

Белок Min-like у *Drosophila virilis* и его мутантные формы: первичная структура и возможная функциональная роль

О. В. Жук, И. А. Козерецкая, А. В. Сиволоб

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
Ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина

olga_zhuk@univ.kiev.ua

*В результате анализа геномных последовательностей сделано предположение о первичной структуре продукта гена miniature-like *Drosophila virilis* – белка Min-like, подтвержденной последующим секвенированием соответствующей мРНК. Продемонстрировано, что белок является высококонсервативным для ряда насекомых, исследованы сайты, необходимые для его функционирования. Изучение экспрессии гена у взрослых самок, мутантных по аллелям ml^{l2} и ml^{G1} , выявило наличие полноразмерных транскриптов, а определение их первичной структуры позволило установить причины возникновения мутантного фенотипа.*

*Ключевые слова: *Drosophila virilis*, белки с доменом ZP, функциональные участки, материнский эффект, эволюционный консерватизм.*

Введение. Известно, что процессы развития живых организмов контролируются работой консервативных генетических систем и многие белки, участвующие в формировании тканей и органов, характеризуются эволюционным сходством у разных биологических видов.

К таким белкам принадлежит семейство белков с ZP-доменом (zona pellucida), включающее сотни внеклеточных белков с различными функциями: от рецепторов до структурных компонентов [1]. Большинство этих белков имеет общие черты в своей организации и ZP-домены в них играют идентичную роль, а именно – обеспечивают полимеризацию белковых молекул с образованием филаментов или внеклеточного матрикса [2]. У преобладающей части белков этого семейства ZP-домен, чаще расположенный ближе к С-концу, не является единственным. Все такие белки обычно содержат сайты гликозилирования, N-концевой сигнальный

пептид, трансмембранный домен, сайты узнавания протеазами. Сам же ZP-домен представляет собой участок размером около 260 аминокислотных остатков (а. о.) с восемью консервативными цистеинами [2, 3]. Домен ZP впервые обнаружен у трех белков млекопитающих (ZP1-3). Эти небольшие белки (не содержащие других доменов), являясь компонентами блестящей оболочки яйцеклетки, выполняют также рецепторную функцию, обеспечивая процесс оплодотворения [3, 4].

В геноме *D. melanogaster* кодируется как минимум 18 белков ZP-семейства. Все они характеризуются экспрессией преимущественно в эпителиальных тканях [5]. К указанному семейству относится и продукт достаточно подробно описанного гена *miniature (m)*. Известно, что белок Min является компонентом апикального матрикса эпителиальных клеток и обуславливает определенную морфологию клеток крыла взрослых особей. Мутанты по этому гену имеют уменьшенные крылья (за счет

Таблица 1

Специфические праймеры для проверки первичной структуры мРНК и установления экспрессии мРНК в мутантных линиях мух

№	Прямой праймер	Обратный праймер	Участок мРНК	Длина продукта, п. н.
1	G T A T C T T G G C T G G C T C G C G T	G C A C A T A C A C A C A A C G C G G A	23–461	439
2	C T A C A C G G C T G T G G G A C C T T	C G T G T T C T G G C A G T G A T C C A	219–1087	869
3	A C A C G G C T G C C T G G A T C A C T	T G T G T C G C C G T C G A C T C T G T	1057–1731	675
4	A T G A T G T G C C G C G T C C C G T T	A A G A G G C G C A G C G T C A T C C A	1614–2118	505

меньшего размера клеток) и характеризуются определенным деструктурированием кутикулы крыла [6, 7].

Как показано нами ранее, у одной из мутаций гомологичного гена *miniature-like* (*ml*) у *D. virilis* присутствует материнский эффект, и гомозиготные по этой мутации самки являются стерильными [8]. Участие продукта гена *miniature-like* в процессе оплодотворения позволяет предположить в нем некоторое эволюционное сходство млекопитающих и насекомых.

В работе [9] определена нуклеотидная последовательность мРНК гена *ml* *D. virilis* дикого типа, а также проанализированы предполагаемая аминокислотная последовательность соответствующего белка и гомология с белками других видов. Кроме того, нами установлены и исследованы последовательности мРНК у особей мутантных линий *ml^{f2}* и *ml^{G1}*. Обе мутации приводят к редукции крыла, но только одна из них (*ml^{G1}*) вызывает также стерильность самок. Результаты анализа демонстрируют молекулярную природу мутаций на уровне мРНК и позволяют предположить, что в обеспечении формирования крыла и фертильности самок белок Min-like выполняет не только структурную, но и регуляторную роль.

Материалы и методы. Анализ аминокислотной последовательности белка Min-like *D. virilis*. Первичная структура белка Min-like *D. virilis* предсказана на основе нуклеотидной последовательности мРНК, полученной нами ранее [9], при помощи программы FGGENESH+ 3.0 (<http://www.softberry.com/berry.phtml>). Исходя из предполагаемой первичной структуры проведен поиск гомологичных белков с использованием пакета BLASTp [10],

множественное выравнивание белков-гомологов выполнено при помощи ClustalW [11].

Функциональные участки и распределение сайтов посттрансляционных модификаций анализировали, используя программы ELM [12], Prosite [13] и TMpred [14].

Определение нуклеотидных последовательностей мРНК гена miniature-like *D. virilis*. Суммарную мРНК выделяли из куколок и имаго *D. virilis* с помощью «RNeasy Mini Kit» («Qiagen», США). Обратную транскрипцию проводили с использованием M-MuLV-обратной транскриптазы («Promega», США), праймерами служили олиго-dT. Полученную кДНК амплифицировали методом ПЦР, используя праймеры, приведенные в табл. 1. Условия реакции: общая денатурация при $t = 93$ °C (первый раунд – 3 мин, последующие – 30 с); отжиг праймеров при $t = 55–58$ °C (для разных пар праймеров) – 30 с; синтез (72 °C) – 30–60 с, последующая инкубация при $t = 72$ °C в течение 5 мин. Проведены 30 раундов ПЦР в термоциклере «Amplify-4» («Биоком», РФ). Фрагменты секвенированы с использованием PE Applied Biosystems Prism 310 Genetic Analyzer.

Результаты и обсуждение. Анализ последовательности белка Min-like *D. virilis*. Анализ нуклеотидных последовательностей генома *D. virilis* (<http://insects.eugenes.org/species/>) позволил предположить структуру гена *miniature* у этого вида дрозофилид, подтвержденную секвенированием соответствующей мРНК [9]. Предполагаемая общая протяженность гена, состоящего из семи экзонов и шести интронов, составляет 21554 п. н. (рис. 1), размер мРНК – 2218 нуклеотидов (сравнение интрон-экзонных структур генов-гомологов у *D. virilis* и *D. melanogaster* проведено ранее [9]). На

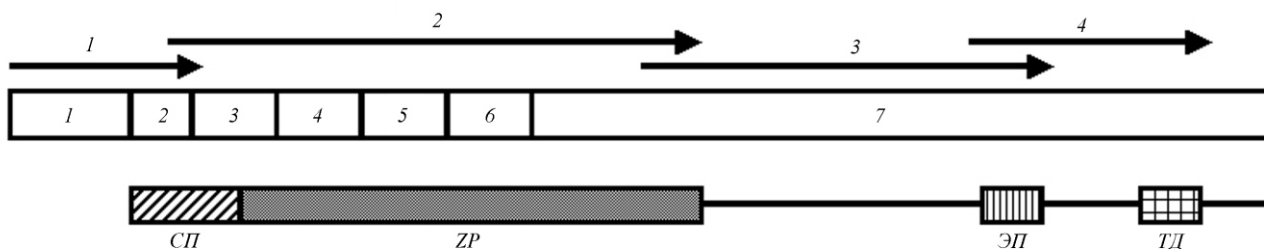


Рис. 1. Схема расположения функциональных участков в последовательности белка Min-like *Drosophila virilis* и их соответствие экзонной структуре гена: СП – сигнальный пептид; ЗР – ZP-домен; ЭП – сайт-мишень для эндопептидазы; ТД – трансмембранный домен. Экзоны обозначены пронумерованными прямоугольниками; стрелки – фрагменты мРНК, проанализированные ОТ-ПЦР

```

1  MWSPQKGPTRLNDLRFSSCFILHLMFSLVIAGNELWPMDRPDGMENIVS
51  LEVMCGKDHMDVHLTFNSPFEGIVSSKQHQHSDPRCVVVPSTGKTF SF
101  ISYSRCGTKPDLNGQFYENTVVVQYDKDLLLEVWDEAKRLRCEWFNDYEKT
151  ASKRPMMVIADLDVVIQLDFRGDNVDCWMEIQHGKGPWAPPVSGIVPLGSTL
201  TLVVAINDYRGEFDMRVKSCVASDGGSGHVINLSDEFGCVLRPKMISRF LK
251  ARAPDERATVITYAFHFAKFPDALSVHIKCKVEICRHGCLDHCQNTAAG
301  EGLGPAIGNAHERKDVHIGDAMGSSSNNDMHRDLAMPANLGHGPFQSGHN
351  GLGMGLGMGMGDHDFYEDIIHDKQTMGGGAGGGGGPDLYEKSQNL
401  QPRPVHEDPDEEADLSDFGDDLSMDGDGERYLGLKKSQKFP HNGRQL
451  EAQKRMGVPMAGPRLSEPKSELDDVPRFVYRPAEALKQTRDDHIDLDEP
501  NANSSTESTATQQTQTQTPQGSSRRRRRSLVIADRKVRSADVGVSGLYDVI
551  SEADLAFSPDSKQEAVTVPQGI SEEVVYGICMFPVPGFSLLEIIVISATI
601  VSALIAGSLLYRYQLQKEALEKQTPMPVPGTTLASWMTLRLRRLRHLQQQ
651  QQQQQQQQQQLPSATAGHETVQ
    
```

Рис. 2. Предполагаемая аминокислотная последовательность продукта гена *miniature-like* у *Drosophila virilis*. Условные обозначения: двойной линией подчеркнут сигнальный пептид; одинарной – ZP домен; черным фоном закрашен RGD мотив, жирным шрифтом выделены предполагаемые сайты узнавания эндопептидазами; жирным курсивом – вероятные сайты связывания с протеогликанами; прерывистой линией подчеркнут трансмембранный домен. Цифрами обозначены порядковые номера аминокислот в последовательности белка

основе последовательности мРНК предположена и первичная структура белка Min *D. virilis* длиной 673 а. о. (рис. 2).

Сравнение белковых последовательностей Min двух видов дрозофилид – *D. virilis* и *D. melanogaster* – с помощью ClustalW показывает, что общее сходство последовательностей составляет 83,1 % (табл. 2; рис. 3). Область 54–297 а. о. (здесь и далее указаны номера остатков в белке Min *D. virilis*), соответствующая наиболее консервативному участку белка – ZP-домену, идентична у двух белков на 100 %. Этот участок кодируется у *D. virilis* последовательностями с 3-го по 7-й экзон (третий и седьмой – частично). Хотя зоны вне ZP-домена являют-

ся менее консервативными, оба белка содержат идентичный набор функциональных участков и сайтов посттрансляционных модификаций (рис. 2). К ним относится предполагаемый трансмембранный домен (588–610 а. о.) и сигнальный пептид (1–19 а. о.). Аминокислотные последовательности обоих белков включают ряд предполагаемых сайтов для N-гликозилирования (не указаны на рис. 2), сайты связывания с глюкозаминогликанами (протеогликанами), сайты узнавания протеазами разного типа. К последним, в частности, относится мотив, расположенный между ZP-доменом и трансмембранным участком, характерный для многих белков ZP-семейства. Этот мотив узнается эндопептидазами фуринового типа и необходим для высвобождения ZP-домена во внеклеточное пространство (рис. 2).

Стоит отметить также присутствие во внеклеточной части белка мотива RGD, являющегося сайтом связывания с интегринами – рецепторами клеточной поверхности, взаимодействующими с белками внеклеточного матрикса.

При поиске белков, гомологичных белковому продукту гена *miniature-like* *D. virilis*, с помощью BLASTp обнаружен ряд белков разных видов насекомых, относящихся к надотряду *Endopterygota* (виды, имеющие в своем развитии отдельные, четко определенные стадии: яйцо, личинка, куколка, имаго). Белки с наибольшей степенью идентичности последовательностей представлены в табл. 2 и на рис. 3. Выявлено, что общая гомология этих белков и Min-like *D. virilis* составляет от 52,4 (*Apis mellifera*) до 83,1 % (*D. melanogaster*). Однако можно выделить две области с высокой степенью гомологии: во-первых, это участок ZP-домена, идентич-

Таблица 2

Уровень идентичности белков разных видов насекомых, гомологичных продукту гена *miniature-like* *Drosophila virilis*

Вид	Белок	Длина белка, а. о.	Идентичность с Min-like <i>D. virilis</i> , %	Идентичность ZP-доменов, %
<i>Drosophila melanogaster</i>	CG9369-PA	682	83,1	100
<i>Drosophila psevdooobscura</i>	GA21736-PA	780	68,4	99,2
<i>Aedes aegypti</i>	AaeL_AAEL002513	635	55,1	93,4
<i>Tribolium castaneum</i>	XP_968958	552	54,7	94,3
<i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001604946	616	52,8	93,9
<i>Apis mellifera</i>	XP_392051	601	52,4	93,4

ность которого составляет от 93,4 до 100 %. Другая область высокой гомологии находится в районе 524–618 а. о. Min-like *D. virilis*. Эта область содержит трансмембранный домен и прилежащие к нему цитоплазматический и внеклеточный участки с уровнем идентичности от 70,5 (*A. mellifera*) до 100 % (*D. melanogaster*).

Можно предположить, что данные белки-гомологи принадлежат к одной функциональной группе. Они характеризуются рядом общих черт в своей организации, а именно: близкий размер; ZP-домен, расположенный ближе к N-концу белка; трансмембранный домен; относительно длинный цитоплазматический хвост; сайты гликозилирования; сайты узнавания протеазами и мотивы связывания с протеогликанами и интегринами. Среди всех этих белков сигнальный пептид обнаружен только у *D. virilis*, *A. mellifera* и *D. melanogaster*.

Анализ экспрессии гена *miniature-like* у мутантов ml^{G1} и ml^{A2} . Построенная на основе анализа геномных последовательностей модель мРНК гена *miniature-like* *D. virilis* проверена амплификацией кДНК при помощи ОТ-ПЦР и последующим секвенированием [9]. Последовательность мРНК разделили на четыре фрагмента, к каждому из которых подобрали специфичные праймеры (рис. 1). Первый фрагмент содержит первый нетранслируемый экзон, второй и частично третий кодирующие экзоны. Второй фрагмент включает частично второй (без первых 23 нуклеотидов), 3–6 и частично седьмой экзоны, этот участок соответствует ZP-домену в белковой последовательности. Последний экзон

(седьмой) разделили на два фрагмента. Таким образом, третий фрагмент содержит последовательности-мишени для эндопептидаз, четвертый – трансмембранный домен и цитоплазматический хвост (четвертый фрагмент не включает 100 концевых нуклеотидов седьмого экзона). После ОТ-ПЦР в суммарной мРНК особей дикого типа, находящихся на стадии куколки и имаго, выявляются все четыре фрагмента, что свидетельствует об адекватности предполагаемой структуры мРНК [9].

В нашей коллекции имеются две линии, содержащие мутантные аллели гена *miniature-like* *D. virilis*. Один из этих аллелей – ml^{A2} – получен в результате дисгенных скрещиваний линии дикого типа 9 и линии 160. Второй аллель – ml^{G1} – возник спонтанно, его выделили среди особей линии *G1-spa* (линия дикого типа)[15]. Обе мутации характеризуются уменьшенным размером крыла, самки аллеля ml^{G1} (в отличие от ml^{A2}) стерильны, что связано с материнским эффектом мутации [8, 15]. Мы проанализировали мРНК особей этих двух линий с помощью ОТ-ПЦР.

В суммарной мРНК гомозиготных самок и куколок линии ml^{G1} обнаружен полноразмерный транскрипт, т. е. присутствие четырех фрагментов мРНК с ожидаемой длиной (рис. 4). Фрагменты 2–4, почти полностью перекрывающие кодирующую часть (рис. 1), амплифицировали с помощью ПЦР и секвенировали. Оказалось, что кодирующая часть ml^{G1} не содержит никаких изменений в последовательности мРНК по сравнению с диким типом. Исходя из этого можно предположить, что мутация

a	dvir	-----LMFSLVIAGNELWPMDRPDGNPNIVSLEVMCGKDHDVHILTFSNPFE	71
	dmel	-----LMFSLVIAGNELWPMDRPDGNPNIVSLEVMCGKDHDVHILTFSNPFE	71
	dpse	ETGFPFRFYWQHVCQFSLVIAGNELWPMDRPDGNPNIVSLEVMCGKDHDVHILTFSNPFE	116
	Aael	-----KITFHVASPAEINWPPERDPGNPQITALEVMCGKDHDVHILTFSNPFE	61
	trib	-----LINVVDGAGDLWPLDRPDGNPSIQSLEVMCGKDHDVHILTFSNPFE	52
	naso	-----MVGLRNARSSSDIWPLEPPEMPAIQSLEVMCGKDHDVHILTFSNPFE	48
	apis	-----MVVGLKSVGSSSDIWPLEPPEMPAIQSLEVMCGKDHDVHILTFSNPFE	62
	:	: . . . : * : * : * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	dvir	GIVSSKQHS DPRCVYVPPSTGKTFSSFRISYSRCGTPDLNGQFYENTVVVQYDKDLE	131
	dmel	GIVSSKQHS DPRCVYVPPSTGKTFSSFRISYSRCGTPDLNGQFYENTVVVQYDKDLE	131
	dpse	GIVSSKQHS DPRCVYVPPSTGKTFSSFRISYSRCGTPDLNGQFYENTVVVQYDKDLE	176
	Aael	GIVSSKQHS DPRCIYVPPSTGKTFSSFRISYSRCGTPDLNGQFYENTVVVQYDKDLE	121
	trib	GIVSSKQHS DPRCVYVPPSTGQTFSSFRISYSRCGTPDLNGQFYENTVVVQYDKDLE	112
	naso	GIVSSKQHS DPRCVYVPPSTGQTFSSFRISYSRCGTPDMHGQFYENTVVVQYDKDLE	108
	apis	GIVSSKQHS DPRCVYVPPSTGQTFSSFRISYSRCGTPDMHGQFYENTVVVQYDKDLE	122
	:	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	dvir	VWDEAKRLRCEWFNDYEKTASKPPHVIADLDVIQLDFRGDNVDCWMEIQHGKCPWAPPVS	191
	dmel	VWDEAKRLRCEWFNDYEKTASKPPHVIADLDVIQLDFRGDNVDCWMEIQHGKCPWAPPVS	191
	dpse	VWDEAKRLRCEWFNDYEKTASKPPHVIADLDVIQLDFRGDNVDCWMEIQHGKCPWAPPVS	236
	Aael	VWDEAKRLRCEWFNDYEKTASKPPHVIADLDVIQLDFRGDNVDCWMEIQHGKCPWAPPVS	181
	trib	VWDEAKRLRCEWFNDYEKTASKPPHVIADLDVQDFRGDNVDCWMEIQHGKCPWAPPVS	172
	naso	VWDEAKRLRCEWFNDYEKTASKPPHVIADLDVIQLDFRGDNVDCWMEIQHGKCPWAPPVS	168
	apis	VWDEAKRLRCEWFNDYEKTASKPPHVIADLDVIQLDFRGDNVDCWMEIQHGKCPWAPPVS	182
	:	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	dvir	GIVPLGSTLTLLVAINDYRGEFDMRVKSCVASDGSCHVINLSDFGCVL RPKMISRFLKA	251
	dmel	GIVPLGSTLTLLVAINDYRGEFDMRVKSCVASDGSCHVINLSDFGCVL RPKMISRFLKA	251
	dpse	GIVPLGSTLTLLVAINDYRGEFDMRVKSCVASDGSCHVINLSDFGCVL RPKMISRFLKA	296
	Aael	GIVPLGSTMTLLVAINDFRGEFDMRVKSCVASDGSCHVINLSDFGCVL RPKMISRFLKA	241
	trib	GIVPLGSTLTLLVAINDYRGEFDMRVKSCVASDGSCHVINLSDFGCVL RPKMISRFLKA	232
	naso	GIVPLGSTLTLLVAINDYRGEFDMRVKSCVASDGSCHVINLSDFGCVL RPKMISRFLKA	228
	apis	GIVPLGSTLTLLVAINDYRGEFDMRVKSCVASDGSCHVINLSDFGCVL RPKMISRFLKA	242
	:	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	dvir	RAPDERATVITYAF FFAFKFPDALSVHIKCKVEICRHGCLDHCQNTAA--CEG-----	302
	dmel	RAPDERATVITYAF FFAFKFPDALSVHIKCKVEICRHGCLDHCQNTGV--CGCGGCGS	309
	dpse	RAPDERATVITYAF FFAFKFPDALSVHIKCKVEICRHGCLDHCQNSGV--ACAGGEGGLC	354
	trib	RGADERASVITYAF FFAFKFPDALSVHIKCKVEICRHGCLDHCQIQPE--KCDVDS---	286
	naso	KGSDDRATVITYAF FFAFKFPDALSVHIKCKVEICRHGCLDHCQSTGSGELGHYLDQND	288
	apis	RGSDDRATVITYAF FFAFKFPDALSVHIKCKVEICRHGCLDHCQLSGS--VCHYIQERKD	300
	:	: . . * : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
b	dvir	-----SSRRRRRSLVIADRKVRSADVGVSGLYDVISEADLAFSPDSKQEAIVTFQCKISE	575
	dmel	ASNDSSKSRRRRSLVISDRKVSADVGVSGLYDVISEADLAFSPDSKQEAIVTFQCKISE	583
	dpse	EAPENPRRRRRSLVISDRKVSADVGVSGLYDVISEADLAFSPDSKQEAIVTFQCKISE	648
	Aael	---EVPKRVRRSLVIKIDRKIRSTDVGVSGLYDVISEADLAFNPDCQKQEAIVTFQCKISE	531
	trib	----RDKRRRRSLVISDRKARSADVGVSGLYDVISEADLAFSPDRABEAIVTFQGRIRE	454
	naso	EPLSSTINRRRSLVISDRKVSADVGVSGLYDVISEADLAFSPDSHAEAVTFQGRIRE	517
	apis	-PLSSPNCRRRSLVISDRKRSADVGVSGLYDVISEADLAFSPDTHAEAVTFQGRIRE	501
	:	* : * * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	dvir	EWVYGICMPVPCFSILFIVVISATIVSALVAGSLLYRYQLQKEALEKQTP-HPVPCTLAS	634
	dmel	EWVYGICMPVPCFSILFIVVISATIVSALVAGSLLYRYQLQKEALEKQTP-HPVTGTLAS	642
	dpse	EWVYGICMPVPCFSILFIVVISATIVSALVAGSLLYRYQLQKEALDKQTP-MPLSRTLSD	707
	Aael	EWVYGICMPVPCFSILFIVVISATIVSALVAGSLLYRYQLQKEALMAQAS-CVTPNHLP	590
	trib	EWVYGICMPVPCFSILFVVLVAUSAVVSALVAGSLLYRYQLQKEALAEQARNCPIMPGLFS	514
	naso	EWVYGICLPSCFSALFVVVALSAVVSALVAGSMVHRLQAQRE-LARNARKN-LPASLQA	575
	apis	EWVYGICLPMPFSALFIVVALSAVVSALVAGSMVHRLQAQRE-AADSRKNGAVHSTNG	560
	:	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

Рис. 3. Множественное выравнивание предполагаемого белка Min-like *D. virilis* и последовательностей белков-гомологов разных видов класса *Insecta* в участке ZP-домена (а) и трансмембранного домена (б). Обозначены остатки, идентичные для всех последовательностей (*), консервативные замены (:), и полуконсервативные замены (.). Серым фоном выделена область трансмембранного домена; черным – RGD мотив; жирным шрифтом – один из возможных сайтов-мишеней для протеазы. Цифрами обозначены порядковые номера аминокислот в последовательностях белков

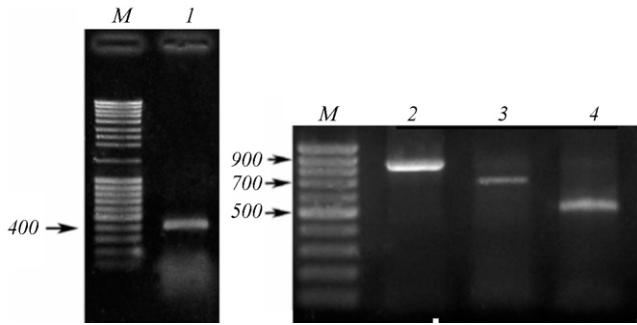


Рис. 4. Продукты ОТ-ПЦР, соответствующие отдельным участкам мРНК *miniature-like* у особей мутантной линии *ml^{d2}* *Drosophila virilis*: M – маркер длины фрагмента; 1, 2, 3, 4 – фрагменты мРНК длиной 439, 869, 675 и 505 п. н. соответственно

затрагивает регуляторные участки. Поскольку установлено, что в суммарной мРНК взрослых гомозиготных самок и куколок *ml^{G1}* присутствуют транскрипты гена *miniature-like* [9], возможной причиной наблюдаемых фенотипических проявлений может быть не отсутствие экспрессии гена, а снижение ее уровня.

В суммарной мРНК самок и куколок линии *ml^{d2}* также обнаружены четыре фрагмента мРНК с ожидаемой длиной. Второй и четвертый фрагменты были секвенированы, изменений в последовательностях не обнаружено. Результаты секвенирования третьего фрагмента показали наличие вставок: выявлены два типа транскриптов, различающиеся по длине вставки (рис. 5). В обоих случаях вставка расположена за 1193-м нуклеотидом мРНК. Однако в одном варианте она составляет 18 нуклеотидов (attgtagcatgcagaagg), в другом – 29 (attgtagcatgcagaagggcccccacaag). Обе вставки, по-видимому, имеют общее происхождение, поскольку последовательность короткой вставки идентична участку более длинной. Таким образом, линия *ml^{d2}* фактически характеризуется наличием двух мутантных аллелей с одинаковым фенотипическим проявлением.

Последствия подобных изменений в нуклеотидной последовательности для белка заключаются в следующем. Более короткая вставка (6 а. о. – CSMQKD) расположена за 333-м а. о. Она не сдвигает рамки считывания, последовательности всех участков за вставкой не содержат изменений. Более длинная вставка изменяет последовательность бел-

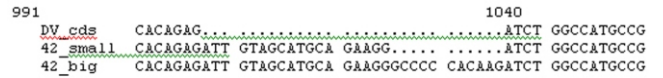


Рис. 5. Выравнивание нуклеотидных последовательностей кодирующей части мРНК *miniature-like* особей дикого типа (*DV_cds*) и мутантных по аллелю *ml^{d2}* (*42_small* – короткий вариант вставки; *42_big* – длинный вариант). Цифрами обозначены порядковые номера нуклеотидов в сравниваемых последовательностях

ка, также начиная с 334-го а. о., но приводит к появлению стоп-кодона, в результате чего длина мутантного белка составляет 433 а. о. Такой белок не содержит последовательностей трансмембранного домена белка дикого типа и соответственно последовательностей цитоплазматического участка. Однако исследованием укороченного белкового продукта с помощью программы TMpred определено, что он, вероятно, содержит другой трансмембранный домен, расположенный в участке 361–378 а. о. Поскольку описанные нарушения в структуре белка критичны для его функционирования при формировании крылового эпителия, но не приводят к нарушениям в эмбриональном развитии потомков гомозиготных самок, наличие другого трансмембранного домена может объяснять его способность выполнять одну из своих функций.

Выводы. Таким образом, проведенный нами анализ нуклеотидных и белковых последовательностей, соответствующих двум мутантным аллелям гена *miniature-like*, имеющим различное фенотипическое проявление, позволяет подтвердить высказанное ранее предположение [8] о том, что белок Min-like выполняет две отдельные функциональные роли: обеспечение формирования крыла и фертильности самок.

По нашему мнению, стерильность самок вызывает мутация, приводящая к недостаточному количеству активного белка (и соответственно ZP-домена). Однако сохранение функционального ZP-домена при нарушениях остальных участков является достаточным для обеспечения нормального эмбрионального развития. Необходимо отметить также, что появление одинакового мутантного фенотипа обусловлено как незначительным изменением в структуре белка, так и более серьезными наруше-

ниями, приводящими к образованию его делетированной формы.

Предположение о функциональной роли белка Min-like подтверждается и результатами сравнения с гомологичными белками ряда видов насекомых. В результате такого сравнения показано наличие высококонсервативных участков (в районе ZP-домена и трансмембранной области, включающей сайт узнавания эндопептидазами), которые с высокой вероятностью наиболее значимы для функционирования белков этой группы. Известно, что в процессе эволюции сохраняются именно те функциональные единицы, которые являются важными и необходимыми для роста и развития живых организмов [16]. Таким образом, подобие белковой организации исследованных гомологов также может свидетельствовать о сходстве функций, выполняемых ими в процессе развития особей.

Также стоит отметить наличие в структуре всех белков – гомологов Min-like возможных участков связывания с интегринами и протеогликанами. Известно, что интегрины – это компоненты мембраны клеток, играющие центральную роль в клеточной адгезии, миграции клеток и в контроле клеточной дифференциации, пролиферации и апоптозе [17]; протеогликаны, в свою очередь, найдены на клеточной поверхности и во внеклеточном матриксе и необходимы для клеточной коммуникации, морфогенеза и развития [18]. Способность Min-подобных белков связываться с этими молекулами предполагает, что данные белки являются не просто структурными компонентами внеклеточного матрикса, но и, вероятно, выполняют какие-то функции в регуляции определенных процессов развития.

O. W. Zhuk, I. A. Kozerecka, A. V. Sivolob

Min-like protein of *Drosophila virilis* and its mutant forms: primary structure and possible functional role

Summary

The primary structure of Min-like protein – product of miniature-like gene of *D. virilis* – was predicted by genome sequences analysis, further confirmed by the mRNA sequencing. The high conservatism of the protein in some insects was demonstrated. We analyzed the sites necessary for Min-like protein functioning. The investigation of gene expression in mutant ml^{42} and ml^{61} females showed the presence of whole-size transcripts, the

determination of their primary structure allowed us to suggest the grounds of mutant phenotype appearance.

Keywords: *Drosophila virilis*, proteins with ZP domain, functional regions, maternal effect, evolutionary conservatism.

O. B. Жук, I. A. Козерецька, А. В. Сиволоб

Білок Min-like *Drosophila virilis* і його мутантні форми: первинна структура та можлива функціональна роль

Резюме

За результатами аналізу геномних послідовностей передбачено первинну структуру продукту гена miniature-like *Drosophila virilis* – білка Min-like, підтверджену подальшим секвенуванням відповідної мРНК. Продемонстровано, що білок є висококонсервативним для ряду комах та проаналізовано сайти, необхідні для його функціонування. Дослідження експресії гена у дорослих самок, мутантних за алелями ml^{42} й ml^{61} , показало наявність повнорозмірних транскриптів, а виявлення їхньої первинної структури дозволило з'ясувати причини появи мутантного фенотипу.

Ключові слова: *Drosophila virilis*, білки з доменом ZP, функціональні ділянки, материнський ефект, еволюційний консерватизм.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Jovine L., Darie C. C., Litscher E. S., Wassarman P. M. Zona pellucida domain proteins // Annu. Rev. Biochem.– 2005.– 74.–P. 83–114.
2. Jovine L., Qi H., Williams Z., Litscher E., Wassarman P. M. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins // Nat. Cell Biol.–2002.–4, N 6.–P. 457–461.
3. Bork P., Sander C. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor // FEBS Lett.–1992.–300, N 3.–P. 237–240.
4. Wassarman P. M., Jovine L., Litscher E. S. A profile of fertilization in mammals // Nat. Cell Biol.–2001.–3, N 2.–P. 59–64.
5. Jazwinska A., Affolter M. A family of genes encoding zona pellucida (ZP) domain proteins is expressed in various epithelial tissues during *Drosophila* embryogenesis // Gene Expr. Patterns.–2004.–4, N 4.–P. 413–421.
6. DiBartolomeis S. M., Akten B., Genova G., Roberts M. A., Jackson F. R. Molecular analysis of the *Drosophila* miniature-dusky (*m-dy*) gene complex: *m-dy* mRNAs encode transmembrane proteins with similarity to *C. elegans* cuticulin // Mol. Genet. Genomics.–2002.–267, N 5.–P. 564–576.
7. Roch F., Alonso C. R., Akam M. *Drosophila* miniature and dusky encode ZP proteins required for cytoskeletal reorganization during wing morphogenesis // J. Cell Sci.–2003.–116, N 7.–P. 1199–1207.
8. Жук О. В., Козерецька И. А. Ген miniature у *Drosophila virilis*: материнський ефект і еволюційний консерватизм // Цитология и генетика.–2007.–41, № 6.–С. 50–55.
9. Жук О. В., Козерецька И. А., Сиволоб А. В. Структура гена miniature у *Drosophila virilis* // 36. наукових праць «До-

- сягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології».—Київ: Логос, 2007.—С. 221–225.
10. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res.—1997.—**25**, N 17.—P. 3389–3402.
 11. Higgins D. G., Thompson J. D., Gibson T. J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments // Meth. Enzymol.—1996.—**266**.—P. 383–402.
 12. Puntervoll P., Linding R., Gemund C., Chabanis-Davidson S., Mattingsdal M., Cameron S., Martin D. M., Ausiello G., Brannetti B., Costantini A., Ferre F., Maselli V., Via A., Cesareni G., Diella F., Superti-Furga G., Wyrwicz L., Ramu C., McGuigan C., Gudavalli R., Letunic I., Bork P., Rychlewski L., Kuster B., Helmer-Citterich M., Hunter W. N., Aasland R., Gibson T. J. ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins // Nucl. Acids Res.—2003.—**31**, N 13.—P. 3625–3630.
 13. Sigrist C. J., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors // Brief. Bioinf.—2002.—**3**, N 3.—P. 265–274.
 14. Hofmann K., Stoffel W. TMbase – A database of membrane spanning proteins segments // Biol. Chem. Hoppe-Seyler.—1993.—N 374.—P. 166–168.
 15. Zhuk O. W., Kozeretska I. A. The maternal effect and evolutionary conservatism of *miniature* gene in *Drosophila virilis* // Dros. Inf. Serv.—2005.—N 88.—P. 7–9.
 16. Bergman C. M., Pfeiffer B. D., Rincon-Limas D. E., Hoskins R. A., Gnirke A., Mungall C. J., Wang A. M., Kronmiller B., Pacleb J., Park S., Stapleton M., Wan K., George R. A., de Jong P. J., Botas J., Rubin G. M., Celniker S. E. Assessing the impact of comparative genomic sequence data on the functional annotation of the *Drosophila* genome // Genome Biol.—2002.—**3**, N 12.—P. 1–20.
 17. Dominguez-Gimenez P., Brown N. H., Martin-Bermudo M. D. Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium // J. Cell Sci.—2007.—**120**, N 6.—P. 1061–1071.
 18. Hufnagel L., Kreuger J., Cohen S. M., Shraiman B. I. On the role of glypicans in the process of morphogen gradient formation // Develop. Biol.—2006.—**300**, N 2.—P. 512–522.

УДК 575:164

Надійшла до редакції 04.12.07