

УДК 595.773.4

ПОШУК ОРТОЛОГІВ ГЕНА *BRANCHED DROSOPHILA VIRILIS*

С.В. СЕРЕДА, І.А. КОЗЕРЕЦЬКА

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Україна, 01033, Київ, вул. Володимирська 64

e-mail: sergey_sereda@mail.ru

*У роботі описано новий алель гена *Branched (B) Drosophila virilis*. Проаналізовано фенотиповий прояв, характер успадковування та локалізацію отриманого алеля. За допомогою баз даних геномних послідовностей було проведено пошук генів ортологів в геномі *D. melanogaster*. За допомогою ПЛР та гібридизації *in situ* виявлено, що ген *B D. virilis* та ген *plexus (px) D. melanogaster* є ортологами.*

*Ключові слова: *D. virilis*, *Branched*, *plexus*, розвиток крила, ПЛР, гібридизація *in situ*.*

Вступ. Розвиток крила є унікальною системою, що дозволяє вивчати процеси формування груп клітин, їхньої диференціації та регуляції активності сигнальних шляхів, які, як відомо, характеризуються еволюційним консерватизмом. Останнім часом з'явилося багато експериментальних даних що дозволяють краще зрозуміти генетичні механізми регуляції клітинного циклу, але системні взаємодії між експресією генів в клітинах та їх проліферацією лише тільки починають з'ясуватися [1]. Крило *Drosophila* — дуже зручна експериментальна модель для вивчення генетичних механізмів розвитку та росту органів. Це пояснюється простотою його будови, а також великим об'ємом даних щодо генетичних основ регуляції процесів його формування [2].

Анатомічно крило складається з жилок та міжжилкового простору. Жилки формуються з рядів клітин, що значно менші за розміром, ніж клітини міжжилкового простору, та утворюють більш пігментовану кутикулу [3]. Утворення характерного жилкування включає в себе розділення клітин диску крила на попередники жилки та міжжилкового простору, що регулюється сигнальними шляхами *Hedgehog* та *Decapentaplegic*. Ці сигнальні шляхи визначають рівень експресії декількох транскрипційних факторів, які в свою чергу відіграють роль у подальшій диференціації клітин. Далі в клітинах попередників жилки активується експресія декількох генів, членів сигнальних шляхів *EGFR* та *Notch*, що призводить до подальшої диференціації клітин попередників жилки на центральну ділянку, з якої і буде сформована жилка, та двох рядів клітин, де система *Notch* обмежує їхню проліферацію [4]. Відомо, що порушення експресії генів, які належать до цих сигнальних шляхів, призводить до порушень у нормальному розвитку жилки крила [2]. Експеримен-

тальні дані щодо процесів розвитку крила були отримані основним чином з використанням крила *D. melanogaster* як модельної системи. Про гени, які беруть участь у цих процесах у інших дрозофілід відомо ще недостатньо. Таким чином, пошук генів-ортологів, які регулюють процеси розвитку крила у різних видів дрозофіл є досить актуальним.

У *Drosophila virilis* описано мутацію *Branched (B)*, яка призводить до появи додаткового жилкування між жилками L1 та L2 в місці їх злиття [5]. Метою роботи було охарактеризувати отриманий нами новий алель *B* та провести пошук гена ортолога в геномі *D. melanogaster*.

Матеріали і методи

Новий *B-like* мутант *D. virilis* було отримано у потомстві від дисгенних схрещувань лінії 9 (дикий тип, популяція Батумі) та 160 [*broken* (2–188.0), *gap* (3–118.5), *cardinal* (4–32.2), *peach* (5–203.0), *glossy* (6–1.0)]. Мух утримували в скляних пробірках на стандартному живильному середовищі при температурі 25 °C [6]. Проводили реципроктні схрещування отриманих мутантних особин з лінією 9 та комплементарний тест з використанням 169 лінії, яка несе алель *B*⁵. Проаналізовано характер прояву *B-like* фенотипу крила не менше ніж у 100 особин потомства від кожного зі схрещувань.

Для пошуку можливих ортологів гена *B* у геномі *D. melanogaster* використовували базу геномних послідовностей DroSpeGe [7]. Для перевірки гомології гена *Branched* та його можливого ортолога *plexus* проведено *in situ* гібридизацію з використанням міченого біотином фрагмента гена *plexus D. melanogaster* з політеними хромосомами клітин слинних залоз

личинок *D. virilis*. Політенні хромосоми виділено зі слинних залоз личинок третього віку *D. virilis*, гібридизацію проводили відповідно до *by Lim et al.* [8].

Зонд для гібридизації було отримано з ПЛР продукту довжиною 500 п.о., який є фрагментом гена *plexus D. melanogaster*. Праймери для проведення ПЛР були розроблені за допомогою програмного пакету Vector 10 (Invitrogen) та мали таку нуклеотидну послідовність: DVPO1

(5'GCACGAGAGTCCACAACATT3'),
D V P O 2
(3'GCTCCTCTTCCAGCTTGATT5') та T_m=56 °C. Зонд мічений біотинильованим dUTP за допомогою нік-трансляції та візуалізувався за допомогою зв'язаної з авідином пероксидази хрому з використанням ABC Vectastain kit (Vector Lab), далі препарати фарбувалися діамінобензидином.

Результати та обговорення

Проведено комплементарний тест з використанням лінії 169, яка несе мутацію *B*⁵. В першому поколінні цього схрещування всі особини характеризувалися наявністю додаткових жилок у місці злиття L1 та L2. Отже, отримана мутація є алельною гена *B* та розташовується у 5 хромосомі. Зважаючи на результати комплементарного тесту, картування на основі рекомбінаційного тесту не проводили. Хоча реципроктні схрещування були проведені, та підтвердили, що мутація є аутосомною.

У літературі зазначається [5], що відомі мутації цього гена не в усіх схрещуваннях ведуть себе як домінантні. В результаті схрещувань лінії *B-like* з лінією 9, в першому поколінні було отримано розщеплення 1:1, внаслідок чого, як нам здається, варто було б говорити про напівдомінантність, а не

про повне домінування досліджуваної мутації.

Фенотипово нова *B-like* мутація проявлялася як поява додаткових поперечних жилок між жилками L1, L2 та на жилці C2. За ступенем прояву додаткового жилкування було виділено 4 фенотипових класи: N (додаткове жилкування відсутнє), O (одна додаткова жилка), F (декілька додаткових жилок) та M (багато додаткових жилок)(рис. 1).

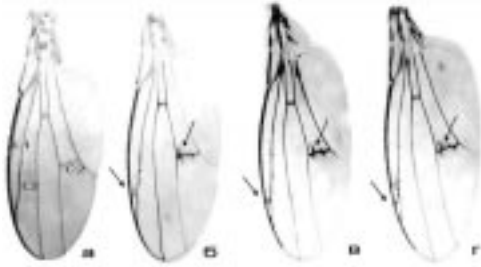


Рис. 1. Фенотип крила мутантних мух. Ступінь прояву: а – N; б – O; в – F, г – M. Порушення показані стрілками

Ці класи помітно відрізняються за частотою появи, причому найхарактернішими для чистої лінії є класи O (43%) та F (74%), а клас M майже не представлений (1%). У гетерозиготних за новою мутацією особин *D. virilis* такий характер прояву *B-like* фенотипу змінюється у бік переважання особин дикого типу N (73%), в той час як інші класи представлені з частотою 44% у випадку O, та 0% для двох інших класів.

Процеси морфогенезу крила дуже консервативні, тому не дивно, що у *D. melanogaster* описано мутацію *plexus*, яка фенотипово також проявляється як поява додаткових жилок [9]. Крім того, за літературними даними, аналіз з використанням гібридизації *in situ* показав, що ділянка 5 хромосоми *D. virilis*, де розташована описана мутація, є гомологічною ділянці 2 хромосоми *D. melanogaster*, у якій локалізована

крилова мутація *plexus* [10]. Для підтвердження того, що *B* та *px* є генами-ортологами, було проведено гібридизацію *in situ* міченого біотином фрагмента гена *plexus D. melanogaster* з препаратами політенних хромосом клітин слинних залоз личинок *D. virilis*. Виявлено, що зв'язування зонда відбувається в 5-тій хромосомі *D. virilis* в тій її ділянці, де розташований локус *B* (рис.2), таким чином *B* та *px* є генами-ортологами.

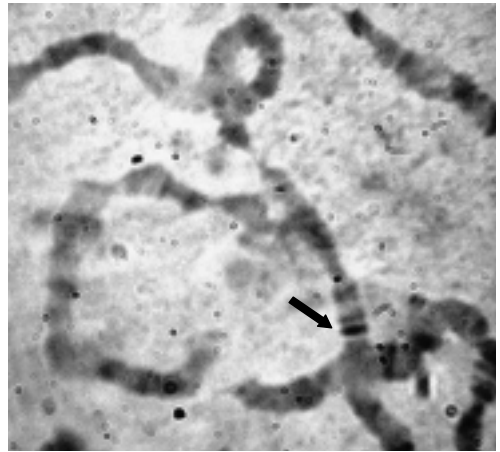


Рис 2. Результати гібридизації *in situ*. Місце зв'язування зонда позначене стрілкою

Продукт гена *plexus D. melanogaster* може регулювати транскрипцію генів, що відповідають за формування жилок та міжжилкового простору, спрямовуючи регулятори транскрипції у специфічні ділянки нуклеоплазми [9]. Можливо, що продукт гена *B D. virilis*, алейний варіант мутації якого нами було виявлено, має аналогічні функції, але це питання потребує подальших досліджень.

Висновки

Отримано та описано новий алей гена *Branched D. virilis*. Встановлено, що мутація цього алейю є напівдомінантною та локалізована в 5-ій хромо-

сомі. Описано чотири класи прояву мутантного фенотипу. Виявлено, що ген *B D. virilis* є ортологом гена *px D. melanogaster*, мутації якого мають подібний фенотип. Для визначення функцій гена *B* у *D. virilis* необхідні подальші дослідження.

Перелік літератури

1. *Albagli O, Pelczar H.* Msc and cell competition in *Drosophila*. // *Med Sci* — 2006. — Vol.22, №8–9, P.695
2. *Vaena-Lopez L. A., Garcna-Bellido A.* Control of growth and positional information by the graded vestigial expression pattern in the wing of *Drosophila melanogaster*. // *Proc Natl Acad Sci USA*. -2006– Vol.103, №37.— P. 13734.
3. *Molnar C., Lopez-Varea F., Hernandez R., de Celis J.F.* A gain-of-function screen identifying genes required for vein formation in the *Drosophila melanogaster* wing // *Genetics* -2006.- Vol.174, P.1635–1659.
4. *de Celis J.F.* Positioning and differentiation of veins in the *Drosophila* wing // *Int. J. Dev. Biol.* — 1998. — Vol. 42.— P.335–344.
5. *Gubenko I.S., Evgen'ev M.B.* Cytological and linkage maps of *Drosophila virilis* chromosomes. // *Genetica* — 1984 — Vol. 128, №2.— P. 127–139.
6. *Drosophila*. A practical approach / edited by D.B.Roberts — IRL Press, 1986 — 295 p.
7. *Gilbert D.G.* DroSpeGe: rapid access database for new *Drosophila* species genomes // *Nucleic Acids Research* — 2007 — Vol. 35, Database Issue, P.480–485
8. *Lim J.K.* In situ hybridization with biotinylated DNA // *Drosophila Inf. Service* — 1993. — Vol. 72.— P.73–77
9. *Matakatsu H., Tadokoro R., Gamo S., Hayashi S.* Repression of the wing vein development in *Drosophila* by the nuclear matrix protein Plexus // *Development* — 1999.— Vol. 126, №23.— P.5207–5216.
10. *Whiting J.H., Pilely M.D., Farmer J.L., Jeffrey D.E.* In Situ Hybridization Analysis of Chromosomal Homologies in *Drosophila*

melanogaster and *Drosophila virilis*.// *Genetics* -1989.-Vol.122, P.99–109.

Представлено С.С. Малюкою
Надійшла 30.03.2009

SEARCH FOR ORTHOLOGS OF *DROSOPHILA VIRILIS* BRANCHED GENE

S.V. Sereda, I.A. Kozeretska

Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine, Ukraine, 01033, Kyiv, Volodymyrskaya str. 64 e-mail: sergey_sereda@mail.ru

New allele of *Branched (B)* gene of *Drosophila virilis* is described. The phenotype of flies mutant for this allele was analyzed. The inheritance pattern and physical localization of the described allele were estimated. Search for orthologous genes in *D. melanogaster* genome was carried out using nucleotide sequences databases. It was demonstrated with the use of PCR and *in situ* hybridization that *B* gene of *D. virilis* is orthologous to *plexus (px)* gene of *D. melanogaster*.

Key words: *D.virilis*, *Branched*, *plexus*, wing morphogenesis, *PCR*, *in situ* hybridization.

ПОИСК ОРТОЛОГОВ ГЕНА *BRANCHED DROSOPHILA VIRILIS*

С.В. Середя, И.А. Козерецкая

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина, Украина, 01033, Киев, ул. Владимирская 64 e-mail: sergey_sereda@mail.ru

В работе описан новый аллель гена *Branched (B) Drosophila virilis*. Проанализировали фенотипическое проявление, характер наследования и локализацию полученного аллеля. С помощью баз данных геномных последовательностей проводили поиск генов ортологов в геноме *D. melanogaster*. При помощи ПЦР и гибридизации *in situ* продемонстрировали, что ген *B D. virilis* и ген *plexus (px) D. melanogaster* являются ортологами.

Ключевые слова: *D.virilis*, *Branched*, *plexus*, развитие крыла, *ПЦР*, гибридизация *in situ*.