

УДК 575.16

Е.С. Омелина¹, А.А. Коханенко²

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

² Томский государственный университет, г. Томск, Россия

Поиск новых генов-мишеней транскрипционного фактора GAGA в ходе оогенеза *Drosophila melanogaster*

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 13-04-90783_мол_рф_нр).

Оогенез дрозофилы, включая формирование дорзальных выростов хориона, контролируется большим количеством генов и сигнальных путей; одним из таких путей является сигнальный путь *Decapentaplegic (Dpp)*. Недавно было обнаружено, что мутации гена *Trithorax-like (Trl)*, кодирующего транскрипционный фактор GAGA, также приводят к дефектам во время развития дорзальных выростов хориона. Несмотря на то что наиболее хорошо изученной функцией белка GAGA является регуляция экспрессии генов дрозофилы, до сих пор не было показано взаимодействие GAGA с компонентами сигнального пути *Dpp* в ходе оогенеза. В данной работе было продемонстрировано, что GAGA важен для нормальной экспрессии гена *saxophone (sax)*, кодирующего рецептор I типа *Dpp*-пути. Кроме того, было обнаружено генетическое взаимодействие *Trl* с генами *decapentaplegic (dpp)* и *thickveins (tkv)* во время развития яйцевых камер дрозофилы, в том числе во время формирования дорзальных выростов хориона. В регуляторных районах исследуемых генов также были обнаружены множественные сайты связывания GAGA-фактора, что, по-видимому, свидетельствует об участии GAGA в регуляции экспрессии этих генов в других тканях и органах либо на других стадиях развития дрозофилы.

Ключевые слова: *Trithorax-like*; сигнальный путь *Dpp*; оогенез; *Drosophila*; GAGA.

Введение

Оогенез дрозофилы представляет собой прекрасную модель для исследования различных процессов. Например, развитие дорзальных выростов хориона (ДВХ), респираторных филаментов, которые расположены на переднем конце яйца дрозофилы, происходящее на поздних стадиях развития оогенеза, является популярной моделью для изучения тубулогенеза. Тубулогенез (реорганизация эпителиальной ткани в трубчатые структуры) – это фундаментальный процесс развития таких органов, как сердце, почки, нервная трубка, кишечник и т.д. [1]. Формирование ДВХ контролируется многими сигнальными путями, включая *Epidermal growth factor receptor (EGFR)*, *Notch*, *Wingless* и *Decapentaplegic (Dpp)* пути [2–5]. Известно, что сигналь-

ный путь Dpp необходим для поддержания целостности яйцевой камеры дрозофилы, формирования передних структур яйцевой оболочки и переноса содержимого питающих клеток в ооцит. Снижение количества белка Dpp приводит к потере передних структур яйцевой оболочки [4]. Белок Dpp дрозофилы является гомологом белков BMPs, bone morphogenetic proteins, входящих в состав семейства трансформирующих факторов роста β (TGF- β). Члены семейства TGF- β контролируют большое количество клеточных процессов, включая пролиферацию клеток, взаимодействие, дифференцировку, апоптоз в ходе развития и в тканях имаго, у различных видов животных от мух до млекопитающих [6]. Белок Dpp действует через серин/треонин киназные рецепторы, известные как рецепторы I и II типов [7], различающиеся своими последовательностями и лиганд-связывающими характеристиками [8]. Рецепторы I типа кодируются генами *saxophone (sax)* и *thickveins (tkv)* [7, 9, 10], рецептор II типа – геном *punt* [11, 12]. Лиганд Dpp запускает передачу сигнала, связываясь с рецепторами I и II типов и тем самым сближая их на поверхности клетки [13]. Это позволяет рецептору II типа фосфорилировать киназный домен рецептора I типа, который затем передает сигнал через фосфорилирование белков Smad. Активные комплексы белков Smad накапливаются в ядре, где они регулируют транскрипцию генов-мишеней [7].

Несмотря на то что формирование ДВХ является хорошо изученным процессом, в настоящее время известны не все гены, участвующие в развитии ДВХ. Так, например, недавно было показано, что мутации гена *Trithorax-like (Trl)*, кодирующего белок GAGA, также нарушают формирование передних дорзальных структур яйцевой оболочки дрозофилы [14]. ДВХ яиц, отложенных *Trl*-мутантами, укорочены и не имеют лопастей; размеры оперкулулов и яиц таких мутантов также могут быть уменьшены. Белок GAGA наиболее хорошо известен как транскрипционный фактор, т.е. регулятор экспрессии генов дрозофилы. Известно, что GAGA может регулировать экспрессию генов несколькими путями. Во-первых, GAGA принимает участие в ремоделировании структуры хроматина, вызывая формирование и поддержание открытой структуры хроматина, что, в свою очередь, усиливает связывание транскрипционных факторов и Pol II с регуляторными районами [15–23]. Известно, что GAGA также участвует в элонгации транскрипции путем кооперирования с гистоновым шапероном FACT, *facilitates chromatin transcription* [17, 24, 25]. Кроме того, было показано, что GAGA обеспечивает механизм контроля «паузирования» Pol II, удерживая белок Negative elongation factor (NELF), необходимый для «паузирования», на промоторе [26, 27]. Несмотря на то что сайты связывания GAGA обогащены на «паузированных» генах дрозофилы, только около 20% «паузированных» генов связываются с белком GAGA [26, 28–29]. Также было показано, что в случае гена *Krüppel* GAGA выступает скорее в роли антирепрессора, нежели активатора [30]. Вместе с ролью в активации / антирепрессии транскрипции генов GAGA также может участвовать в подавлении экспрессии генов [31–39].

Ранее в промоторном районе гена *dpp* был найден и экспериментально подтвержден один GAGA-сайт [40]. Наличие сайтов связывания определенного транскрипционного фактора в регуляторных районах гена с большой вероятностью свидетельствует о том, что регуляция экспрессии этого гена осуществляется данным транскрипционным фактором. Поэтому целью данной работы было исследование потенциальной связи между GAGA-фактором и сигнальным путем Dpp. Поскольку и GAGA, и компоненты Dpp-пути являются эволюционно консервативными [13, 41, 42] и участвуют в формировании многих органов и тканей [7, 43–47], результаты данной работы могут быть полезны для исследования взаимоотношений между GAGA и компонентами сигнального пути Dpp не только у дрозофилы, но и у позвоночных.

Для оценки взаимоотношений между белком GAGA и компонентами сигнального пути Dpp в ходе оогенеза дрозофилы мы использовали комбинированный подход, сочетающий: (1) идентификацию сайтов связывания GAGA в регуляторных районах генов с помощью компьютерного анализа; (2) исследование генетического взаимодействия *Trl* с ключевыми компонентами Dpp-пути; (3) анализ относительной экспрессии генов в яичниках мух дикого типа и *Trl*-мутантов.

Материалы и методики исследования

Линии Drosophila melanogaster.

Использованы следующие линии *D. melanogaster*: *Trl^{F362}* (*Trl^{F362}/TM3, Sb¹ Ser y⁺*) была любезно предоставлена А. Огиенко (Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия; [45]), *Trl^{R85}* (*Trl^{R85}/TM3, Sb¹ Ser y⁺*) была любезно предоставлена Ф. Карчем (Университет Женевы, Швейцария; [48]). Линии 3555 (*dpp^{d14}/CyO*), 12379 (*cn¹ P{PZ}dpp¹⁰⁶³⁸/CyO; ry⁵⁰⁶*), 2069 (*dpp^{hr92} cn¹ bw¹/SM6a*), 427 (*tkv¹*), 3242 (*tkv⁷ cn¹ bw¹ sp¹/CyO*), 8785 (*y¹ w^{*}; sax⁵/SM6a*) и 5404 (*y¹ w^{*}; P{FRT(w^{hs})}G13 sax⁴/SM6a*) были получены из Блумингтоновского центра линий дрозофилы (США). Линия Oregon R была взята из фонда лаборатории.

Распознавание потенциальных сайтов связывания GAGA-фактора.

Сайты связывания транскрипционного фактора GAGA распознавали с помощью программы SITECON (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/sitecon/>; [49]), с использованием ранее разработанного компьютерного подхода [50].

Идентификация эволюционно консервативных сайтов связывания GAGA-фактора.

Последовательности регуляторных районов генов *dpp*, *tkv* и *sax* были проанализированы с помощью ресурса BLAT Search Genome (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>).

Приготовление препаратов яйцевых камер дрозофилы и микроскопия.

Яйцевые камеры из яичников дрозофилы фиксировали и окрашивали TRIC-контрастированным фаллоидином («Sigma», США) в соответствии с протоколом [51]. Яичники раскладывали на стекла в растворе 50% глицерина, разведенного в 1×PBS (1,7 мМ KH_2PO_4 , 5,2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl) и содержащего DAPI в концентрации 1 мкг/мл («Sigma», США). Микроскопический анализ проводили на микроскопе LSM 510 Meta; обработка изображений, полученных с помощью микроскопов LSM 510 Meta и LSM 780 NLO, проводилась с использованием специальной программы Zeiss LSM Image Browser Version 3.5 (все микроскопы – «Zeiss», Германия).

Характеристика фенотипов яйцевых оболочек и дорзальных выростов хориона.

Проанализировали 100 яиц, отложенных самками 2–7-дневного возраста, содержащихся при температуре 25°C. Яйца собирали и погружали в раствор среда Хойера: молочная кислота в отношении 1:1 [4]. Препараты инкубировали в течение ночи при температуре 65°C. Микроскопировали яйца в темном поле с использованием микроскопа AxioImager Z1 («Zeiss», Германия).

В норме средняя длина яйца, оперкулула и ДВХ составляет 652±36, 139±21 и 675±41 мкм соответственно.

ПЦР в реальном времени.

Для анализа экспрессии генов на фоне снижения количества белка GAGA брали яичники двухдневных самок мух Oregon R и трехдневных самок Trl^{B62}/Trl^{R85} . РНК выделяли из яичников с использованием реагента TRIzol («Invitrogen», США) согласно рекомендациям изготовителя. Обратную транскрипцию проводили в расчете на 5 мкг РНК с использованием RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase («Thermo Fisher Scientific», США) с олиго(dT) праймерами («Биоссет», Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Количество кДНК анализировали с помощью ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green I/ Rox («Синтол», Россия) и ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System («Applied Biosystems», США). Равные количества мРНК и кДНК были использованы в анализе для определения относительной экспрессии генов *dpp*, *tkv* и *sax* в яичниках мух дикого типа и Trl^{B62}/Trl^{R85} -мутантов.

Ген β -*Tubulin at 85D* (β *Tub85D*), характеризующийся относительно низким уровнем экспрессии [52], использовали в качестве референсного гена при анализе экспрессии гена *dpp*. Ген *Ribosomal protein L32* (*RpL32*) использовался как референсный в экспериментах по измерению относительной экспрессии генов *tkv* and *sax*.

Для анализа экспрессии генов были использованы следующие праймеры (прямые и обратные соответственно): *RpL32*: ATGA...ATAC, CTGC...

CCAG; β -*tub*: GTAC...GTCA, TCCA...TTGC; *tkv*: TCGC...TG GT, CAAG...TCGT; *sax*: TGCG...AAGT, GCAC...TCAC.

ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System Software («Applied Biosystems», США) была использована для оценки C(t) и относительного количества мРНК генов *dpp*, *tkv* и *sax*.

Результаты исследования и обсуждение

Идентификация сайтов связывания транскрипционного фактора GAGA в регуляторных районах гена decapentaplegic.

Следует отметить, что ранее в проксимальном промоторном районе гена *dpp* (рис. 1) был обнаружен и экспериментально подтвержден один сайт связывания транскрипционного фактора GAGA [40]. Недавно было показано, что отличительной чертой потенциальных генов-мишеней GAGA-фактора может быть высокая плотность GAGA-сайтов в 5'-некодирующей области, включая 5'-некодирующие области экзонов и первые интроны [50]. Поэтому в данной работе был проведен поиск GAGA-сайтов не только в промоторной области (-4 000/ 0 п.н. относительно старта транскрипции), но также и в 5'-некодирующих частях экзонов и первом интроне гена *dpp*. Для распознавания сайтов связывания GAGA мы использовали ранее разработанный подход [50] с использованием программы SITECON [49]. Ранее было показано [50], что GAGA-сайты можно разделить на 4 структурных варианта: сайты типа GAGnGAG и GAGnnnGAG, а также их повторы; сайты, содержащие одиночный мотив GAGAG; (GA)₃₋₉-микросателлитные повторы. Для компьютерного распознавания были использованы выборки сайтов типа GAGnGAG и GAGnnnGAG [50]. Экспериментальные данные подтвердили связывание белка GAGA с 72% сайтов, предсказанных с использованием выборки сайтов типа GAGnGAG и 94,5% сайтов, предсказанных с использованием выборки сайтов типа GAGnnnGAG [50]. С помощью данного экспериментально подтвержденного подхода, мы обнаружили 18, 5 и 14 потенциальных GAGA-сайтов в промоторной области, 5'-некодирующих областях экзонов и первом интроне гена *dpp* соответственно (рис. 1).

Мы сравнивали данные, полученные с помощью SITECON, с результатами экспериментов по иммунопреципитации хроматина (ChIP-chip) из базы данных modENCODE (<http://modencode.oicr.on.ca/fgb2/gbrowse/fly/>). Для сравнения мы использовали данные ChIP-chip-экспериментов, проведенных на эмбриональной культуре клеток дрозофилы Kc167 и личиночной культуре клеток дрозофилы ML-DmBG3-c2. Как показано на рис. 1, расположение GAGA-сайтов, предсказанных с помощью SITECON, не полностью перекрывается с локализацией сайтов, найденных с использованием экспериментов ChIP-chip. По-видимому, это связано с тем, что с помощью SITECON распознаются все сайты, расположенные в последовательности ДНК. Следовательно, сайты, которые не определяются методом ChIP-chip, но в то же время

выявляются программой SITECON, являются функционально неактивными в определенном типе клеток и / или на определенной стадии развития. Экспрессия / регуляция экспрессии гена *dpp*, по-видимому, является тканеспецифичной, и в различных типах клеток или на разных стадиях развития дрозофилы функционально активными могут быть разные GAGA-сайты.

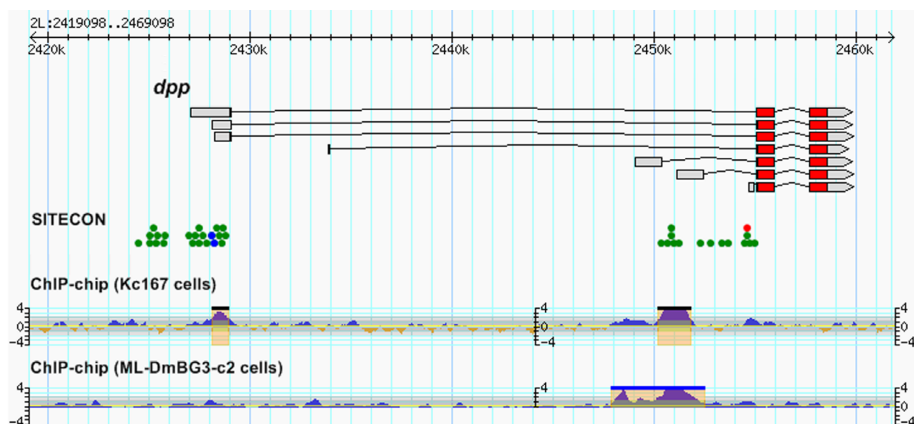


Рис. 1. Локализация GAGA-сайтов в регуляторных районах гена *dpp*. GAGA-сайты, предсказанные с помощью SITECON в регуляторных областях гена *dpp*, показаны зелеными точками. Красной точкой обозначен экспериментально доказанный GAGA-сайт [40]. Эволюционно консервативные сайты показаны в виде синих точек.

Распределение GAGA-сайтов, обнаруженных с использованием метода ChIP-chip, показано в нижней части рисунка

(<http://modencode2.oicr.on.ca/cgi-bin/gb2/gbrowse/fly/>)

GAGA-сайты, предсказанные в регуляторных районах гена *dpp*, были проанализированы с целью поиска эволюционной консервативности, поскольку сохранение структуры сайта на протяжении эволюции дрозофилы указывало бы на вероятную значимость этих сайтов для функционирования гена *dpp*. В результате было обнаружено два эволюционно консервативных сайта (рис. 1). Для этого мы анализировали последовательности регуляторных районов и предсказанных сайтов у 10 видов *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. virilis*, *D. mojavensis* и *D. grimshawi* с помощью ресурса BLAT Search Genome (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Сохранение последовательности сайтов во многих видах *Drosophila* указывает на функциональную значимость этих сайтов [53–56]. Поскольку эволюционное расстояние между *D. melanogaster* и *D. virilis* достаточно для оценки вероятной функциональности некодирующих последовательностей [57], справедливо предположить, что сайты, идентичные во всех выше перечисленных видах дрозофилы, являются эволюционно консервативными и, следовательно, с большой вероятностью – важными для регуляции экспрессии *dpp*.

Таким образом, в данной работе в регуляторных районах гена *dpp* были обнаружены множественные сайты связывания транскрипционного фактора GAGA (включая два эволюционно консервативных) в дополнение к ранее идентифицированному GAGA-сайту [40]. Кроме того, мы исследовали взаимоотношения между GAGA-фактором и геном *dpp* в ходе оогенеза дрозофилы, в том числе в процессе формирования ДВХ.

Генетическое взаимодействие *Trithorax-like* и *decapentaplegic*.

Для анализа генетического взаимодействия *Trl* и *dpp* мы исследовали ДВХ в яйцах, отложенных самками мух дикого типа и мутантами. ДВХ представляют собой длинные трубки, расположенные на переднем конце яйца, которые обеспечивают дыхание развивающегося эмбриона. В норме ДВХ состоят из двух частей – ножки и лопасти (рис. 2). Также на переднем конце яйца расположены оперкулум (хорионическая структура, обеспечивающая выход личинки из яйца) и микропиле (канал для проникновения спермы внутрь яйца). В соответствии с [4] мы измеряли 4 параметра передних дорзальных структур яйца: длину и морфологию ДВХ, размер оперкулума и длину яйца.

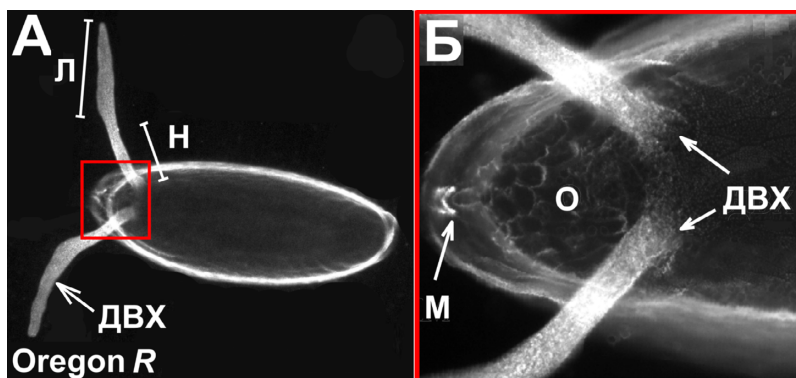


Рис. 2. Передние дорзальные структуры оболочки яйца, отложенного самкой *D. melanogaster* дикого типа (А); увеличенное изображение переднего дорзального района яйцевой оболочки (Б): ДВХ – дорзальные выросты хориона, О – оперкулум, М – микропиле, Н – ножка ДВХ, Л – лопасть ДВХ (фотографии Е.С. Омелиной)

Ранее было обнаружено, что ДВХ яиц, отложенных самками *Trl*-мутантов, могут быть короткими и / или аномальными по форме (например, могут не иметь развитых лопастей). Размер оперкулума и яиц таких мутантов также может быть уменьшен [14]. Для исследования генетического взаимодействия *Trl* и *dpp* мы использовали две мутации гена *Trl*: *Trl^{R85}* [48] и *Trl³⁶²* [45]. *Trl^{R85}* является нуль-аллелем (делеция протяженной части *Trl*-транскрипта); *Trl³⁶²* (гипоморфная мутация) обусловлена вставкой *P*-элемента в 5'-некодирующую область гена *Trl* и прилегающей делецией размером 97 п.н., уда-

ляющей два проксимальных сайта инициации, которые являются функционально активными в яичниках дрозофилы. В яйцевых камерах *Trl*-мутантов транскрипция гена *Trl* приблизительно в 10 раз ниже по сравнению с диким типом, что сопровождается значительным снижением количества белка GAGA в питающих клетках [45].

В случае гена *dpp* мы использовали мутации *dpp^{d14}*, *P{PZ}dpp¹⁰⁶³⁸* и *dpp^{hr92}*. Гипоморфный аллель *dpp^{d14}* был получен с помощью облучения, что вызвало делецию фрагментов 2L хромосомы – 22F1–22F2 и 23A2 [58]. Мутация *dpp¹⁰⁶³⁸* (леталь) обусловлена встройкой P{PZ}-транспозона в 5'-область гена *dpp* (BDGP Project Members, 1994–1999). Мутация *dpp^{hr92}* («loss of function», [59]) вызвана нуклеотидной заменой и, как следствие, заменой аминокислоты [60].

Для анализа изменения проявления фенотипа *dpp*-мутантов на фоне снижения количества белка GAGA мы использовали контроли – яйца, отложенные гетерозиготами *dpp/+* или *Trl/+*. В яйцах таких мутантов мы не обнаружили значительных отличий от дикого типа. Анализ фенотипов ДВХ и яиц, отложенных мутантами *dpp/+*; *Trl/+*, показал, что яйца таких мух меньше по размеру по сравнению с нормой, а форма таких яиц также различна, например, с частотой 2% встречаются аномально толстые и короткие яйца (рис. 3, Б). Также были обнаружены яйца (2%), по форме напоминающие куриное яйцо – с широкой передней частью и суженной задней. ДВХ яиц, отложенных самками *dpp/+*; *Trl/+*, также были различными: 3,5–19% ДВХ были короткими (рис. 3, Б); некоторые ДВХ (6,5–12%) были тонкими и короткими либо неправильной формы (рис. 3, В). Кроме того, два яйца, отложенных мухами *dpp¹⁰⁶³⁸/+*; *Trl^{R85}/+*, имели 4 ДВХ. Таким образом, в данной работе было обнаружено усиление фенотипа *dpp*-мутантов на фоне снижения количества белка GAGA.

Известно, что нарушение длины и морфологии ДВХ может быть результатом дефектов во время морфогенеза ДВХ. Размеры оперкулума и яйца зависят от правильной миграции центрипетальных клеток, поскольку оперкулум формируется из фолликулярных клеток, включая центрипетальные. Кроме того, миграция центрипетальных клеток важна для нормального протекания фазы быстрого транспорта питательных веществ и цитоплазмы питающих клеток в ооцит. Нарушение этого процесса приводит к формированию яиц меньшего размера по сравнению с диким типом [4]. Можно предположить, что дефекты, наблюдаемые в структуре яйцевых оболочек мутантов *dpp/+*; *Trl/+*, могут быть результатом того, что экспрессия обоих генов, *Trl* и *dpp*, важна для правильной миграции центрипетальных клеток [4, 46].

Анализ относительной экспрессии гена decapentaplegic в яйцевых камерах мух дикого типа и Trithorax-like-мутантов.

С помощью ПЦР в реальном времени мы анализировали относительную экспрессию гена *dpp* в яичниках мух дикого типа и мутантов *Trl^{B62}/Trl^{R85}*. Ген *dpp* экспрессируется сначала в 20–30 фолликулярных клетках на переднем

конце яйцевой камеры на стадии 8 оогенеза [4]. На стадии 10А количество *dpp*-экспрессирующих клеток возрастает приблизительно до 50 фолликулярных клеток, расположенных на границе ооцит / питающие клетки. На стадии 10В *dpp* экспрессируется в лидирующей группе (около 20 клеток) центрипетальных клеток [4].

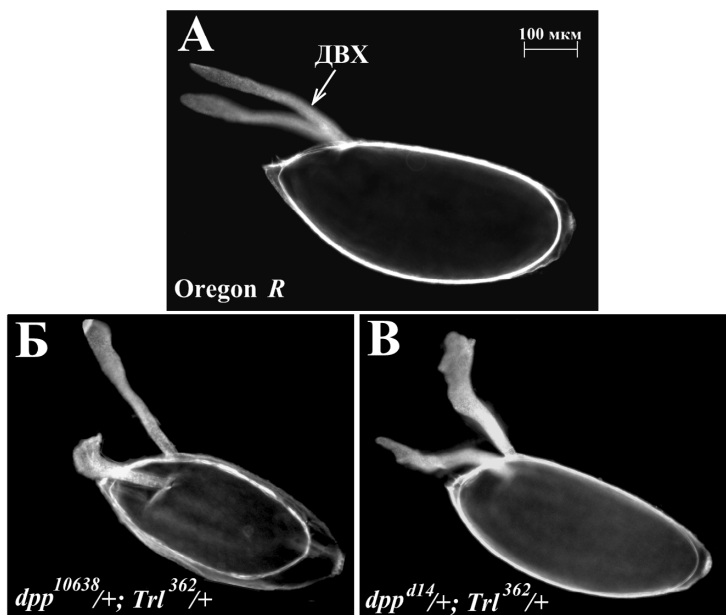


Рис. 3. Взаимодействие *Trl* и *dpp* в процессе формирования ДВХ. Яйца, отложенные самками: (А) Oregon R; (Б) *dpp*^{10638/+}; *Trl*^{362/+}; (В) *dpp*^{d14/+}; *Trl*^{362/+}. ДВХ – дорзальные выросты хориона. Масштаб: 100 мкм (фотографии Е.С. Омелиной)

В результате анализа относительной экспрессии *dpp* с помощью метода ПЦР в реальном времени было обнаружено, что в яичниках *Trl*-мутантов относительный уровень мРНК гена *dpp* меняется незначительно по сравнению с нормой (рис. 4).

Таким образом, в данной работе было показано, что несмотря на то, что GAGA не участвует в регуляции экспрессии гена *dpp* в ходе оогенеза дрозофилы, наблюдается генетическое взаимодействие *dpp* and *Trl* во время развития яйцевых камер, в том числе в процессе формирования ДВХ. Мы предлагаем две гипотезы для объяснения этого явления. Во-первых, можно предположить скооперированное действие GAGA-фактора и сигнального пути Dpp во время оогенеза дрозофилы. Под скооперированным действием мы понимаем такой процесс регуляции экспрессии, когда для нормальной транскрипции гена требуется одновременное действие двух белков или транскрипционных факторов. Однако на сегодняшний день остается неиз-

вестным ген, регулируемый как транскрипционным фактором GAGA, так и сигнальным путем Dpp. Поэтому мы предполагаем, что наличие генетического взаимодействия *dpp* и *Trl* также может объясняться тем, что GAGA участвует в регуляции экспрессии других компонентов пути Dpp. Для проверки этой гипотезы мы выбрали два гена, кодирующие рецепторы I типа Dpp-пути, – *sax* и *tkv*. Следует отметить, что *sax*- и *tkv*-мутанты характеризуются более сильными дефектами в структуре яичевой оболочки по сравнению с *dpp*-мутантами [4].

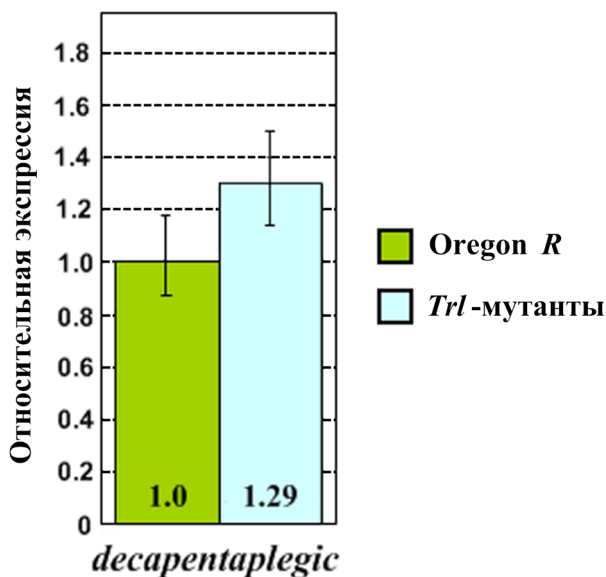


Рис. 4. Анализ относительной экспрессии *dpp* с помощью ПЦР в реальном времени в яичниках дикого типа и *Trl³⁶²/Trl⁸⁸⁵*-мутантов. Относительный уровень мРНК гена *dpp* не меняется в результате снижения количества белка GAGA

Распознавание GAGA-сайтов в регуляторных районах генов thickveins и saxophone.

С использованием экспериментально подтвержденного подхода, как и в случае гена *dpp*, мы искали GAGA-сайты в регуляторных районах генов *tkv* и *sax*. В промоторном районе, 5'-некодирующей области экзонов и первом интроне гена *tkv* было найдено 16, 2 и 28 GAGA-сайтов соответственно (рис. 5, А). В промоторном районе гена *sax* было обнаружено 11 потенциальных сайтов (рис. 5, Б), тогда как в 5'-некодирующей области экзонов и первом интроне не было выявлено GAGA-сайтов. Следует отметить, что один GAGA-сайт, предсказанный в промоторном районе гена *sax*, был экспериментально подтвержден ранее [50] (рис. 5, Б).

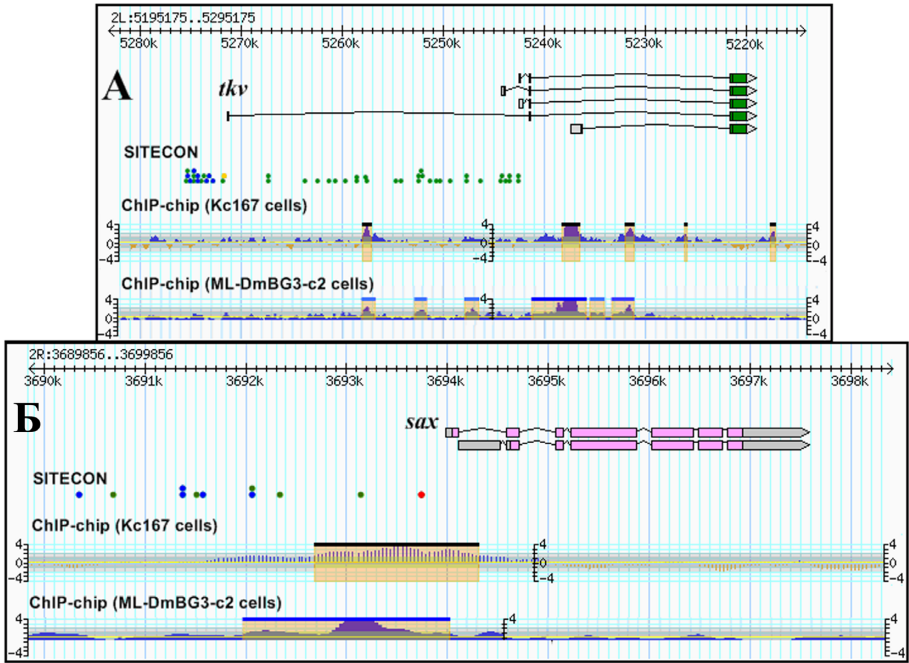


Рис. 5. Распределение GAGA-сайтов в регуляторных районах генов *tkv* (А) и *sax* (Б). Зелеными точками отмечены GAGA-сайты, предсказанные с помощью SITECON. Синие точки обозначают эволюционно консервативные GAGA-сайты. GAGA-сайты, обнаруженные с помощью метода ChIP-chip, показаны в нижней части рисунка (из базы данных modENCODE <http://modencode2.oicr.on.ca/cgi-bin/gb2/gbrowse/fly/> с модификациями). (А) Желтая точка соответствует экспериментально неподтвержденному GAGA-сайту; (Б) Экспериментально подтвержденный сайт показан красной точкой [50]

Как показано на рис. 5, количество GAGA-сайтов, предсказанных с помощью SITECON в регуляторных районах анализируемых генов, превышает количество сайтов, идентифицированных с помощью метода ChIP-chip. Вероятно, это связано со структурой хроматина и доступностью / активностью различных сайтов в разных типах клеток дрозофилы на разных стадиях развития. Однако в 5'-некодирующей области экзона и первом интроне гена *sax* с помощью SITECON не были выявлены GAGA-сайты, тогда как в тех же самых районах GAGA-сайты были показаны с использованием метода ChIP-chip. Это может быть связано с тем, что ошибка I рода составляет 0,64 и 0,52 для выборок сайтов типа GAGnGAG и GAGnnnGAG, соответственно [50], т.е. большой процент сайтов такого типа не распознается с помощью SITECON. Кроме того, с использованием этого подхода нельзя идентифицировать сайты, содержащие одиночный мотив GAGAG.

Анализ эволюционной консервативности предсказанных сайтов показал, что 8 сайтов в промоторе гена *tkv* и 5 сайтов в промоторной области гена *sax*

идентичны по структуре во всех анализируемых 10 видах *Drosophila*. Справедливо предположить, что эти сайты являются функционально значимыми для регуляции экспрессии анализируемых генов.

Анализ генетического взаимодействия Trithorax-like с thickveins и saxophone.

В случае гена *tkv* мы использовали гипоморфную мутацию *tkv¹* [61] и «loss of function» аллель [62], который содержит точечную замену, приводящую к замене аминокислоты [9, 63]. Для анализа изменения фенотипа *tkv*-мутантов на фоне снижения количества GAGA были использованы контроли – яйца, отложенные гетерозиготами *tkv/+* и *Trl/+*. В яйцах таких мутантов мы не обнаружили значительных отклонений в структуре яйцевой оболочки по сравнению с нормой. Яйца, отложенные мутантами *tkv/+*; *Trl/+*, могли быть как тонкими и удлинёнными, так и достаточно толстыми. 5% яиц, отложенных мухами *tkv⁷/+*; *Trl^{B62}/+*, были укорочены. ДВХ яиц мутантов *tkv/+*; *Trl/+* (рис. 6, Б) также были короткими (8–31,5% ДВХ). Кроме того, 11–20,5% ДВХ таких мутантов были тонкими и / или сближенными. Оперкулум яиц, отложенных мухами *tkv⁷/+*; *Trl/+*, был укорочен в 8–9% яиц.



Рис. 6. Генетическое взаимодействие *Trl* с генами: (Б) *tkv*; (Б) *sax*. (А) Яйцо, отложенное самкой *D. melanogaster* дикого типа (фотографии Е.С. Омелиной)

Для анализа изменения проявления фенотипа *sax*-мутантов при снижении уровня белка GAGA мы использовали «amorphic allele» *sax⁵* [64] и «loss of function, amorphic allele» *sax⁴* [62, 64, 65]. Исследование фенотипов яиц, отложенных контрольными мухами (*Trl/+* и *sax/+*), показал, что яйца таких мух не имеют достоверных отличий от Oregon R. 10% яиц, отложенных мутантами *sax⁵/+*; *Trl^{R85}/+*, были укорочены по сравнению с нормой. ДВХ яиц мутантов *sax/+*; *Trl/+* также могли быть короткими (7–29% ДВХ), тонкими, либо без выраженных лопастей (8–17% ДВХ; рис. 6, В). В 4–9% яиц, отложенных мухами *sax⁵/+*; *Trl/+*, был уменьшен оперкулум.

Таким образом, мы показали, что проявление фенотипов *tkv*- и *sax*-мутантов усиливается на фоне снижения количества белка GAGA по сравнению с контролем. Следовательно, *Trl* взаимодействует с *tkv* и *sax* в ходе оогенеза дрозофилы.

Относительная экспрессия *thickveins* и *saxophone* в яйцевых камерах мух дикого типа и *Trl³⁶²/Trl^{R85}*-мутантов

Относительный уровень мРНК генов *tkv* и *sax* в яичниках мух Oregon R и *Trl³⁶²/Trl^{R85}*-мутантов был проанализирован с помощью ПЦР в реальном времени. Ген *tkv* экспрессируется во всех фолликулярных клетках, покрывающих ооцит на ранних стадиях развития; позже (на стадии 10B) *tkv* активен только в двух группах дорзально-латеральных фолликулярных клеток [66]. Ген *sax* экспрессируется повсеместно во всех тканях и на всех стадиях развития [7]. В результате мы обнаружили, что относительная экспрессия *tkv* в яйцевых камерах *Trl*-мутантов не имеет достоверных отличий от нормы (рис. 7), тогда как относительное количество транскриптов гена *sax* в яичниках *Trl³⁶²/Trl^{R85}*-мутантов более чем в два раза меньше по сравнению с Oregon R (рис. 7).

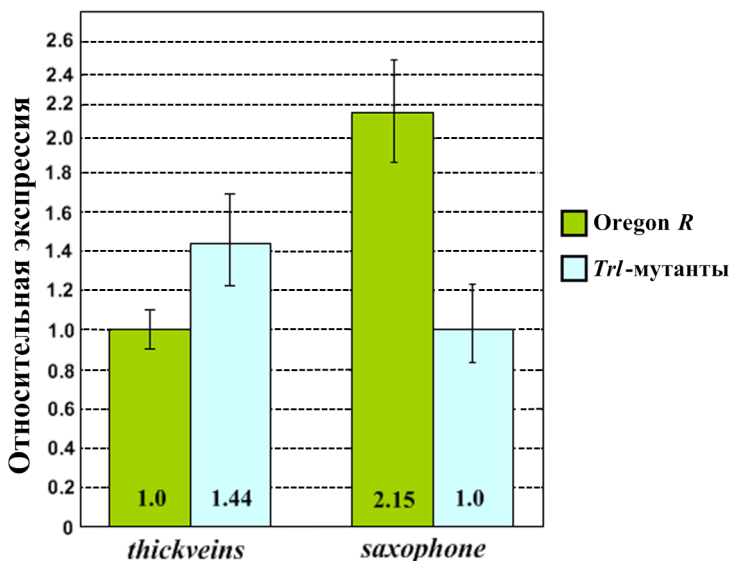


Рис. 7. Относительный уровень мРНК генов *tkv* и *sax* в яичниках мух дикого типа и *Trl³⁶²/Trl^{R85}*-мутантов. Относительная экспрессия *tkv* в яйцевых камерах *Trl*-мутантов не изменяется значительно по сравнению с нормой.

Уровень относительной экспрессии гена *sax* в 2,15 раз ниже в яичниках *Trl*-мутантов в сравнении с диким типом

Заключение

Таким образом, в данной работе мы показали, что транскрипционный фактор GAGA контролирует активность сигнального пути Dpp посредством регуляции экспрессии гена *sax* в ходе оогенеза дрозофилы. Мы полагаем, что GAGA-опосредованная регуляция экспрессии гена *sax* может быть связана с

модификацией структуры хроматина в промоторном районе этого гена, поскольку в данном районе были найдены сайты связывания GAGA-фактора. Кроме того, GAGA, по-видимому, может участвовать в регуляции экспрессии *sax* через «паузирование» полимеразы, поскольку ранее было показано, что и GAGA, и NELF связываются с геном *sax* [26]. Пик GAGA наблюдается в районе -200/+100 п.н. относительно инициаторного элемента; пики белков NELF-B и NELF-E находятся в районе 500 п.н. около старта транскрипции гена *sax* [26].

Мы также продемонстрировали генетическое взаимодействие *Trl* с генами *dpp* и *tkv* и выявили множественные GAGA-сайты в регуляторных районах этих генов, в том числе эволюционно консервативные сайты. Однако мы не обнаружили значительных изменений относительной экспрессии этих генов в яичниках *Trl*-мутантов по сравнению с диким типом. Можно предположить, что GAGA регулирует экспрессию *dpp* и *tkv* в других органах, поскольку ген *Trl* и компоненты Dpp-пути экспрессируются повсеместно. Например, недавно с помощью микрочипового анализа было показано, что экспрессия *dpp* понижается при снижении уровня белка GAGA в эмбриональной культуре клеток S2 [67]. Наличие множественных GAGA-сайтов и снижение экспрессии *dpp* при уменьшении количества GAGA в S2-клетках указывает на вероятную регуляцию экспрессии *dpp* GAGA-фактором в течение эмбриогенеза. Следует отметить, что *dpp* ассоциируется только с GAGA [26], тогда как *tkv* связывается с GAGA и NELF-B [26] подобно гену *sax*. Следовательно, GAGA может участвовать в регуляции экспрессии *tkv* посредством контроля механизма «паузирования» полимеразы.

Поскольку ген *Trl* и компоненты Dpp-пути участвуют в формировании большого числа органов дрозофилы на различных стадиях развития (глаза, крылья, оогенез, эмбриогенез и т.д.), мы надеемся, что данная работа будет полезной при исследовании не только оогенеза, но и других тканей дрозофилы. Кроме того, мы продемонстрировали взаимосвязь GAGA-фактора с сигнальным путем Dpp в процессе развития ДВХ, которые рассматривают как модель тубулогенеза в мировой литературе [1]. Также белок GAGA и Dpp-сигнальный путь являются эволюционно консервативными. Следовательно, исследование их взаимосвязи может быть интересным для исследований, проводимых не только на дрозофиле, но и на млекопитающих, включая человека.

Литература

1. Berg C.A. Tube formation in *Drosophila* egg chambers // Tissue Eng. Part A. 2008. Vol. 14. P. 1479–1488.
2. Berg C.A. The *Drosophila* shell game: patterning genes and morphological change // Trends Genet. 2005. Vol. 21. P. 346–355.
3. Омелина Е.С., Баричева Э.М. Основные компоненты генной сети, контролирующей развитие дорзальных выростов хориона яиц *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2011. Т. 43, № 3. С. 163–174.

4. Twombly V., Blackman R.K., Jin H. The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis // *Development*. 1996. Vol. 122. P. 1555–1565.
5. Zhao D., Woolner S., Bownes M. The Mirror transcription factor links signaling pathways in *Drosophila* oogenesis // *Dev Genes Evol*. 2000. Vol. 210. P. 449–457.
6. Padgett R.W., Reiss M. TGFbeta superfamily signaling: notes from the desert // *Development*. 2007. Vol. 134. P. 3565–3569.
7. Brummel T., Twombly V., Marques G., Wrana J.L. et al. Characterization and relationship of dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in *Drosophila* // *Cell*. 1994. Vol. 78. P. 251–261.
8. Derynck R. TGF-beta-receptor-mediated signaling // *Trends Biochem. Sci*. 1994. Vol. 19. P. 548–553.
9. Nellen D., Affolter M., Basler K. Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of *Drosophila* body pattern by decapentaplegic // *Cell*. 1994. Vol. 78. P. 225–237.
10. Xie T., Finelli A., Padgett R.W. The *Drosophila* saxophone gene: a serine-threonine kinase receptor of the TGF-superfamily // *Science*. 1994. Vol. 263. P. 1756–1759.
11. Letsou A., Arora K., Wrana J.L. *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family // *Cell*. 1995. Vol. 80. P. 899–908.
12. Ruberte E., Marty T., Nellen D., Affolter M., Basler K. An absolute requirement for both the Type II and Type I receptors, punt and thick veins, for Dpp signaling *in vivo* // *Cell*. 1995. Vol. 80. P. 889–897.
13. Shi Y., Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus // *Cell*. 2003. Vol. 113. P. 685–700.
14. Омелина Е.С., Павлова Н.В., Огиенко А.А., Баричева Э.М. Для формирования дорзальных выростов хориона *Drosophila melanogaster* требуется белок GAGA // *Докл. Биохим. Биофиз.* 2011. Т. 436, № 5. С. 696–698.
15. Farkas G., Leibovitch B.A., Elgin S.C. Chromatin organization and transcriptional control of gene expression in *Drosophila* // *Gene*. 2000. Vol. 253. P. 117–136.
16. Lee H., Kraus K.W., Wolfner M.F., Lis J.T. DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of *hsp70* // *Genes & Development*. 1992. Vol. 6. P. 284–295.
17. Nakayama T., Nishioka K., Dong Y.X., Shimojima T., Hirose S. *Drosophila* GAGA factor directs histone H3.3 replacement that prevents the heterochromatin spreading // *Genes Dev*. 2007. Vol. 21. P. 552–561.
18. Okada M., Hirose S. Chromatin remodeling mediated by *Drosophila* GAGA factor and ISWI activates *fushi tarazu* gene transcription *in vitro* // *Mol. Cell. Biol*. 1998. Vol. 18. P. 2455–2461.
19. Shopland L.S., Hirayoshi K., Fernandes M., Lis J.T. HSF access to heat shock elements *in vivo* depends critically on promoter architecture defined by GAGA factor, TFIID, and RNA polymerase II binding sites // *Genes Dev*. 1995. Vol. 9. P. 2756–2769.
20. Tsukiyama T., Wu C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor // *Cell*. 1995. Vol. 83. P. 1011–1020.
21. Tsukiyama T., Becker P.B., Wu C. ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor // *Nature (London)*. 1994. Vol. 367. P. 525–532.
22. Wilkins R.C., Lis J.T. Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation // *Nucleic Acids Res*. 1997. Vol. 25. P. 3963–3968.
23. Wilkins R.C., Lis J.T. DNA distortion and multimerization: novel functions of the glutamine-rich domain of GAGA factor // *J Mol Biol*. 1999. Vol. 285. P. 515–525.
24. O'Brien T., Wilkins R.C., Giardina C., Lis J.T. Distribution of GAGA protein on *Drosophila* genes *in vivo* // *Genes & development*. 1995. Vol. 9. P. 1098–1110.

25. Shimojima T., Okada M., Nakayama T. et al. *Drosophila* FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor // *Genes & development*. 2003. Vol. 17. P. 1605–1616.
26. Lee C., Li X., Hechmer A., Eisen M. et al. NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in *Drosophila* // *Mol Cell Biol*. 2008. Vol. 28. P. 3290–3300.
27. Li J., Liu Y., Rhee H.S., Ghosh S.K.B. et al. Kinetic competition between elongation rate and binding of NELF controls promoter proximal pausing // *Mol Cell*. 2013. Vol. 5. P. 711–722.
28. Fuda N.J., Lis J.T. A new player in Pol II pausing // *EMBO J*. 2013. Vol. 32. P. 1796–1798.
29. Hendrix D.A., Hong J.W., Zeitlinger J. et al. Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the *Drosophila* embryo // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013. Vol. 105. P. 7762–7767.
30. Kerrigan L.A., Croston G.E., Lira L.M., Kadonaga J.T. Sequence-specific transcriptional antirepression of the *Drosophila* Krüppel gene by the GAGA factor // *J Biol Chem*. 1991. Vol. 266. P. 574–582.
31. Berger N., Dubreucq B. Evolution goes GAGA: GAGA binding proteins across kingdoms // *Biochim Biophys Acta*. 2012. Vol. 1819. P. 863–868.
32. Brown J.L., Mucci D., Whiteley M. et al. The *Drosophila* polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1 // *Mol. Cell*. 1998. Vol. 1. P. 1057–1064.
33. Espinas M.L., Canudas S., Fanti L. et al. The GAGA factor of *Drosophila* interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide // *EMBO Rep*. 2000. Vol. 1. P. 253–259.
34. Hagstrom K., Muller M., Schedl P. A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the Fab-7 boundary in the *Drosophila* bithorax complex // *Genetics*. 1997. Vol. 146. P. 1365–1380.
35. Hur M.W., Laney J.D., Jeon S.H., Ali J., Biggin M.D. Zeste maintains repression of Ubx transgenes: support for a new model of polycomb repression // *Development*. 2002. Vol. 129. P. 1339–1343.
36. Mahmoudi T., Zuijderduijn L.M., Mohd-Sarip A., Verrijzer C.P. GAGA facilitates binding of Pleiohomeotic to a chromatinized Polycomb response element // *Nucleic Acids Res*. 2003. Vol. 31. P. 4147–4156.
37. Mulholland N.M., King I.F., Kingston R.E. Regulation of polycomb group complexes by the sequence-specific DNA binding proteins Zeste and GAGA // *Genes Dev*. 2003. Vol. 17. P. 2741–2746.
38. Ringrose L., Paro R. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity // *Development*. 2007. Vol. 134. P. 223–232.
39. Schuettengruber B., Chourrout D., Vervoort M., Leblanc B., Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins // *Cell*. 2007. Vol. 128. P. 735–745.
40. Schwyter D.H., Huang J.D., Dubnicoff T., Courey A.J. The decapentaplegic core promoter region plays an integral role in the spatial control of transcription // *Mol. Cell. Biol*. 1995. Vol. 15. P. 3960–3968.
41. Matharu N.K., Hussain T., Sankaranarayanan R., Mishra R.K. Vertebrate homologue of *Drosophila* GAGA factor // *J. Mol. Biol*. 2010. Vol. 400. P. 434–447.
42. Kumar S. Remote homologue identification of *Drosophila* GAGA factor in mouse // *Bioinformation*. 2011. Vol. 7. P. 29–32.
43. Bhat K.M., Farkas G., Karch F., Gyurkovics H., Gausz J., Schedl P. The GAGA factor is required in the early *Drosophila* embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division // *Development*. 1996. Vol. 122. P. 1113–1124.
44. Dos-Santos N., Rubin T., Chalvet F., Gandille P., Cremazy F., Leroy J., Boissonneau E., Théodore L. *Drosophila* retinal pigment cell death is regulated in a position-dependent manner by a cell memory gene // *Int J Dev Biol*. 2008. Vol. 52. P. 21–31.
45. Огуенко А.А., Карагодин Д.А., Федорова С.А. и др. Анализ новой гипоморфной мутации гена Trithorax-like, влияющей на оогенез *Drosophila melanogaster* // *Онтогенез*. 2006. Т. 37, № 3. С. 157–166.

46. Огиенко А.А., Карагодин Д.А., Павлова Н.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика новой гипоморфной мутации гена *Trithorax-like* и анализ ее влияния на оогенез *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 2. С. 134–142.
47. Tsuneizumi K., Nakayama T., Kamoshida Y. et al. Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in *Drosophila* wing development // Nature. 1997. Vol. 389. P. 627–631.
48. Karch F., Galloni M., Sipos L. et al. *Mcp* and *Fab-7*: molecular analysis of putative boundaries of *cis*-regulatory domains in the bithorax complex of *Drosophila melanogaster* // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22. P. 3138–3146.
49. Oshchepkov D.Y., Vityaev E.E., Grigorovich D.A., Ignatieva E.V., Khlebodarova T.M. SITECON: a tool for detecting conservative conformational and physicochemical properties in transcription factor binding site alignments and for site recognition // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32. P. 208–212.
50. Omelina E.S., Baricheva E.M., Oshchepkov D.Y., Merkulova T.I. Analysis and recognition of the GAGA transcription factor binding sites in *Drosophila* genes // Comput Biol. Chem. 2011. Vol. 35. P. 363–370.
51. Guild G.M., Connelly P.S., Shaw M.K., Tilney L.G. Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping // J Cell Biol. 1997. Vol. 138. P. 783–797.
52. Schotman H., Karhinen L., Rabouille C. Integrins mediate their unconventional, mechanical-stress-induced secretion via RhoA and PINCH in *Drosophila* // J Cell Sci. 2009. Vol. 122. P. 2662–2672.
53. Bergman C.M., Kreitman M. Analysis of conserved noncoding DNA in *Drosophila* reveals similar constraints in intergenic and intronic sequences // Genome Res. 2001. Vol. 11. P. 1335–1345.
54. Gumucio D.L., Shelton D.A., Bailey W.J. et al. Phylogenetic footprinting reveals unexpected complexity in trans factor binding upstream from the epsilon-globin gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 6018–6022.
55. Hartl D.L., Lozovskaya E.R. Genome evolution: between the nucleosome and the chromosome // EXS. 1994. Vol. 69. P. 579–592.
56. Shelton D.A., Stegman L., Hardison R. et al. Phylogenetic footprinting of hypersensitive site 3 of the betaglobin locus control region // Blood. 1997. Vol. 89. P. 3457–3469.
57. Russo C.A., Takezaki N., Nei M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species // Mol. Biol. Evol. 1995. Vol. 12. P. 391–404.
58. Spencer F.A., Hoffmann F.M., Gelbart W.M. Decapentaplegic: A gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster* // Cell. 1982. Vol. 28. P. 451–461.
59. Arora K., Nusslein-Volhard C. Altered mitotic domains reveal fate map changes in *Drosophila* embryos mutant for zygotic dorsoventral patterning genes // Development. 1992. Vol. 114. P. 1003–1024.
60. Wharton K.A., Ray R.P., Findley S.D., Duncan H.E., Gelbart W.M. Molecular lesions associated with alleles of decapentaplegic identify residues necessary for TGF- BMP cell signaling in *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1996. Vol. 142. P. 493–505.
61. de Celis J.F. Expression and function of decapentaplegic and thick veins during the differentiation of the veins in the *Drosophila* wing // Development. 1997. Vol. 124. P. 1007–1018.
62. Horsfield J., Penton A., Secombe J. et al. Decapentaplegic is required for arrest in G1 phase during *Drosophila* eye development // Development. 1998. Vol. 125. P. 5069–5078.
63. Penton A., Chen Y., Staehling-Hampton K. et al. Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that *Brk25D* is a decapentaplegic receptor // Cell. 1194. Vol. 78. P. 239–250.
64. Singer M.A., Penton A., Twombly V., Hoffmann F.M., Gelbart W.M. Signaling through both type I DPP receptors is required for anterior-posterior patterning of the entire *Drosophila* wing // Development. 1997. Vol. 124. P. 79–89.

65. Fritsch C., Lanfear R., Ray R.P. Rapid evolution of a novel signalling mechanism by concerted duplication and divergence of a BMP ligand and its extracellular modulators // *Dev. Genes Evol.* 2010. Vol. 220. P. 235–250.
66. Niepielko M.G., Ip K., Kanodia J.S., Lun D.S., Yakoby N. Evolution of BMP Signaling in *Drosophila* Oogenesis: A Receptor-Based Mechanism // *Biophys. J.* 2012. Vol. 102. P. 1722–1730.
67. Pineyro D., Blanch M., Badal M., Kosoy A., Bernues J. GAGA factor repression of transcription is a rare event but the negative regulation of *Trl* is conserved in *Drosophila* species // *Biochim Biophys Acta.* 2013. Vol. 1829. P. 1056–1065.

Поступила в редакцию 15.10.2013 г.

Авторский коллектив:

Омелина Евгения Сергеевна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории механизмов клеточной дифференцировки Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск, Россия). E-mail: omelina@bionet.nsc.ru

Коханенко Алина Андреевна – канд. биол. наук, младший научный сотрудник лаборатории эволюционной цитогенетики Научно-исследовательского института биологии и биофизики Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: alinakokhanenko@gmail.com

Tomsk State University Journal of Biology. 2014. № 1 (25). P. 132–153

Eugeniya S. Omelina¹, Alina A. Kokhanenko²

¹ *Laboratory of Cell Differentiation Mechanisms, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation. E-mail: omelina@bionet.nsc.ru*

² *Laboratory of Evolutionary Cytogenetics, Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation. E-mail: alinakokhanenko@gmail.com*

Identification of the new GAGA transcription factor target genes during *Drosophila melanogaster* oogenesis

D. melanogaster oogenesis, including dorsal appendage (DA) formation, is controlled by numerous genes and signaling pathways, e.g. EGFR, Notch, Wingless, Decapentaplegic (Dpp) pathways. Since these signaling pathways participate in the formation of many *Drosophila* organs and tissues and are evolutionary conserved, their regulation and relationships between themselves are well-studied. However, so far association of these pathways with the GAGA protein, taking part in the expression regulation of many *Drosophila* genes, has not been shown. In this paper, the association between the GAGA transcription factor and key components of the Dpp signaling pathway (*decapentaplegic* (*dpp*), *thickveins* (*tkv*), and *saxophone* (*sax*)) were studied. The *dpp* gene encodes ligand of the Dpp pathway, *tkv* and *sax* encode the type I receptors. This work was performed using combined computer-experimental approach, which included: (1) recognition of the GAGA binding sites in the regulatory regions of genes, using computational approach; (2) analysis of the genetic interaction of the *Trl* gene with the components of the Dpp signaling pathway; (3) analysis of the relative expression of the genes in the ovaries of wild type females and *Trl* mutants, using real-time PCR.

As a result, in the regulatory regions of all analyzed genes, numerous GAGA binding sites, including experimentally verified and evolutionary conserved, were found. Besides, the genetic interaction of the *Trl* gene, encoding the GAGA protein, with the

dpp, *tkv*, and *sax* genes during DA formation was demonstrated, i.e. an enhancement of the *dpp*, *tkv* and *sax* mutants, when the GAGA level was reduced. DAs of the eggs laid by the flies carrying both mutations on the *Trl* gene and *dpp/ tkv/ sax* gene were shortened, abnormal or had no paddles. At the same time DAs of the *Trl/+*, *dpp/+*, *tkv/+*, and *sax/+* heterozygotes didn't have significant distinctions as compared with norm. Additionally, we investigated an alteration of the relative expression of the *dpp*, *tkv* and *sax* genes in the ovaries of wild type females and *Trl³⁶²/Trl^{R85}* mutants. As a result, it was found that only *sax* expression was reduced more than two-fold as compared with wild type. In the case of other genes, expression was changed insignificantly.

Thus, in this manuscript we have shown that the GAGA transcription factor participates in the expression regulation of the *sax* gene during *D. melanogaster* oogenesis. Since the relative level of the mRNA of the *dpp* and *tkv* genes didn't change significantly when GAGA level was reduced, we suppose that GAGA can participate in the transcription regulation of the *dpp* and *tkv* genes at other stages of development/ in other *Drosophila* organs and tissues.

Key words: *Trithorax-like*; Dpp signaling pathway; oogenesis; *Drosophila*; GAGA.

Received 15, October, 2013

References

1. Berg CA. Tube formation in *Drosophila* egg chambers. *Tissue Eng. Part A*. 2008;14:1479-1488.
2. Berg CA. The *Drosophila* shell game: patterning genes and morphological change. *Trends Genet.* 2005;21:346-355.
3. Omelina ES, Baricheva EM. Main components of gene network controlling development of dorsal appendages of egg chorion in *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2012;43(3):137-147.
4. Twombly V, Blackman RK, Jin H. The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis. *Development*. 1996;122:1555-1565.
5. Zhao D, Woolner S, Bownes M. The Mirror transcription factor links signaling pathways in *Drosophila* oogenesis. *Dev Genes Evol.* 2000; 210:449-457.
6. Padgett RW, Reiss M. TGFbeta superfamily signaling: notes from the desert. *Development*. 2007;134:3565-3569.
7. Brummel T, Twombly V, Marques G, Wrana JL. et al. Characterization and relationship of dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in *Drosophila*. *Cell*. 1994;78:251-261.
8. Derynck R. TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci.* 1994;19:548-553.
9. Nellen D, Affolter M, Basler K. Receptor serine/threonine kinases implicated in the control of *Drosophila* body pattern by decapentaplegic. *Cell*. 1994;78:225-237.
10. Xie T, Finelli A, Padgett RW. The *Drosophila* saxophone gene: a serine-threonine kinase receptor of the TGF-superfamily. *Science*. 1994;263:1756-1759.
11. Letsou A, Arora K, Wrana JL. *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family. *Cell*. 1995;80:899-908.
12. Ruberte E, Marty T, Nellen D, Affolter M, Basler K. An absolute requirement for both the Type II and Type I receptors, punt and thick veins, for Dpp signaling *in vivo*. *Cell*. 1995;80:889-897.
13. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113:685-700.

14. Omelina E.S., Pavlova N.V., Ogienko A.A., Baricheva E.M. The GAGA protein is essential for dorsal appendage formation during *Drosophila melanogaster* oogenesis. Dokl Biochem Biophys. 2011. Vol. 436. PP. 32-34. [Omelina ES, Pavlova NV, Ogienko AA, Baricheva EM. The GAGA protein is essential for dorsal appendage formation during *Drosophila melanogaster* oogenesis. Dokl Biochem Biophys. 2011;436:32-34.] In Russian, English summary
15. Farkas G, Leibovitch BA, Elgin SC. Chromatin organization and transcriptional control of gene expression in *Drosophila*. *Gene*. 2000;253:117-136.
16. Lee H, Kraus KW, Wolfner MF, Lis JT. DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of hsp70. *Genes & Development*. 1992;6:284-295.
17. Nakayama T, Nishioka K, Dong YX, Shimojima T, Hirose S. *Drosophila* GAGA factor directs histone H3.3 replacement that prevents the heterochromatin spreading. *Genes Dev*. 2007;21:552-561.
18. Okada M, Hirose S. Chromatin remodeling mediated by *Drosophila* GAGA factor and ISWI activates fushi tarazu gene transcription *in vitro*. *Mol Cell Biol*. 1998;18:2455-2461.
19. Shopland LS, Hirayoshi K, Fernandes M, Lis JT. HSF access to heat shock elements *in vivo* depends critically on promoter architecture defined by GAGA factor, TFIID, and RNA polymerase II binding sites. *Genes Dev*. 1995;9:2756-2769.
20. Tsukiyama T, Wu C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell*. 1995;83:1011-1020.
21. Tsukiyama T, Becker PB, Wu C. ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature (London)*. 1994;367:525-532.
22. Wilkins RC, Lis JT. Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3963-3968.
23. Wilkins RC, Lis JT. DNA distortion and multimerization: novel functions of the glutamine-rich domain of GAGA factor. *J Mol Biol*. 1999; 285:515-525.
24. O'Brien T, Wilkins RC, Giardina C, Lis JT. Distribution of GAGA protein on *Drosophila* genes *in vivo*. *Genes & development*. 1995;9:1098-1110.
25. Shimojima T, Okada M, Nakayama T. et al. *Drosophila* FACT contributes to Hox gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor. *Genes & development*. 2003;17:1605-1616.
26. Lee C, Li X, Hechmer A, Eisen M et al. NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in *Drosophila*. *Mol Cell Biol*. 2008;28:3290-3300.
27. Li J, Liu Y, Rhee HS, Ghosh SKB et al. Kinetic competition between elongation rate and binding of NELF controls promoter proximal pausing. *Mol Cell*. 2013;5:711-722.
28. Fuda NJ, Lis JT. A new player in Pol II pausing. *EMBO J*. 2013;32:1796-1798.
29. Hendrix DA, Hong JW, Zeitlinger J et al. Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:7762-7767.
30. Kerrigan LA, Croston GE, Lira LM, Kadonaga JT. Sequence-specific transcriptional antirepression of the *Drosophila* Krüppel gene by the GAGA factor. *J Biol Chem*. 1991;266:574-582.
31. Berger N, Dubreucq B. Evolution goes GAGA: GAGA binding proteins across kingdoms. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819:863-868.
32. Brown JL, Mucci D, Whiteley M. et al. The *Drosophila* polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell*. 1998;1:1057-1064.
33. Espinas ML, Canudas S, Fanti L et al. The GAGA factor of *Drosophila* interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide. *EMBO Rep*. 2000;1:253-259.
34. Hagstrom K, Muller M, Schedl P. A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the Fab-7 boundary in the *Drosophila* bithorax complex. *Genetics*. 1997;146:1365-1380.

35. Hur MW, Laney JD, Jeon SH, Ali J, Biggin MD. Zeste maintains repression of Ubx transgenes: support for a new model of polycomb repression. *Development*. 2002;129:1339-1343.
36. Mahmoudi T, Zuijderduijn LM, Mohd-Sarip A, Verrijzer CP. GAGA facilitates binding of Pleiohomeotic to a chromatinized Polycomb response element. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:4147-4156.
37. Mulholland NM, King IF, Kingston RE. Regulation of polycomb group complexes by the sequence-specific DNA binding proteins Zeste and GAGA. *Genes Dev*. 2003;17:2741-2746.
38. Ringrose L, Paro R. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development*. 2007;134:223-232.
39. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. 2007;128:735-745.
40. Schwyter DH, Huang JD, Dubnicoff T, Courey AJ. The decapentaplegic core promoter region plays an integral role in the spatial control of transcription. *Mol Cell Biol*. 1995;15:3960-3968.
41. Matharu NK, Hussain T, Sankaranarayanan R, Mishra RK. Vertebrate homologue of *Drosophila* GAGA factor. *J Mol Biol*. 2010;400:434-447.
42. Kumar S. Remote homologue identification of *Drosophila* GAGA factor in mouse. *Bioinformatics*. 2011;7:29-32.
43. Bhat KM, Farkas G, Karch F, Gyurkovics H, Gausz J, Schedl P. The GAGA factor is required in the early *Drosophila* embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division. *Development*. 1996;122:1113-1124.
44. Dos-Santos N, Rubin T, Chalvet F, Gandille P, Cremazy F, Leroy J, Boissonneau E, Théodore L. *Drosophila* retinal pigment cell death is regulated in a position-dependent manner by a cell memory gene. *Int J Dev Biol*. 2008;52:21-31.
45. Ogienko AA, Karagodin DA, Fedorova SA, Fedorova EV, Lashina VV, Baricheva EM. Analysis of a novel hypomorphic mutation in trithorax-like gene affecting *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2006;37(3):173-181.
46. Ogienko AA, Karagodin DA, Pavlova NV, Fedorova SA, Voloshina MV, Baricheva EM. Molecular and genetic description of a new hypomorphic mutation of Trithorax-like gene and analysis of its effect on *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2008;39(2):108-115.
47. Tsuneizumi K, Nakayama T, Kamoshida Y. et al. Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in *Drosophila* wing development. *Nature*. 1997;389:627-631.
48. Karch F, Galloni M, Sipos L. et al. Mcp and Fab-7: molecular analysis of putative boundaries of cis-regulatory domains in the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:3138-3146.
49. Oshchepkov DY, Vityaev EE, Grigorovich DA, Ignatieva EV, Khlebodarova TM. SITE-CON: a tool for detecting conservative conformational and physicochemical properties in transcription factor binding site alignments and for site recognition. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:208-212.
50. Omelina ES, Baricheva EM, Oshchepkov DY, Merkulova TI. Analysis and recognition of the GAGA transcription factor binding sites in *Drosophila* genes. *Comput Biol Chem*. 2011;35:363-370.
51. Guild GM, Connelly PS, Shaw MK, Tilney LG. Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping. *J Cell Biol*. 1997;138:783-797.
52. Schotman H, Karhinen L, Rabouille C. Integrins mediate their unconventional, mechanical-stress-induced secretion via RhoA and PINCH in *Drosophila*. *J. Cell Sci*. 2009;122:2662-2672.
53. Bergman CM, Kreitman M. Analysis of conserved noncoding DNA in *Drosophila* reveals similar constraints in intergenic and intronic sequences. *Genome Res*. 2001;11:1335-1345.

54. Gumucio DL, Shelton DA, Bailey WJ et al. Phylogenetic footprinting reveals unexpected complexity in trans factor binding upstream from the epsilon-globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:6018-6022.
55. Hartl DL, Lozovskaya ER. Genome evolution: between the nucleosome and the chromosome. *EXS*. 1994;69:579-592.
56. Shelton DA, Stegman L, Hardison R. et al. Phylogenetic footprinting of hypersensitive site 3 of the betaglobin locus control region. *Blood*. 1997;89:3457-3469.
57. Russo CA, Takezaki N, Nei M. Molecular phylogeny and divergence times of drosophilid species. *Mol Biol Evol*. 1995;12:391-404.
58. Spencer FA, Hoffmann FM, Gelbart WM. Decapentaplegic: A gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell*. 1982;28:451-461.
59. Arora K, Nusslein-Volhard C. Altered mitotic domains reveal fate map changes in *Drosophila* embryos mutant for zygotic dorsoventral patterning genes. *Development*. 1992;114:1003-1024.
60. Wharton KA, Ray RP, Findley SD, Duncan HE, Gelbart WM. Molecular lesions associated with alleles of decapentaplegic identify residues necessary for TGF- BMP cell signaling in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1996;142:493-505.
61. de Celis JF. Expression and function of decapentaplegic and thick veins during the differentiation of the veins in the *Drosophila* wing. *Development*. 1997;124:1007-1018.
62. Horsfield J, Penton A, Secombe J et al. Decapentaplegic is required for arrest in G1 phase during *Drosophila* eye development. *Development*. 1998;125:5069-5078.
63. Penton A, Chen Y, Staehling-Hampton K. et al. Identification of two bone morphogenetic protein type I receptors in *Drosophila* and evidence that Brk25D is a decapentaplegic receptor. *Cell*. 1194;78:239-250.]
64. Singer MA, Penton A, Twombly V, Hoffmann FM, Gelbart WM. Signaling through both type I DPP receptors is required for anterior-posterior patterning of the entire *Drosophila* wing. *Development*. 1997;124:79-89.
65. Fritsch C, Lanfear R, Ray RP. Rapid evolution of a novel signalling mechanism by concerted duplication and divergence of a BMP ligand and its extracellular modulators. *Dev Genes Evol*. 2010;220:235-250.
66. Niepielko MG, Ip K, Kanodia JS, Lun DS, Yakoby N. Evolution of BMP Signaling in *Drosophila* Oogenesis: A Receptor-Based Mechanism. *Biophys J*. 2012;102:1722-1730.
67. Pineyro D, Blanch M, Badal M, Kosoy A, Bernues J. GAGA factor repression of transcription is a rare event but the negative regulation of Trl is conserved in *Drosophila* species. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829:1056-1065.