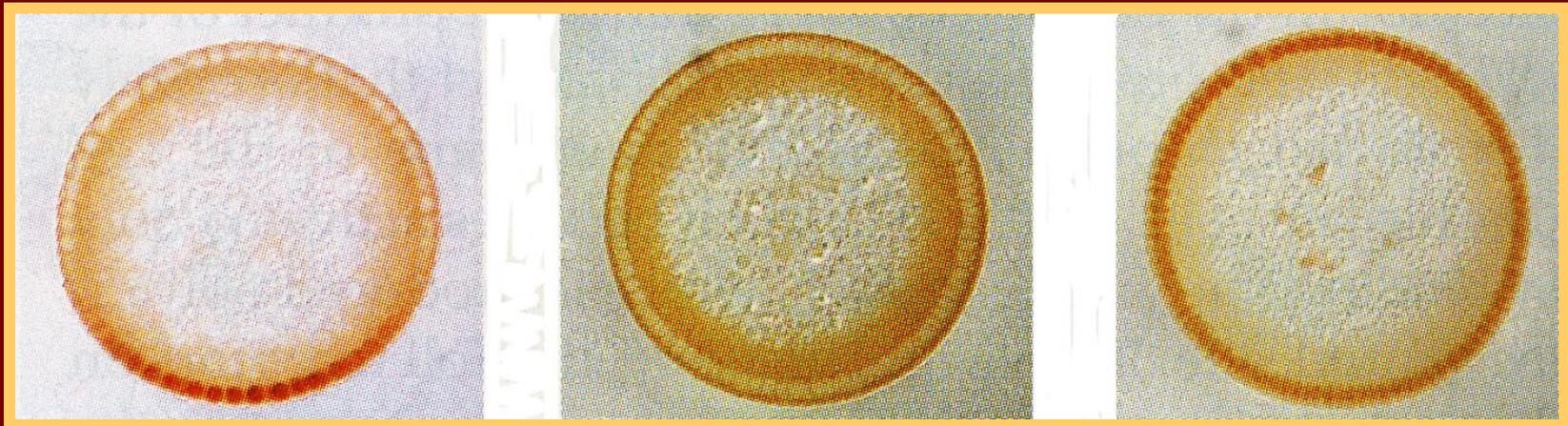
Эмбрион дикого типа



Дорзализованный мутант

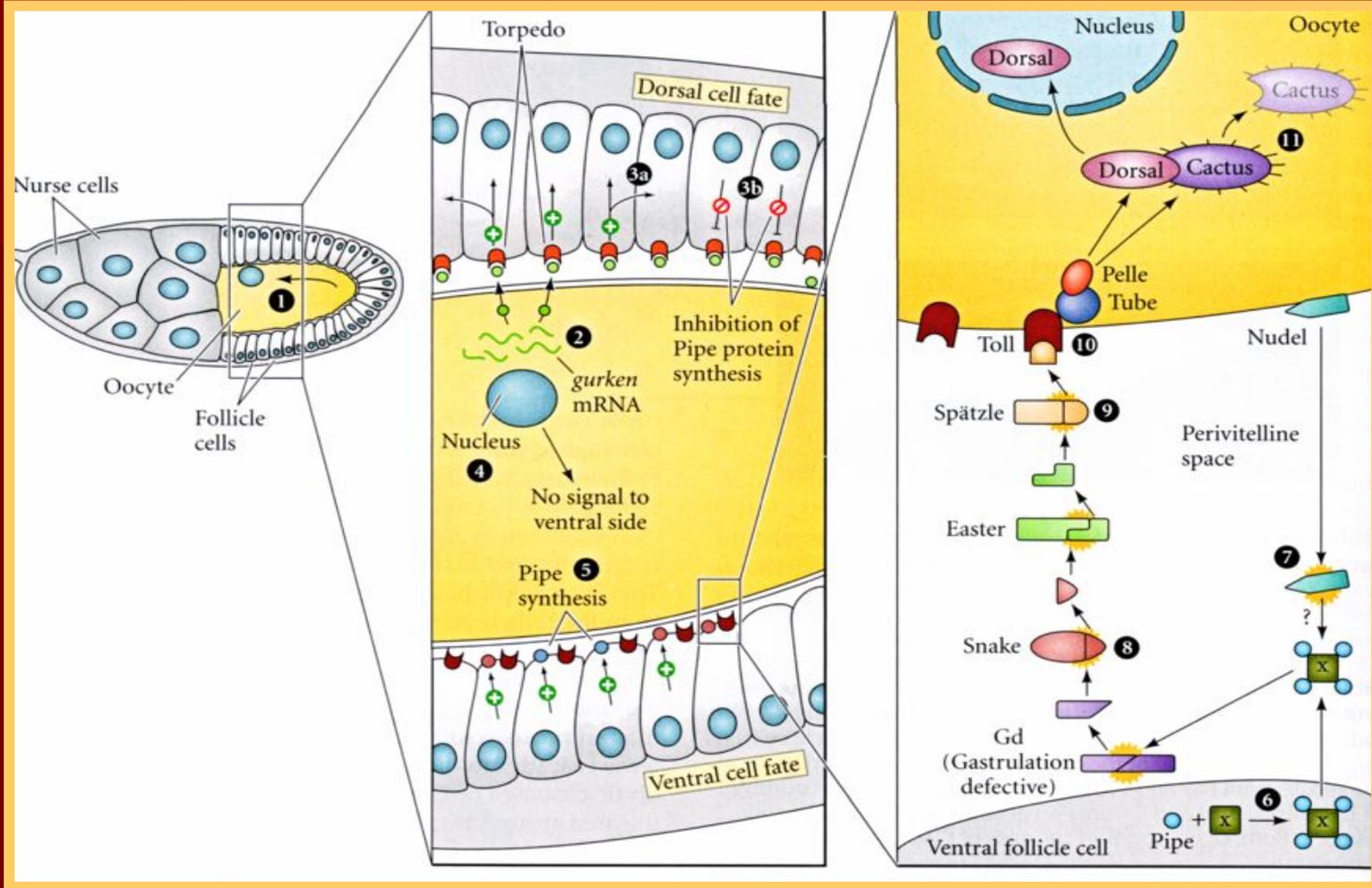


Вентрализованный мутант



Препараты кутикулы и поперечные срезы эмбрионов, окрашенных антителами к белку **Dorsal**

Формирование дорсо-вентральной полярности в ооците *Drosophila*



1 – перемещение ядра ооцита в передний дорсальный отдел, вместе с мРНК *gurken*.

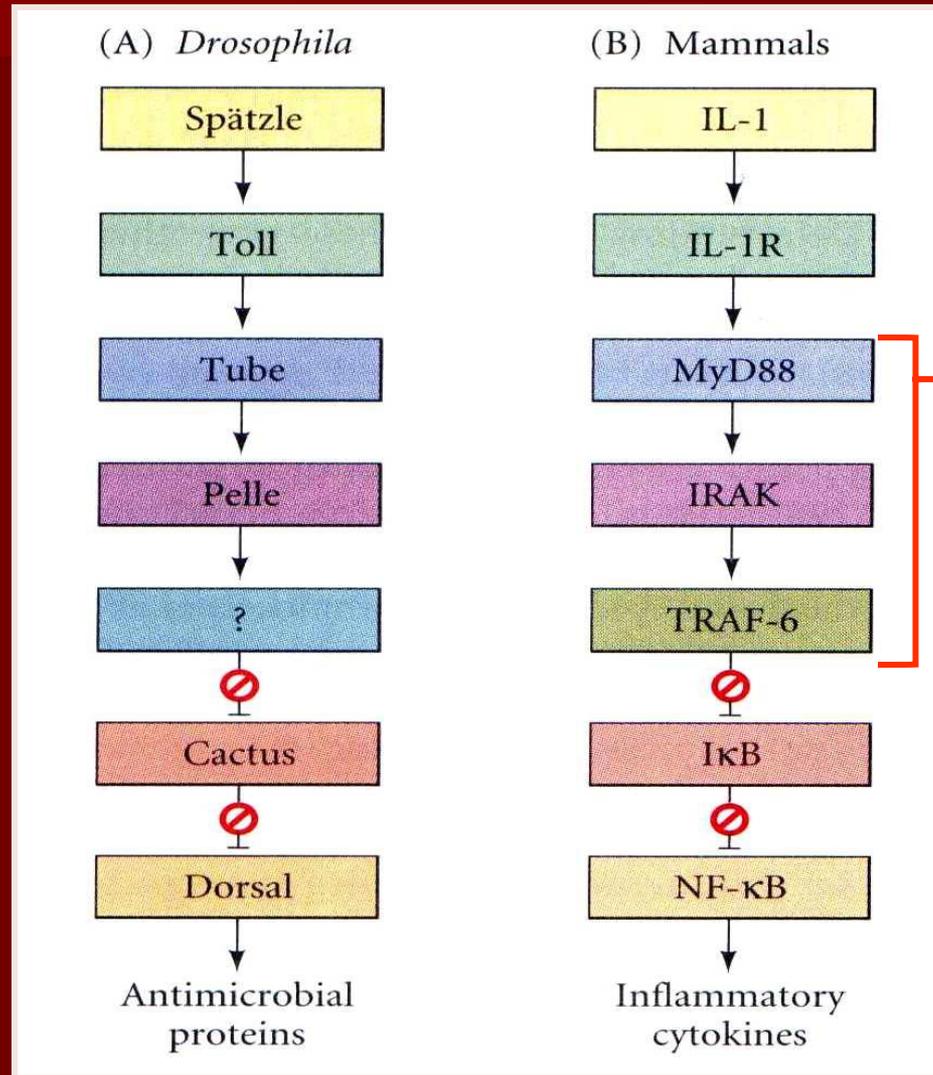
2 – трансляция мРНК *gurken* и связывание *Gurken* с рецептором *Torpedo*.

3a – сигнал *Torpedo* дифференцирует фк в дорсальном направлении, синтез белка *Pipe* ингибируется – 3b.

4 – белок *Gurken* не диффундирует в вентральную область, поэтому *Pipe* синтезируется только в вентральных фк – 5.

6 – в вентральных фк *Pipe* завершает модификацию неизвестного фактора X.
 7 – *Nudel* и фактор X, взаимодействуя, расщепляют белок *Gd* (*Gastrulation defective*) - протеолитический каскад.
 8 – активированный *Gd* расщепляет белок *Snake*, а активированный *Snake* расщепляет белок *Easter*.
 9 – активированный *Easter* расщепляет *Spätzle*, после чего *Spätzle* связывается с рецептором *Toll*.
 10 – Уже в эмбрионе активированный *Toll* активирует белки *Tube* и *Pelle*, которые фосфорилируют белок *Cactus*.
Cactus деградирует с высвобождением белка *Dorsal*.
 11 – В эмбрионе белок *Dorsal* поступает в ядро и вызывает вентрализацию.

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 действия у взрослых мух.



Интерлейкин 1

Рецептор интерлейкина 1

Миелоидный дифференцированный фактор 88

Адапторные Молекулы

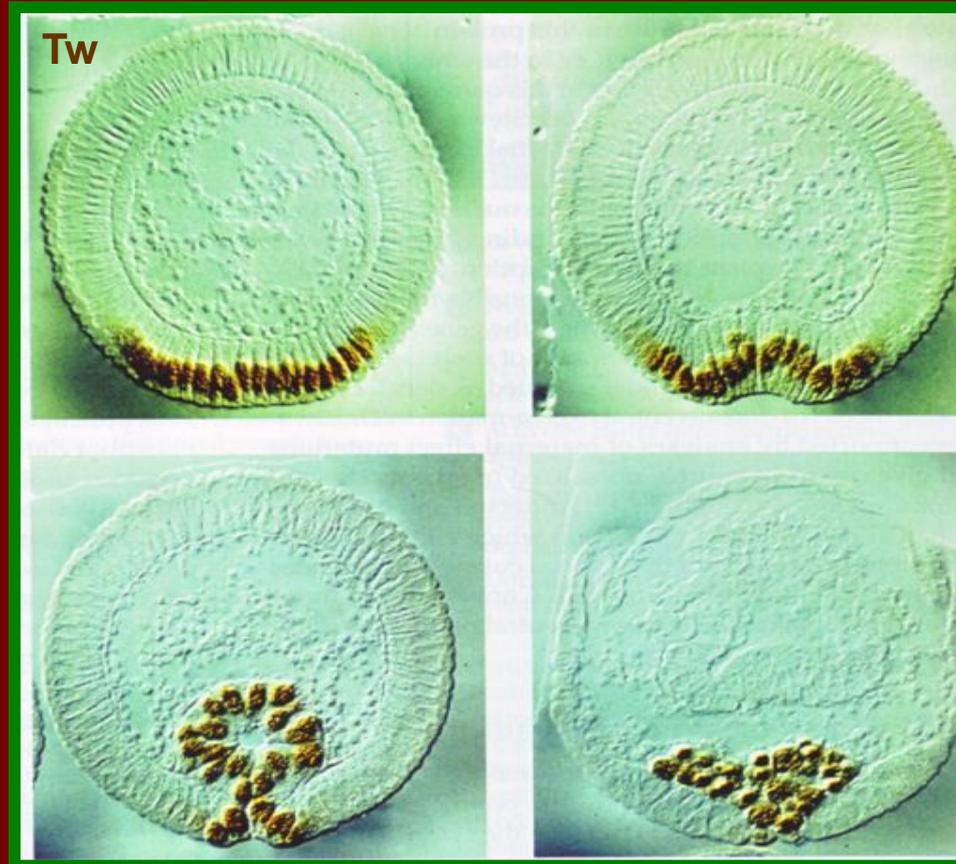
Ингибитор κB

Ядерный фактор транскрипции κB

Первое морфогенетическое событие гаструляции – образование мезодермы.

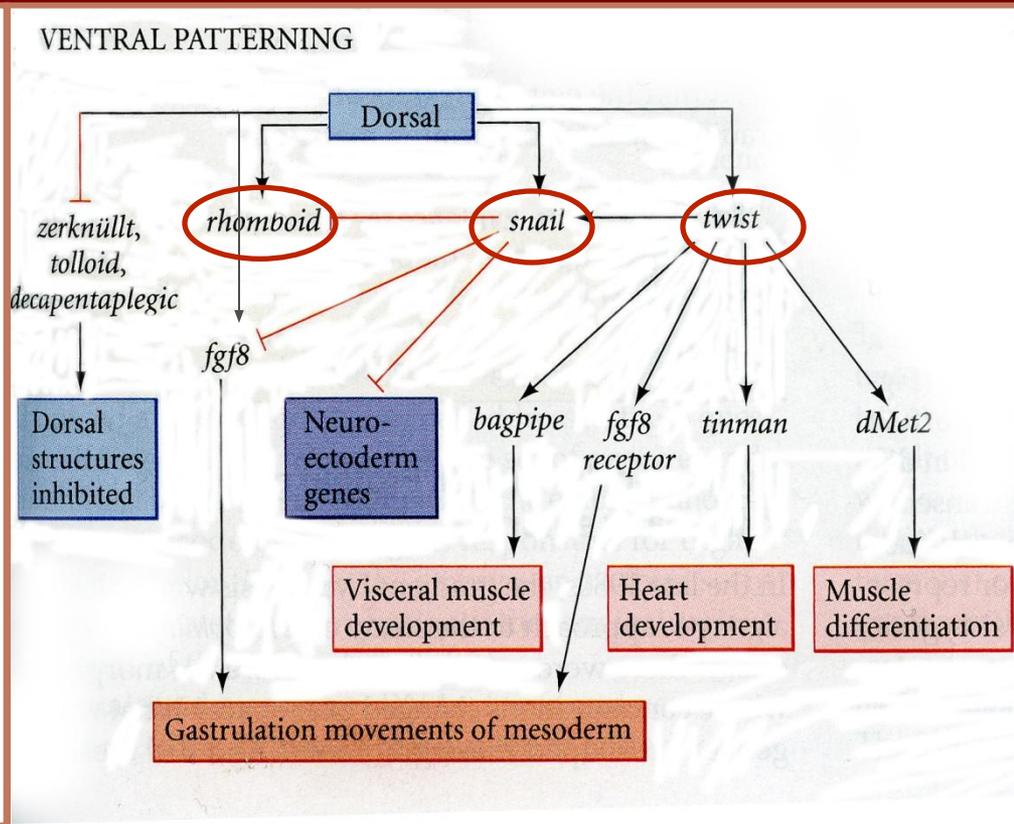
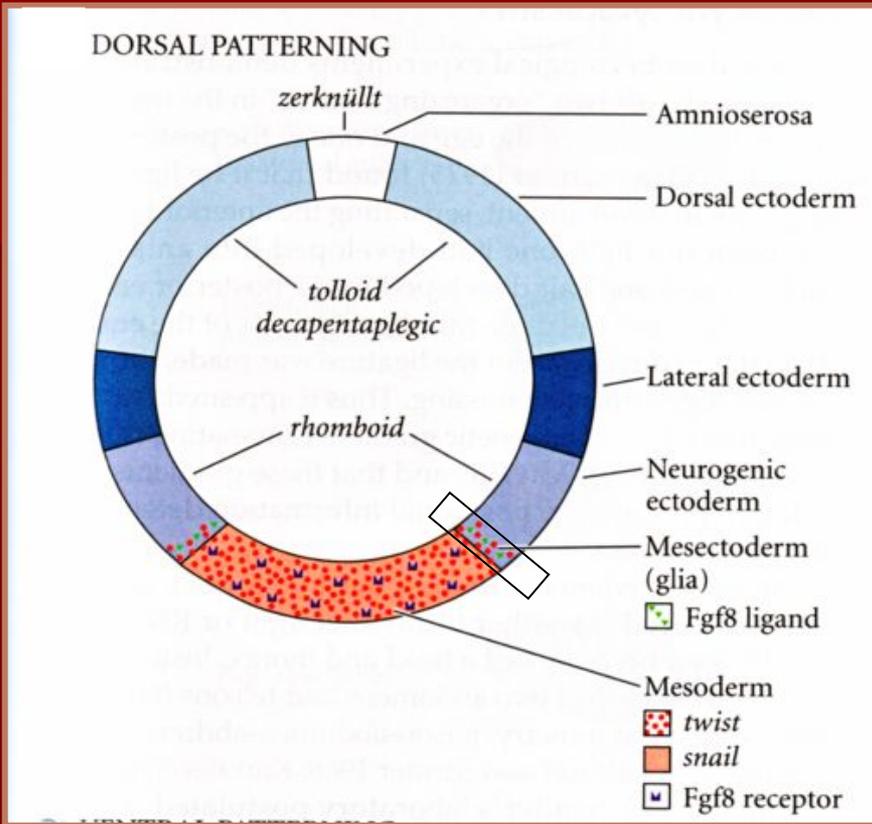
16 вентральных клеток инвагинируют, формируя желобок, трубку, которая затем уплощается и образует мезодермальные органы – мускулатуру, жировое тело и гонады.

Dorsal активирует Twist



Формирование D/V оси эмбриона через ядерный градиент белка Dorsal

Спецификации вентральной части эмбриона



Мезодерма формируется в присутствии **Twist** и **Snail**. Глиальные клетки - там, где взаимодействуют **Twist** и **Rhomboid**. Клетки, которые экспрессируют лишь **Rhomboid**, формируют нейрогенную эктодерму. Рецептор **fgf8** экспрессируется в мезодерме. Связывание с ним его лиганда запускает клеточное движение, необходимое для инвагинации мезодермы.

Белок **Dorsal** ингибирует те гены, которые активны в дорзальной части – **tolloid**, **decapentaplegic** и **zerknüllt**. И активирует 3 гена в вентральной части. Белок **Snail** ингибирует транскрипцию **Rhomboid** и предотвращает формирование нейроэктодермы в вентральной зоне. **Twist** активирует **dMet2** и **bagpipe**, которые формируют мускулатуру, а также **tinman** – развитие сердечной мускулатуры.

Старая гипотеза

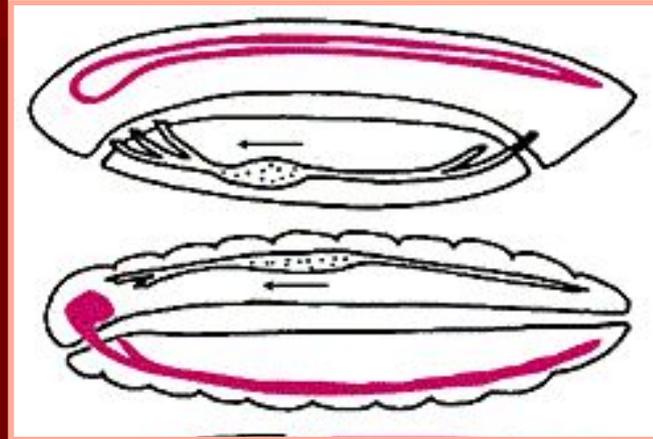
«перевернутости» хордовых подтверждается



Перевернутый омар (Жоффруа Сент-Илер Э., 1822).

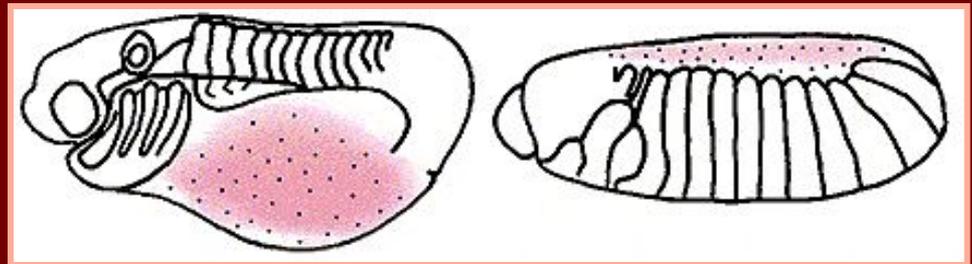
“...природа замкнулась в определенных рамках и создала все живые существа по единому плану, одинаковому в принципе, но который она варьировала на тысячу ладов во всех его деталях”

«О естественных отношениях Маки (*Makis lemur L.*) и описание нового вида млекопитающих, сделанное гражданином Жоффруа, профессором зоологии при Музее естественной истории» 1876 г.



Ланцетник

членистоногие

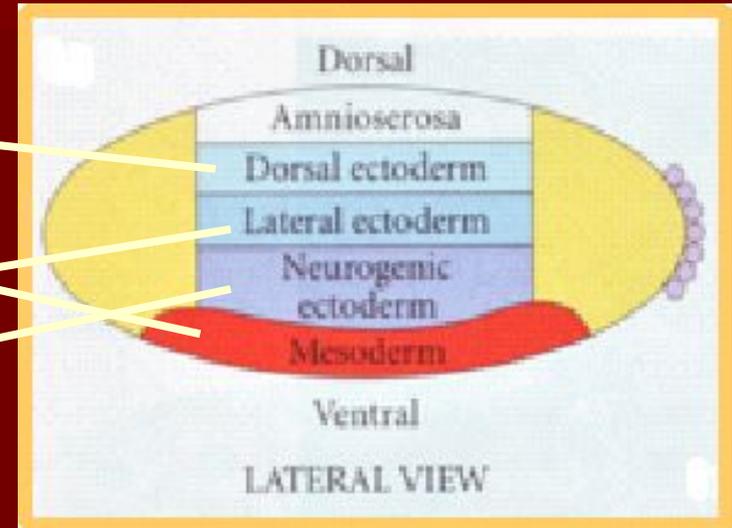
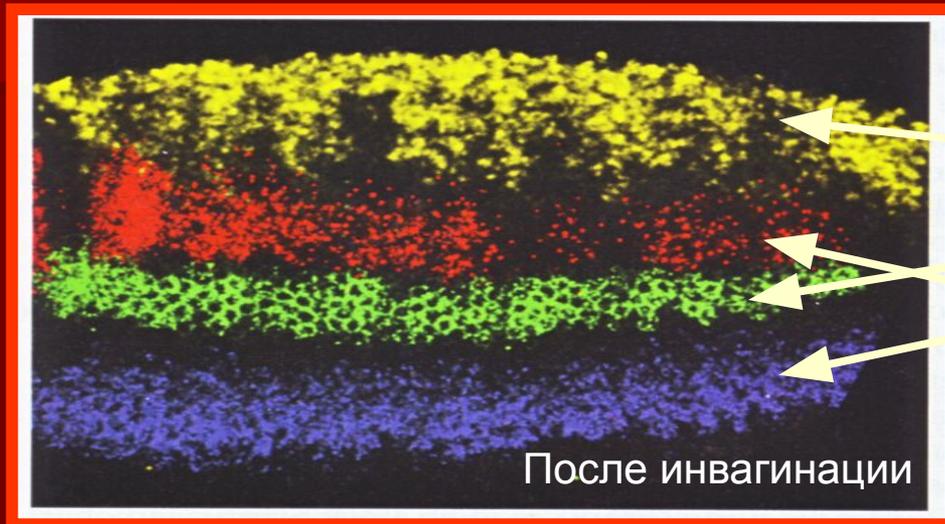


Зародыш лягушки

эмбрион дрозофилы

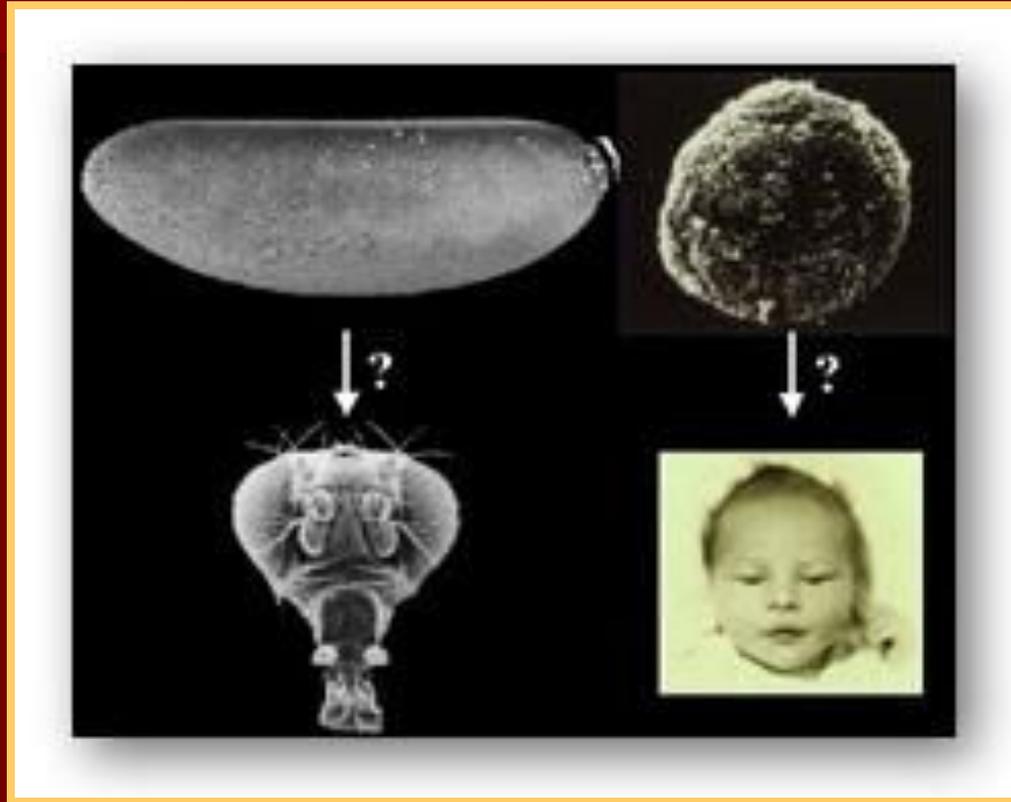
Decapentaplegic (DPP) – на 28% гомолог BMP-4 позвоночных животных
Shot gastrulation (SOG) – на 76% гомолог хордина позвоночных животных

Градиент белка Dorsal определяет экспрессию других белков



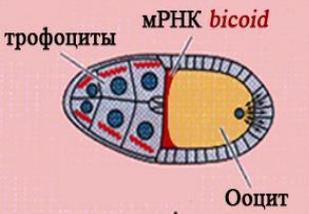
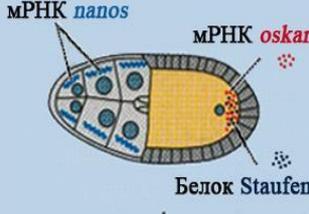
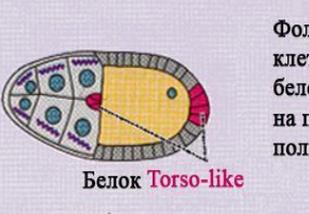
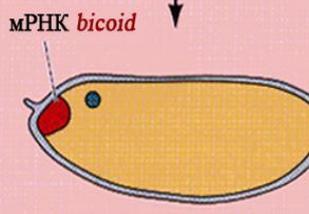
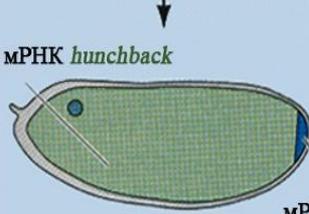
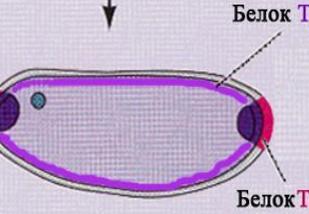
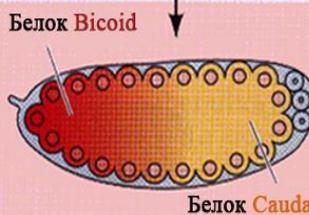
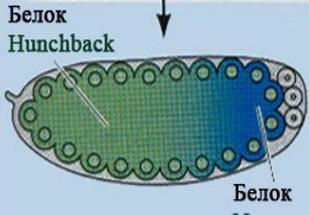
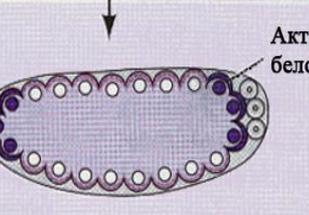
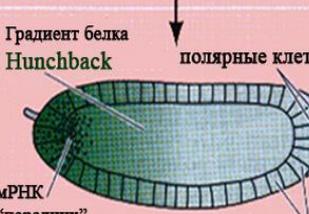
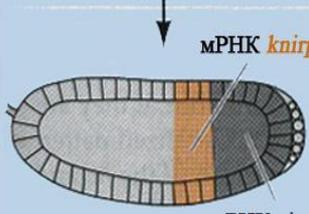
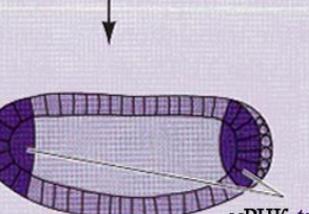
- Ventral nervous system defective - нейрогенная эктодерма
- Intermediate neuroblast defective - латеральная эктодерма
- Muscle-specific homeobox экспрессируется в мезодерме
- Decapentaplegic экспрессируется в дорсальной эктодерме

Зиготические гены сегментации



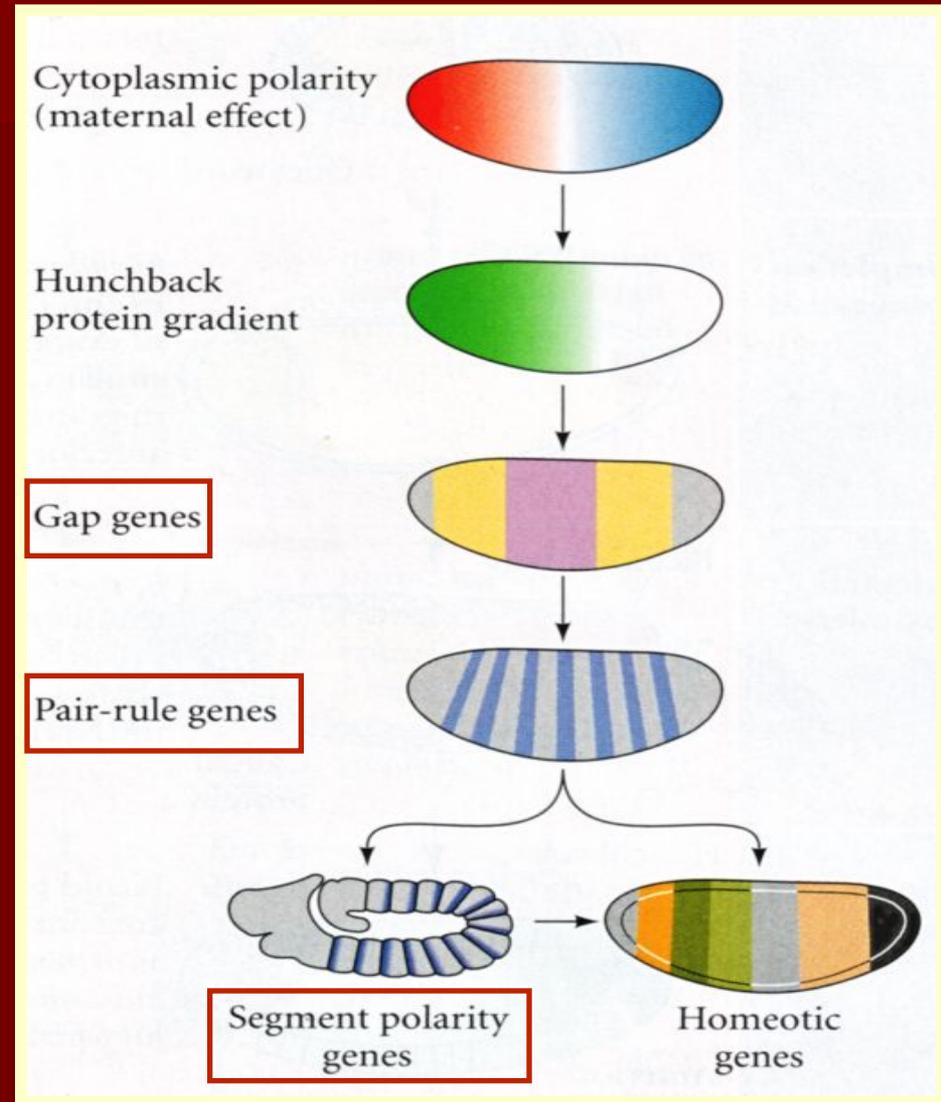
Drosophila and human development are homologous processes

Взаимодействие генетических путей регуляции при формировании А/Р оси развития *Drosophila*

СТАДИЯ	А-СИСТЕМА: VICOID	Р-СИСТЕМА: NANOS	Т-СИСТЕМА: TORSO
Середина оогенеза	<p>трофоциты</p>  <p>мРНК <i>bicoid</i></p> <p>Ооцит</p> <p>Трофоциты секретируют в ооцит мРНК <i>bicoid</i>; ядро ооцита взаимодействует с задними фолликулярными клетками</p>	 <p>мРНК <i>nanos</i></p> <p>мРНК <i>oskar</i></p> <p>Белок Staufen</p> <p>Трофоциты секретируют "основу" для "привязывания" мРНК <i>nanos</i> к заднему полюсу</p>	 <p>Белок Torso-like</p> <p>Фолликулярные клетки вырабатывают белок Torso-like на переднем и заднем полюсах</p>
Завершение оогенеза	 <p>мРНК <i>bicoid</i></p> <p>мРНК <i>bicoid</i> локализуется на переднем полюсе благодаря белкам генов <i>exuperantia</i> и <i>swallow</i>; ядро мигрирует в переднюю дорзальную область</p>	 <p>мРНК <i>hunchback</i></p> <p>мРНК <i>nanos</i>, секретируемая трофоцитами, локализуется на заднем полюсе</p>	 <p>Белок Torso</p> <p>Белок Torso-like</p> <p>Torso-like активирует Torso на полюсах</p>
Синцитий	 <p>Белок Bicoid</p> <p>Белок Caudal</p> <p>мРНК <i>bicoid</i> транскрибируется и формирует белковый градиент, который репрессирует трансляцию мРНК гена <i>caudal</i></p>	 <p>Белок Hunchback</p> <p>Белок Nanos</p> <p>мРНК <i>nanos</i> транскрибируется; трансляция мРНК <i>hunchback</i> блокируется на заднем полюсе эмбриона</p>	 <p>Активированный белок Torso</p>
Клеточная бластодерма	 <p>Градиент белка Hunchback</p> <p>полярные клетки</p> <p>мРНК "передних" gap-генов</p> <p>эмбриональные клетки</p> <p>Белок Bicoid активирует группу "передних" gap-генов <i>orthodenticle</i>, <i>buttonhead</i> и <i>hunchback</i></p>	 <p>мРНК <i>knirps</i></p> <p>мРНК <i>giant</i></p> <p><i>nanos</i> активирует группу "задних" gap-генов <i>knirps</i> и <i>giant</i></p>	 <p>Активированный белок Torso</p> <p>Торсо активирует группу терминальных gap-генов</p> <p>мРНК <i>tailless</i> и <i>huckbein</i></p>

Общая модель формирования передне-заднего градиента распределения морфогенетических протеинов

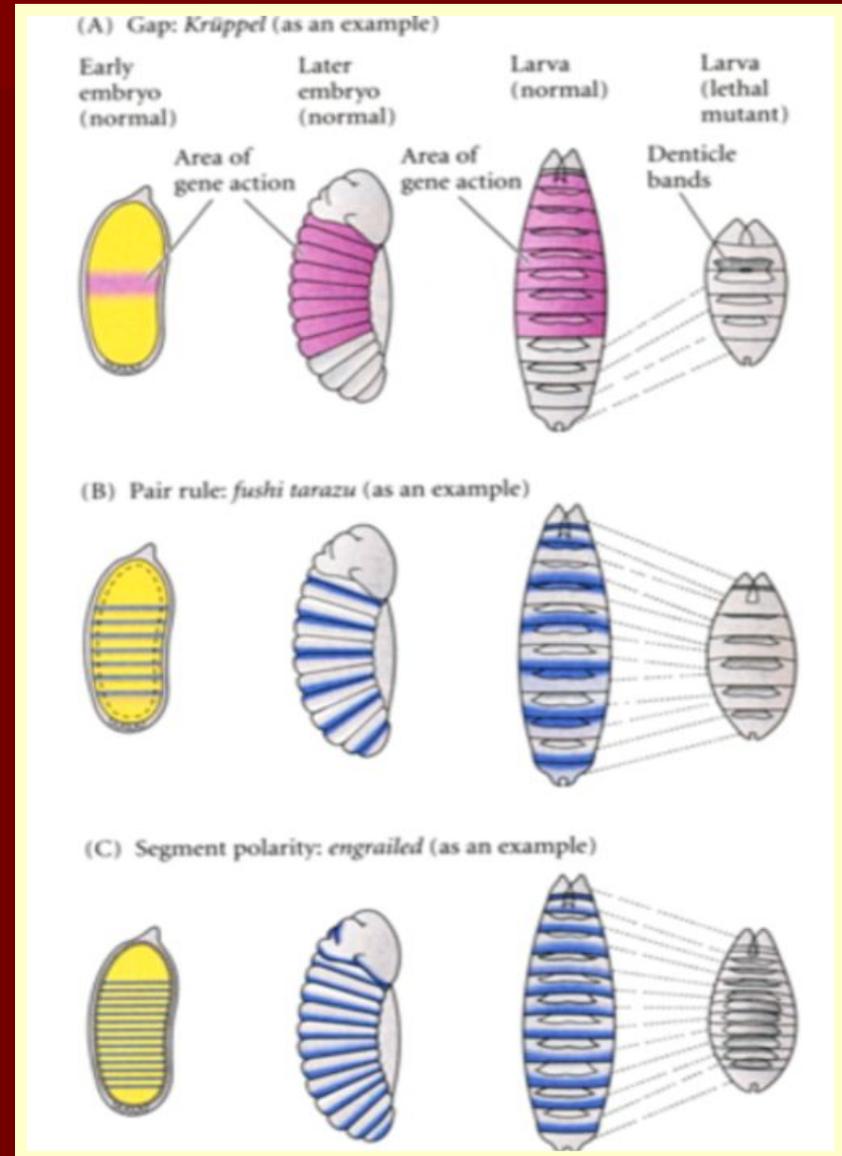
- **Материнские гены** формируют градиенты и области экспрессии продуктов морфогенов.
- Далее формируется градиент белка **Hunchback**, который по-разному определяет активность **gap-генов**.
- **Gap-гены** определяют конкретные области эмбриона.
- **Gap-гены** разрешают экспрессию генов **правила парности (pair-rule)**, каждый из которых делит эмбрион на зоны, шириною в 2 сегмента.
- **Гены сегментной полярности (segment polarity)** определяют развитие отдельных сегментов эмбриона.
- Все вместе эти гены определяют экспрессию **гомеозисных генов**, которые специфицируют каждый сегмент.



Гены сегментации

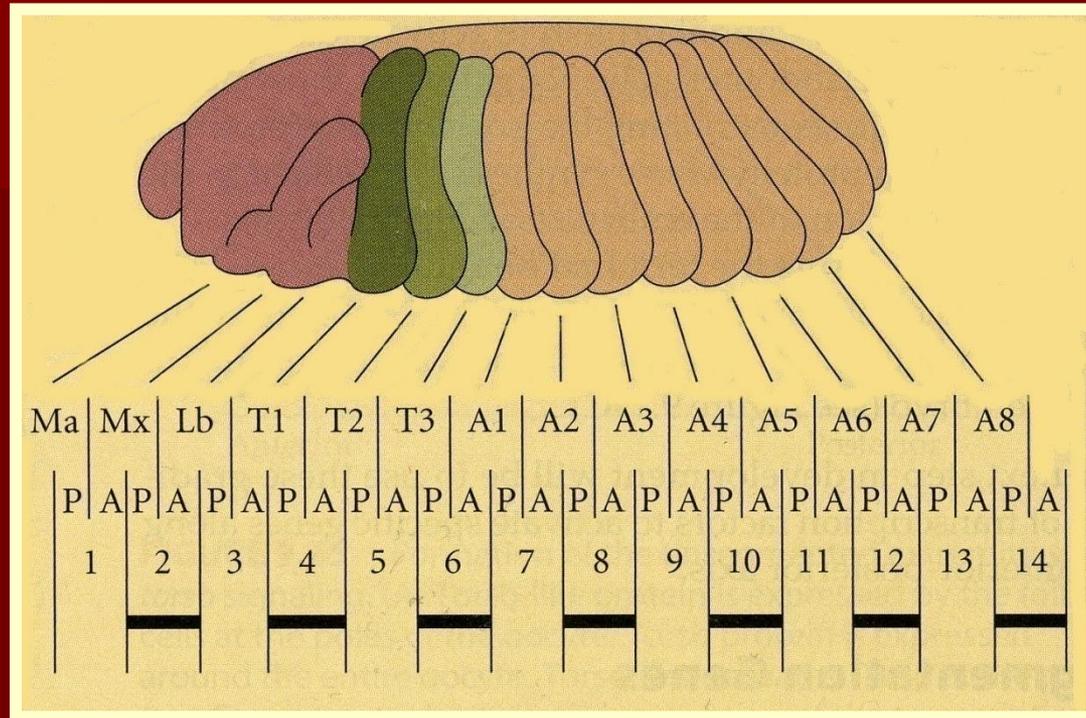
были открыты благодаря мутациям в **зиготических генах**, которые нарушали план строения тела. Эти гены подразделили на группы в соответствии с **мутантным фенотипом**

- Мутации в **gap-генах** вызывают делеции группы сегментов
- Мутации в генах **правила парности** вызывают нехватки части каждого второго сегмента
- Мутации генов **сегментной полярности** вызывают дефекты (делеции, дупликации, изменение ориентации) части каждого сегмента



Сегменты и парасегменты

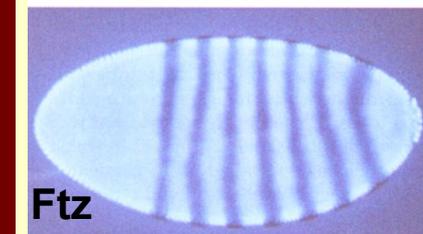
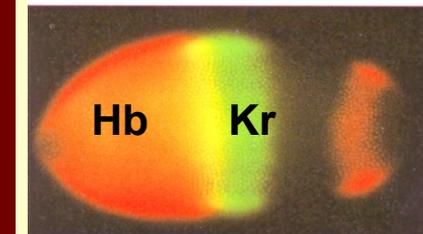
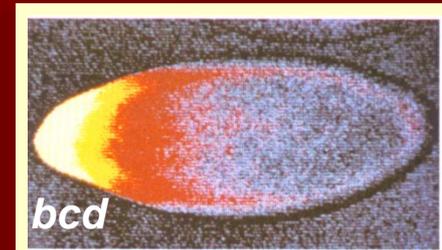
Сегменты
Компартменты
Парасегменты
Экспрессия *ftz*⁺



- Парасегменты у эмбриона дрозофилы сдвинуты на один компартмент вперёд по отношению к сегментам. Каждый парасегмент состоит из заднего отдела сегмента и переднего отдела следующего сегмента.
- Паттерн экспрессии генов сегментации в раннем эмбрионе очерчен границами парасегментов, а не сегментов.
- Поэтому именно **парасегмент стал фундаментальной единицей эмбриональной экспрессии генов.**

Пример экспрессии материнских и зиготических генов

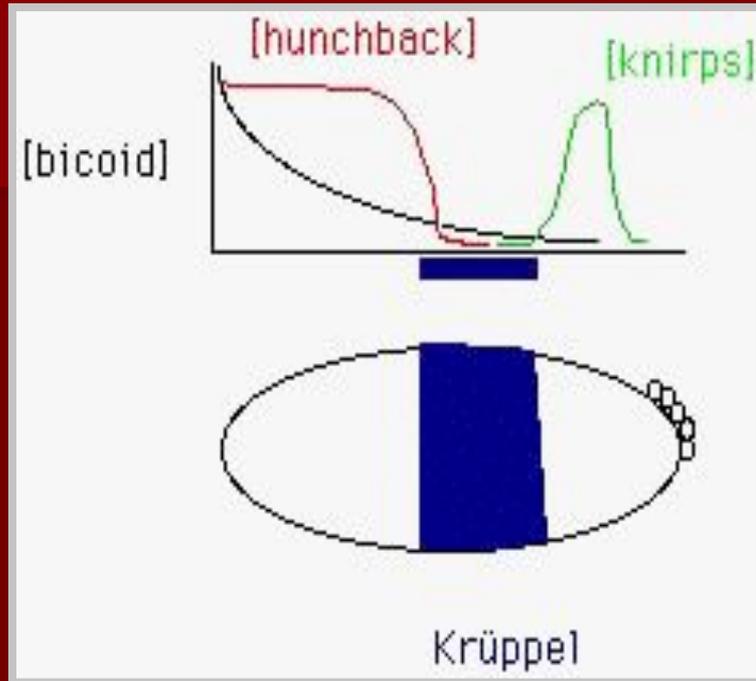
- Материнские гены-координаторы. Передняя ось специфицируется градиентом белка *Vicoid*. (жёлтый переходящий в красный).
- Перекрывающаяся экспрессия генов. Зоны белков *Hunchback* и *Kruppel* (оранжевый и зелёный) перекрываются в зоне, окрашенной жёлтым.
- Продукт гена правила парности *fushi tarazu* формируют семь полос.
- Продукт гена сегментной полярности *engrailed*



Гены-
координаторы
(Материнские гены)

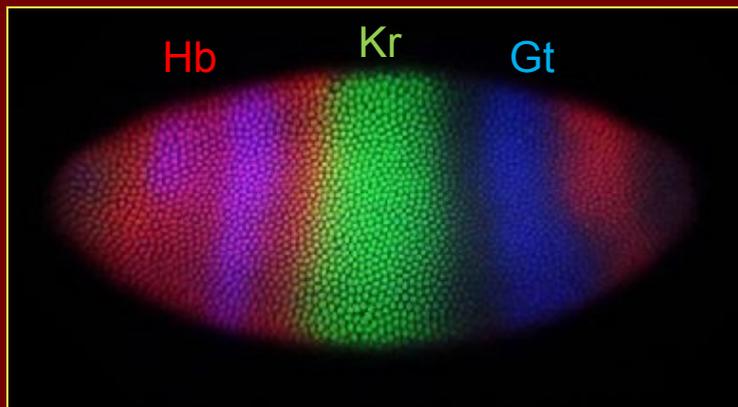
Гены
сегментации
(Зиготические гены)

Регуляция экспрессии гена *Kruppel*



Регуляция паттерна экспрессии гена *Kruppel* осуществляется на уровне транскрипции в общей цитоплазме яйца (до формирования клеток):

- *bicoid* активирет *Kruppel*;
- *hunchback* активирует *Kruppel* при низких концентрациях и репрессирует *Kruppel* при высоких концентрациях
- *knirps* репрессирует *Kruppel*



Паттерн экспрессии и взаимодействие продуктов гом-генов

А. Схематическая экспрессия гом-генов к концу 14-ого цикла ядерных делений:

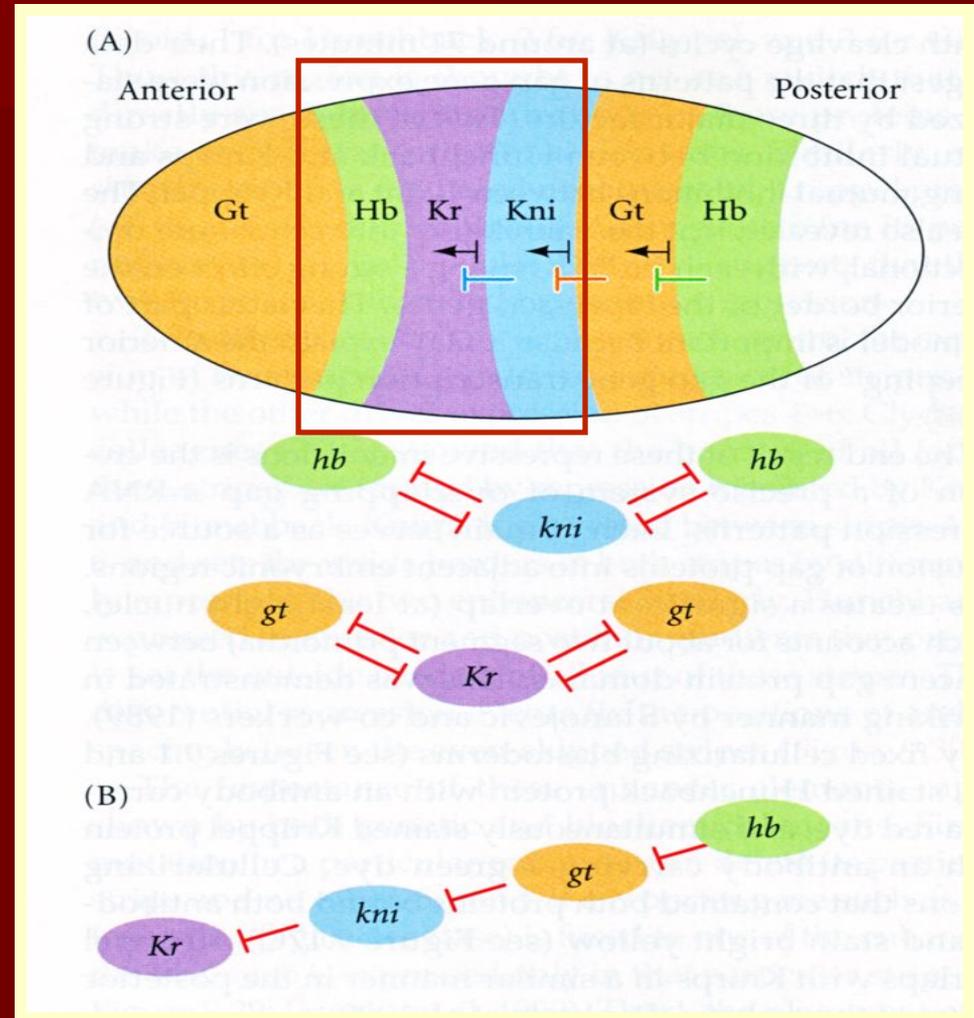
Черточки между доменами обозначают репрессию передних доменов задними доменами.

Стрелки обозначают направление сдвига, которое происходит после очередного цикла деления.

Сильная взаиморепрессия определяет базовый паттерн генной экспрессии.

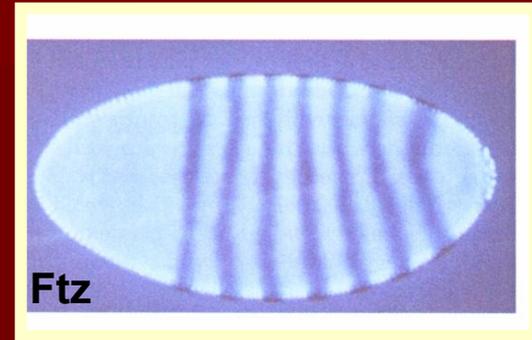
В. Асимметричная репрессия:

Продукт «заднего» гена сильнее репрессирует экспрессию своих соседей спереди.



Гены правила парности (the pair-rule genes)

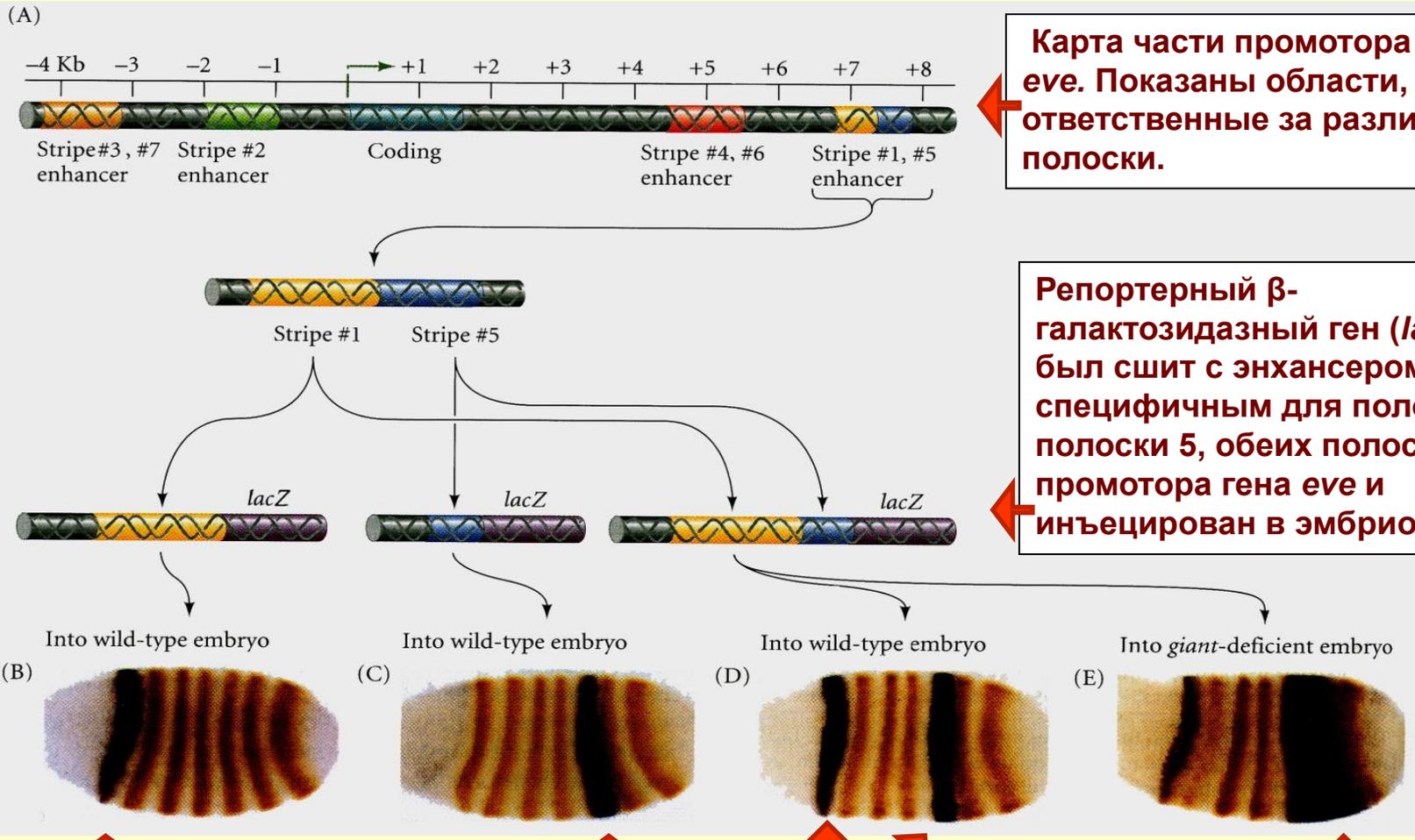
- Первый намёк на сегментацию эмбриона мухи появляется тогда, когда начинают экспрессироваться гены **правила парности**.
- Транскрипционный паттерн этих генов делит эмбрион на области, которые являются предшественниками сегментированного плана строения тела.
- **Первичные** гены правила парности каждый из которых экспрессируется в семи полосках.
- **Вторичные** гены правила парности экспрессируются позже.



hairy (h)
even-skipped (eve)
runt (run)

fushi tarazu (ftz)
odd-paired (opa)
odd-skipped (odd)
sloppy-paired (slp)
paired (prd)

Специфические области промотора гена *even-skipped* (*eve*) специфически контролирует его транскрипцию



Карта части промотора гена *eve*. Показаны области, ответственные за различные полосы.

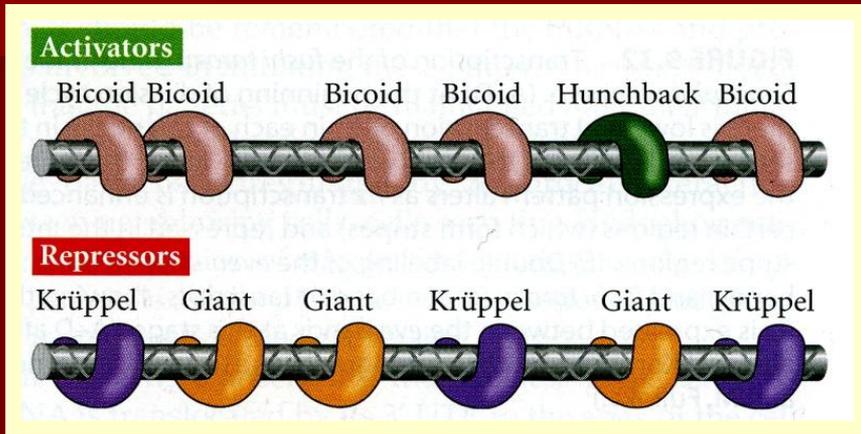
Репортерный β -галактозидазный ген (*lacZ*) был сшит с энхансером, специфичным для полосы 1, полосы 5, обеих полосок и промотора гена *eve* и инъецирован в эмбрион.

Эмбрионы дикого типа, полученные после инъекций трансгена, содержащего *lacZ* и энхансера, специфичного для полосы 1 (B), полосы 5 (C), обеих полосок (D). Окраска x-gal и антителами к *Eve*

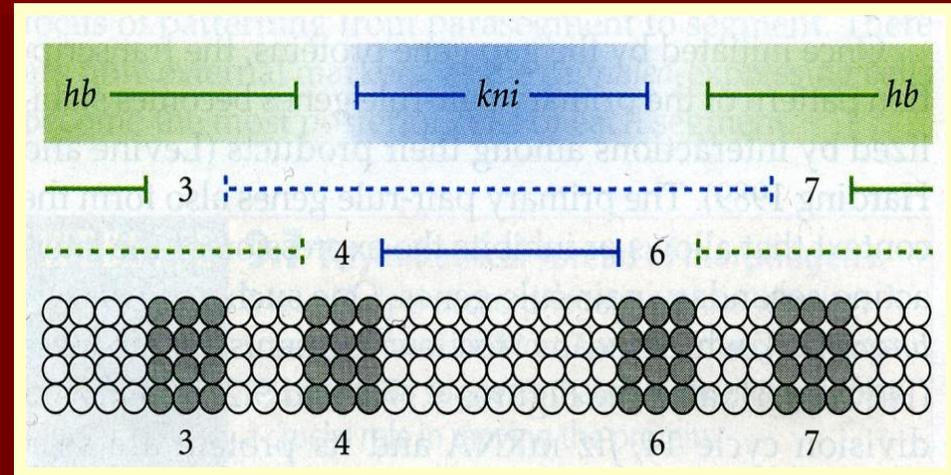
Область энхансера, специфичного для полосок 1 и 5, была инъецирована в эмбрион, мутантный по гену *giant*. В этом случае исчезла задняя граница пятой полосы.

Схема формирования паттерна транскрипции гена *even-skipped*

Полоса 2



Полосы 3+7 и 4+6

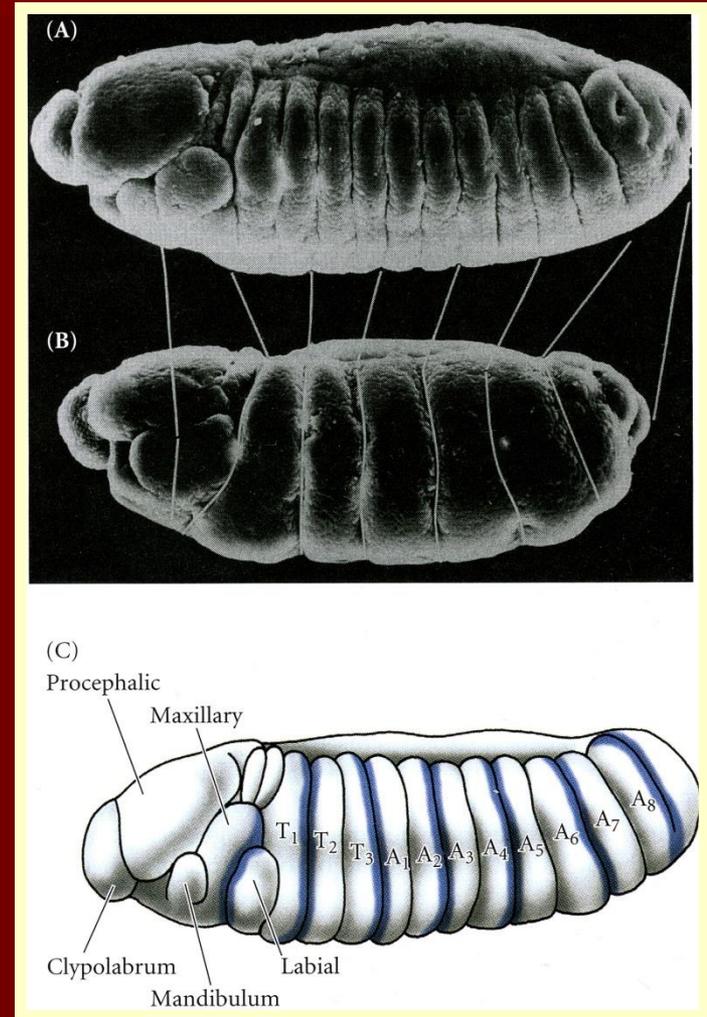


- Регуляторный энхансерный элемент **полосы 2** содержит сайты связывания с белками **Bicoid, Hunchback, Giant** и **Krüppel**.
- Вверху показаны активаторы, внизу – репрессоры.
- Подобные элементы могут действовать, как **переключатели транскрипции**, в зависимости от концентрации гар-белков в конкретной зоне эмбриона.

- Гар-белки **Hb** и **Kni** взаиморепрессируют друг друга. Это взаимодействие фиксирует их локализацию.
- Градиенты **Hb** и **Kni** «прочитываются» энхансерами, которые по-разному чувствительны к репрессии этих белков.
- Полосы **3** и **7**, как и полосы **4** и **6**, транскрибирующие **eve**, будут симметрично расположены вдоль этих градиентов.

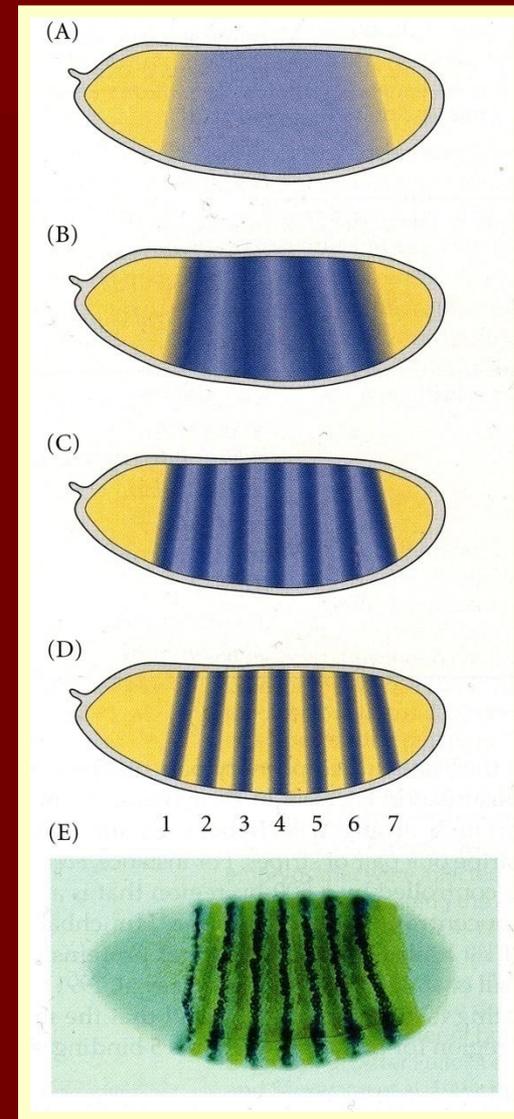
Дефекты эмбриона, мутантного по гену *fushi tarazu*

- **A.** Эмбрион дикого типа
- **B.** Мутантный эмбрион на той же стадии развития.
- **C.** Диаграмма сегментированного эмбриона дикого типа. Тёмные области показывают парасегменты, которые отсутствуют у мутанта.



Транскрипция гена *fushi tarazu*

- **A.** К началу цикла деления 14 уровень транскрипции гена *ftz* низок в сегментируемой области эмбриона.
- **B-D.** В течение следующих 30 мин., паттерн меняется, т. к. транскрипция *ftz* усиливается в отдельных регионах, формирующих полосы, и репрессируется в промежуточных зонах.
- **E.** Двойное окрашивание транскриптов генов *eve* (голубые полосы) и *ftz* (зелёные полосы), показывает, что на этой стадии *ftz* экспрессируется между полосами *eve*.





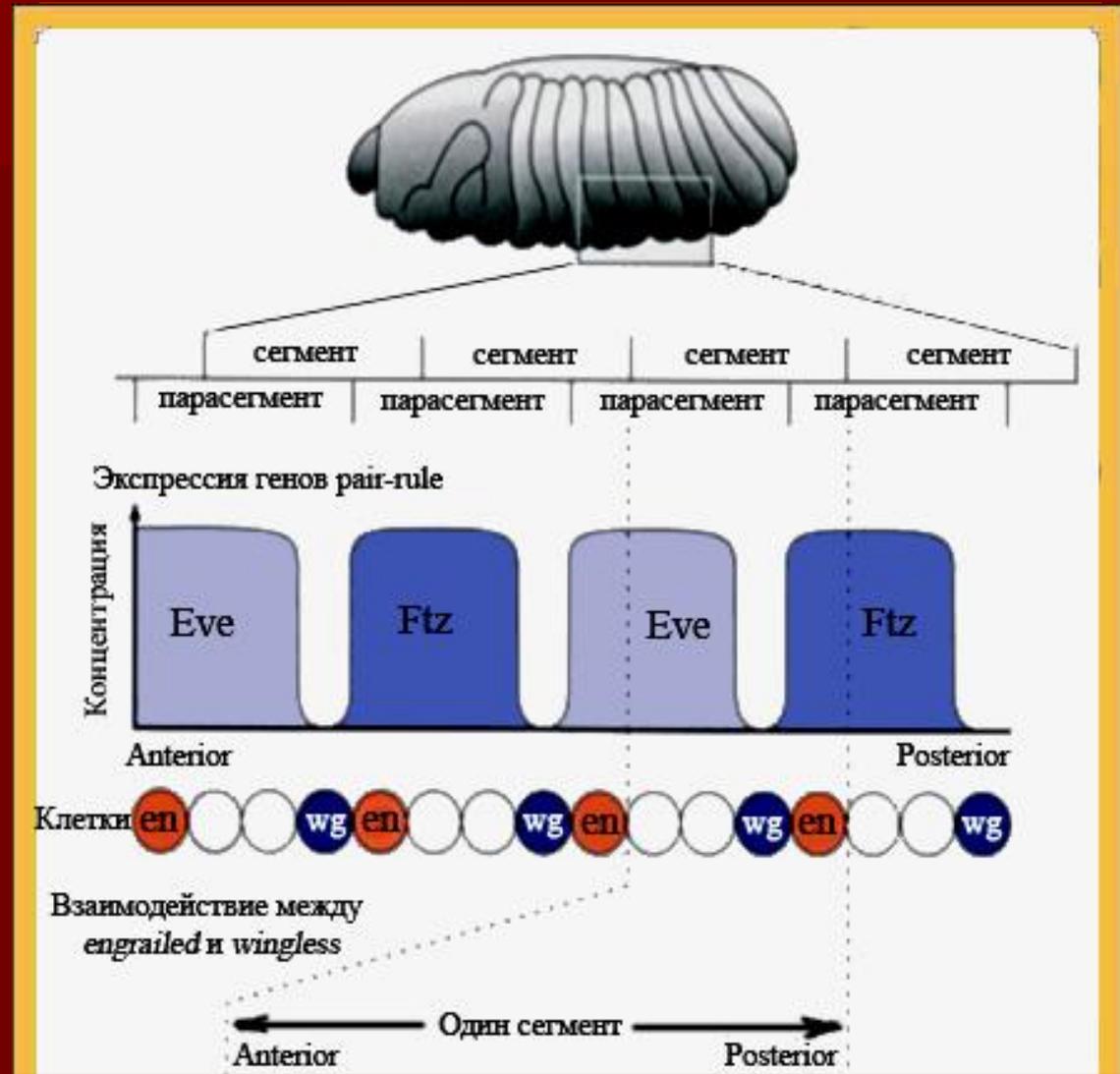
Гены сегментной полярности

- Несмотря на то, что полосатый паттерн экспрессии характерен для восьми известных генов **правила парности**, между собой эти паттерны не совпадают.
- Т.о. каждый ряд ядер внутри парасегмента имеет свой собственный, отличный друг от друга, набор продуктов этих генов. Эти продукты активируют следующий уровень генов сегментации – **генов сегментной полярности**.

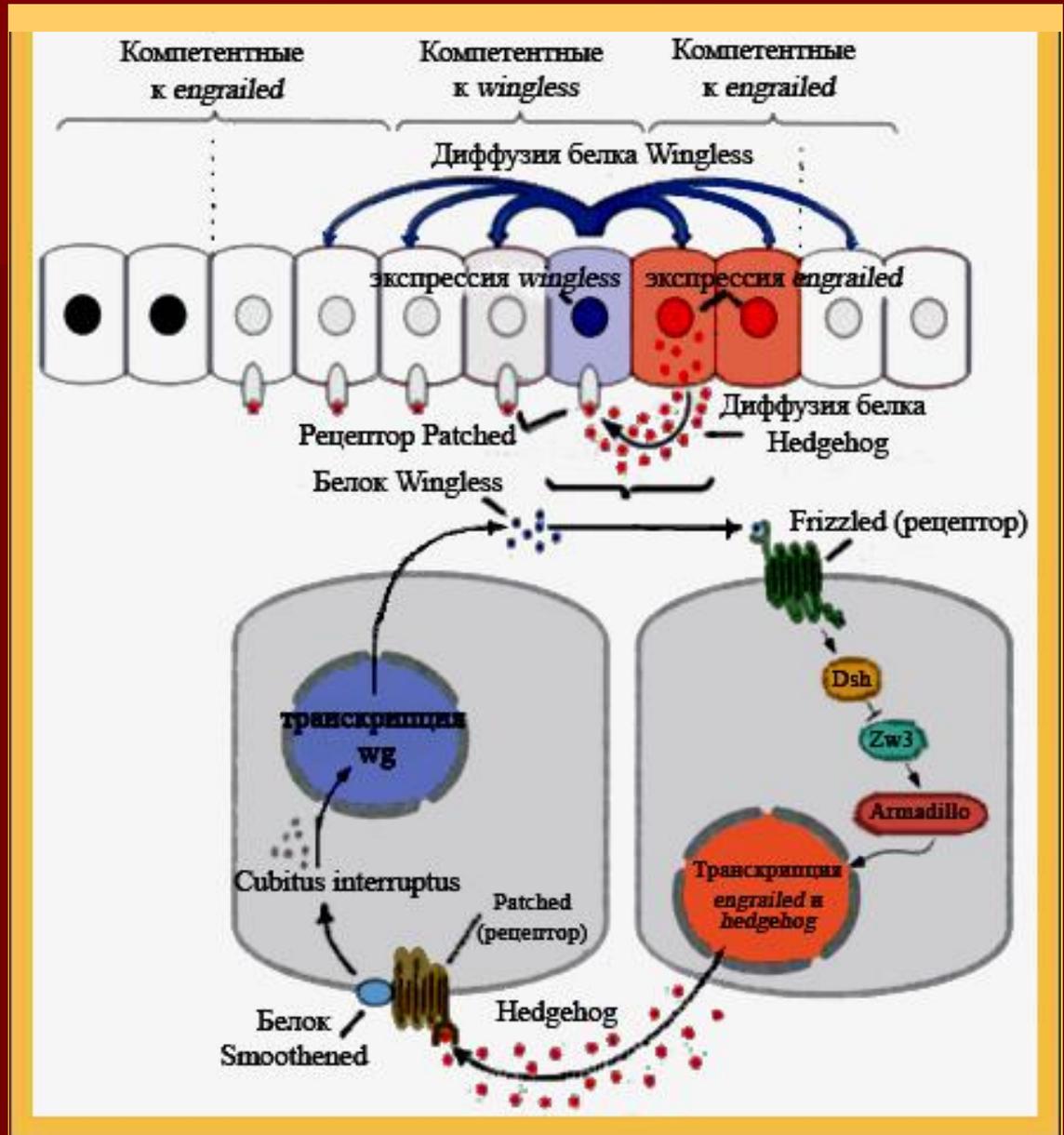
- *engrailed (en)*
 - *wingless (wg)*
 - *cubitus interruptusD (ciD)*
 - *hedgehog (hh)*
 - fused (fu)*
 - armadillo (arm)*
 - patched (ptc)*
 - gooseberry (gsb)*
 - pangolin (pan)*
- Гены сегментной полярности кодируют продукты, которые являются компонентами **сигнальной трансдукции** белков **Wingless** и **Hedgehog**.
 - **Hedgehog** активируется в клетках, экспрессирующих ген **engrailed**

Модель транскрипции генов сегментной полярности *engrailed (en)* и *wingless (wg)*

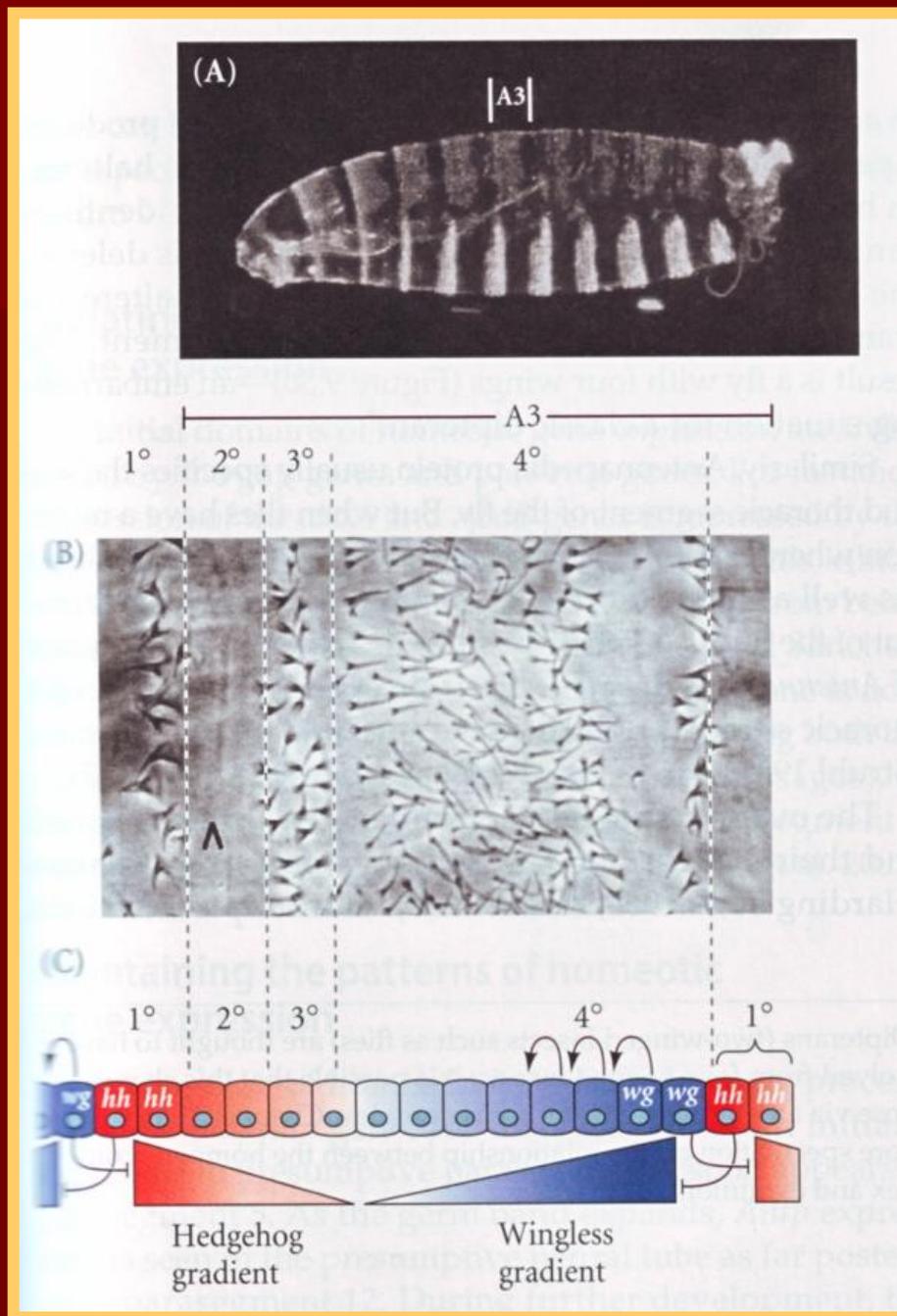
- Экспрессия *engrailed (en)* и *wingless (wg)* иницируется генами правила парности.
- *en* экспрессируется в клетках с высокой концентрацией белков либо *Even-skipped*, либо *Fushi tarazu*.
- *wg* экспрессируется там, где неактивны ни *eve*, ни *ftz*.
- Экспрессия генов *wg* и *en* сохраняется благодаря взаимодействию клеток, экспрессирующих белки *Wg* и *En*.



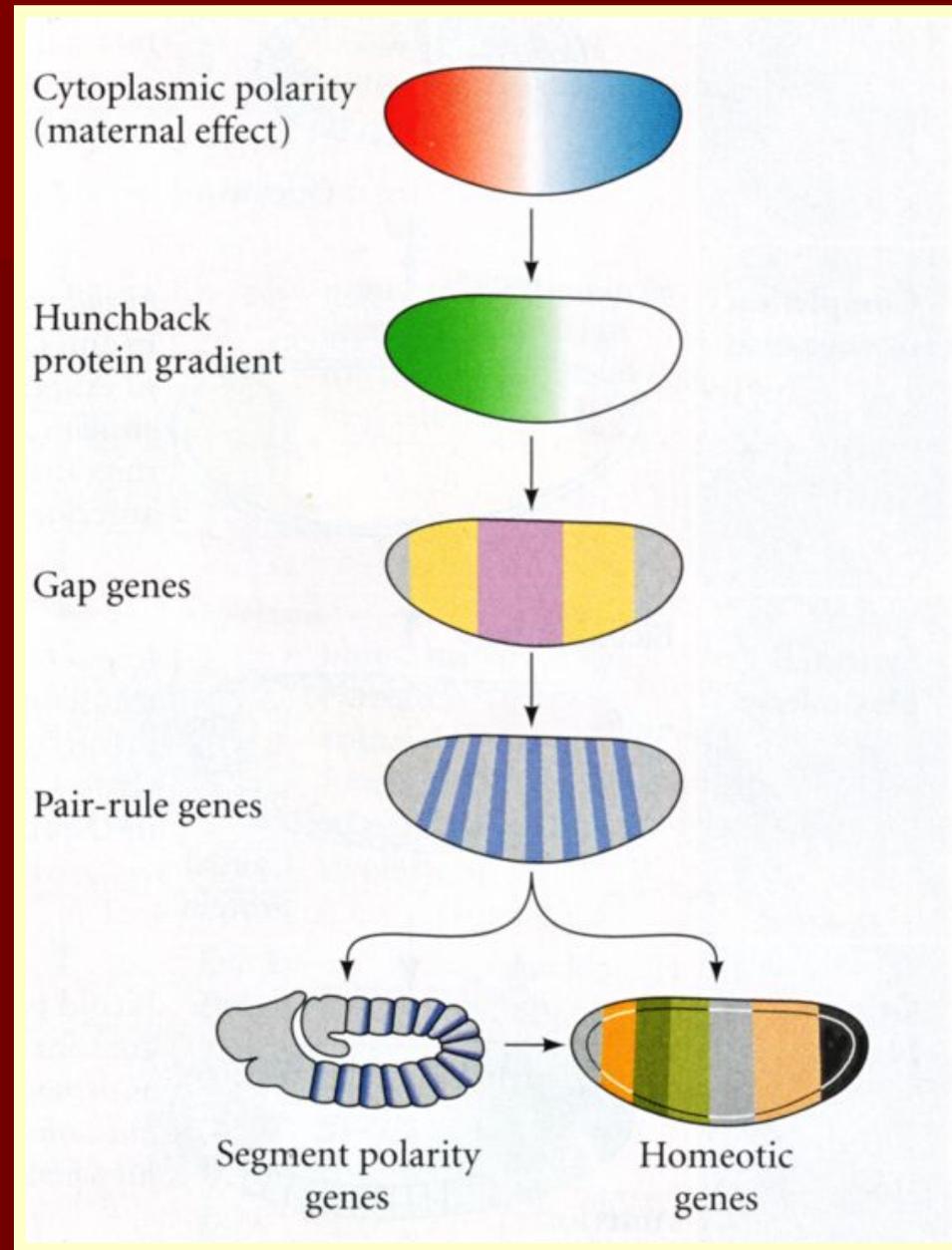
Белок **Wg** секретируется и диффундирует к окружающим клеткам. В тех клетках, которые компетентны экспрессировать **En**, **Wg** связывается с рецептором **Frizzled**, который способен блокировать деградацию **Armadillo** (бета-катенина). **Armadillo** активирует ген **en**. Белок **En** активирует экспрессию гена **hedgehog** (**hh**) и свою собственную. Белок **Hh** диффундирует из клеток и связывается с рецептором **Patched** на соседних клетках и активирует его при помощи белка **Smoothened**. Сигнал **Smoothened** способствует транскрипции и экспрессии гена **wg**.



Пример
спецификации
кутикулярных клеток
с помощью
сигнального центра
wingless/hedgehog

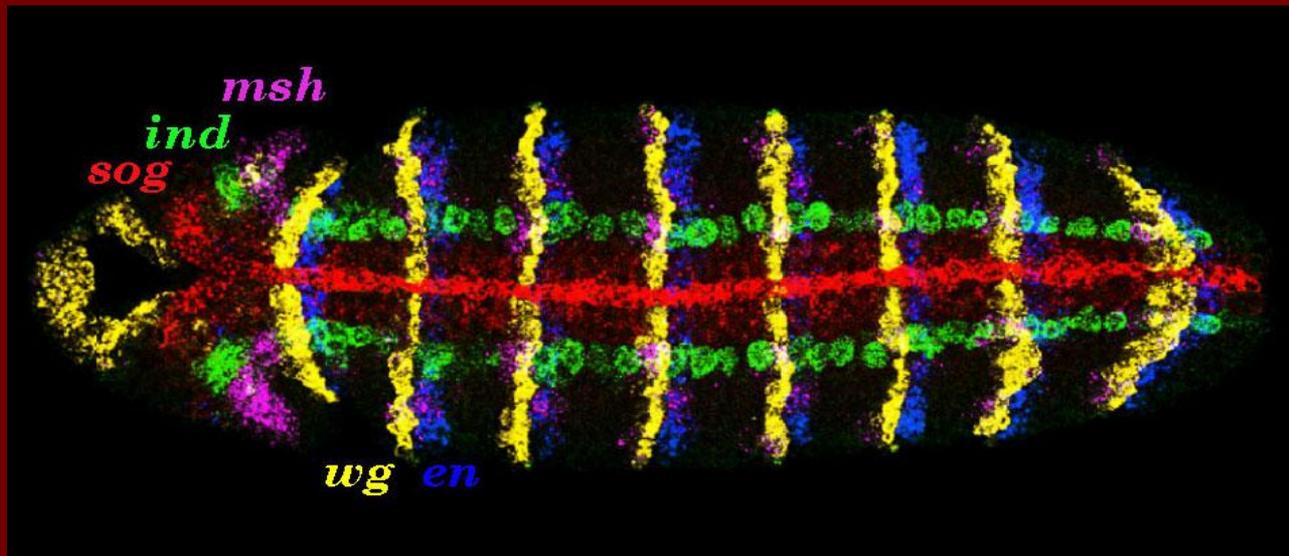


- **Гар-гены** реагируют на концентрацию продуктов материнских генов. **Гар-белки** взаимодействуют так, что каждый из них определяет специфический регион эмбриона.
- **Гар-белки** активируют и репрессируют **гены правила парности**, определяя границы их транскрипции. Модульные промоторы **генов правила парности** активируют их вдоль A/P оси в семи «полосах», каждая из которых состоит из двух парасегментов.
- Продукты **генов правила парности** активируют экспрессию ***engrailed*** и ***wingless*** в соседних клетках. Клетки, экспрессирующие ***engrailed***, формируют переднюю границу каждого парасегмента. Эти клетки формируют **сигнальный центр**, который организует структуры кутикулы и сегментарное строение эмбриона.



«География» работы генов раннего развития

Современные методы позволяют увидеть экспрессию сразу нескольких генов. Эмбрион дрозофилы – вид с вентральной стороны.
Фото с сайта www.drosophila-images.org



muscle-specific homeobox экспрессируется в мезодерме

intermediate neuroblast defective - латеральная эктодерма

shot gastrulation (гомолог хордина) – нейроэктодерма

wingless, *engrailed* – гены сегментной полярности