



УДК 575.164.595.773.4

© 2009

И. С. Губенко, Р. П. Суббота,
член-корреспондент НАН Украины С. С. Малюта

Сверхпродуктивные гиперморфные регуляторные мутации генов *LIM-only* у дрозофилы и млекопитающих: регуляция процессов развития и онкогенеза

*Активність генів часто залежить від взаємодій окремих кофакторів або функціональних комплексів генів з факторами транскрипції. Мутація *Beadex* у дрозофіли спричиняє надекспресію *DLMO* білків разом із появою дуже характерних для цієї мутації фенотипів з вирізками крила. У ссавців deregulation активності *LIM*-гомеодоменів в умовах надекспресії *LMO* призводить до втрати контролю клітинної проліферації та диференціювання. Обговорюється важлива роль *LMO* в процесах розвитку та онкогенезу.*

Ген, получивший у дрозофилы название *Dlmo* [1–3], кодирует белки LIM-only (LMO) семейства. Последовательности локуса *Dlmo* у *Drosophila melanogaster* были изолированы на основе их виртуального сходства с LIM белками человека, которые считаются протоонкогенами и тесно связаны с появлением острых форм Т-клеточной лейкемии [4]. У человека и млекопитающих LMO белки локализованы в ядре и, подобно LIM-гомеодомен факторам транскрипции, играют важную роль в регуляции процессов развития и дифференцировки клеток. У *D. melanogaster* единственный *Dlmo* локус картирован генетически и путем гибридизации *in situ* в районе 17С хромосомы X. Давно известно, что в этом районе находится локус классической доминантной мутации *Beadex* (*Bx*: 1-59.4) с характерными вырезками края крыла. В непосредственной близости от *Bx* на расстоянии от него 0,0045 единиц генетической карты обнаружен локус *held up α*, и оказалось, что *Beadex* и *held up α* являются двумя взаимодействующими между собой частями единой генетической единицы [5]. Считается, что нормальной функцией *Bx* является репрессия активности *held up α*, кодирующей белок области гена *Dlmo* [1]. Молекулярный анализ показал, что наблюдаемая у гиперморфных мутантов *Bx* сверхэкспрессия локуса *Dlmo* связана с отсутствием негативного контроля транскрипции в их 3' UTR (3' untranslated region), регуляторной области гена *Dlmo* [1]. Такая нетранслируемая регуляторная зона и у дрозофилы, и у млекопитающих содержит множественные регуляторные ARE (AT-rich) элементы и Brd-подобные боксы, которые часто обнаруживаются в 3' UTR многих мРНК, кодирующих протоонкогены,

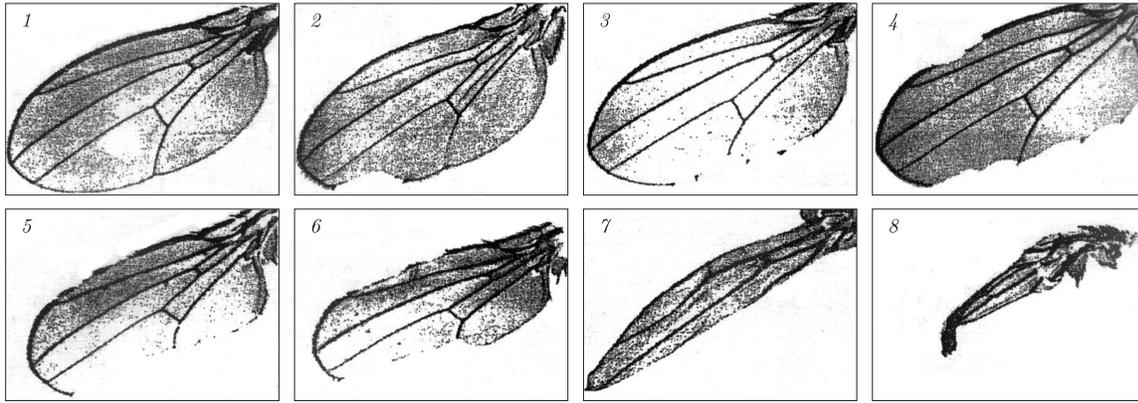


Рис. 1. Разные типы (1–8) вырезок крыла у мутантов *Beadex* [1]

факторы транскрипции, цитокины, а также присутствуют в 3' UTR многих генов, участвующих в *Notch* сигнализации [6]. Гиперморфная природа мутантов *Bx* является следствием отсутствия негативного контроля в 3' UTR гена *Dlmo*, и *Beadex* функционирует как негативный регулятор активности расположенного рядом с ним структурного гена *held up α*, кодирующего ДМО белок. Делеции, частично или полностью удаляющие локус *held up α*, являются доминантными супрессорами *Beadex* фенотипа. Таким образом, активность гена *Dlmo* зависит в первую очередь от характера нарушений локуса и особенностей взаимодействия между аллелями *Bx* и *held up α*.

Итак, *Beadex* — это гиперморфная доминантная нелетальная мутация гена *Dlmo*, фенотип которой определяется уровнем сверхэкспрессии локуса и связан с появлением характерных вырезок края крыла [1, 2].

Разнообразие фенотипов *Beadex* у *D. virilis*. Принято считать, что характер наследования признака *Beadex* отражает степень влияния на фенотип этой гиперморфной сверхпродуктивной регуляторной мутации гена *Dlmo*. Используемые в исследовании мутанты *Bx* составляют фондовую популяцию *D. virilis*, давно существующую в нашей лаборатории. Эта популяция выглядит очень неоднородной по типу вырезок крыла у отдельных особей, и нужно было выяснить, не связана ли такая неоднородность с присутствием в популяции разных аллелей *Beadex*. Поэтому нами получены несколько новых линий, родоначальниками которых были индивидуальные самцы из фондовой линии, обнаруживающие разные типы вырезок [1]. Мы использовали систему классификации типов вырезок, предложенную раньше [1] для *D. melanogaster* (рис. 1), поскольку у *D. virilis* обнаружены точно такие же типы вырезок. Для получения новых линий отдельные индивидуальные самцы — родоначальники линии (*Bx-1*, *Bx-2* и т. д.) скрещивались с самками дикого типа, и из потомства последующих скрещиваний полностью удалялись особи дикого типа. Такие “чистые” линии использовались для анализа частоты встречаемости *Bx* особей определенного типа (см. рис. 1). Согласно полученным результатам (табл. 1), мухи, обнаруживающие разные типы вырезок, закономерно присутствуют в каждой линии, но распределение типов вырезок совершенно случайное и, похоже, мало отличается от распределения вырезок у мух в фондовой линии и в линиях, родоначальниками которых были не индивидуальные самцы, а индивидуальные самки (см. табл. 1). Таким образом, распределение вырезок разных типов нестабильное, непредсказуемое, случайное и не зависит от типа вырезок у самцов-родоначальников.

Тем не менее такие выводы хорошо согласуются с представлениями о дерегуляции процессов дифференцировки клеток при сверхэкспрессии других ЛМО белков [7, 8].

ЛМО белки как адапторы, конкуренты, кофакторы и онкогены. Известные сейчас функциональные особенности белков, содержащих LIM домены, определяются их главной уникальной способностью связываться с другими белками и участвовать в разных белковых взаимодействиях [3, 7, 8]. В таких взаимодействиях могут участвовать многочисленные белки — и те, которые содержат LIM домены, и те, у которых они отсутствуют. LIM белки часто входят в состав [8–15] мультибелковых функциональных комплексов и, хотя сами непосредственно не связываются с ДНК, могут таким образом принимать участие в контроле биологической активности транскрипционных комплексов при конкуренции с другими белками-партнерами, к числу которых относятся и LIM-гомеодомен белки и их кофакторы [9–13]. Более того, специфические кофакторы могут избирательно связываться с ЛМО белками и негативно регулировать транскрипцию. ЛМО белки способны активировать транскрипцию генов-мишеней, участвовать в процессах развития и дифференцировки клеток. В определенных системах ЛМО можно использовать для изучения комбинаторной изменчивости и других биологических функций белков.

Классическим примером [3] комбинаторных генетических взаимодействий является форма участия в процессе формирования крыла у дрозофилы трех содержащих LIM домены генов: *Dlmo/Bx*, *apterous* (LIM-гомеодомен фактор транскрипции, селекторный ген, ответственный за дифференцировку дорзальных клеток поверхности крыла) и *Chip* (кофактор, функциональный гомолог NLI локусов позвоночных). Оказалось, что между ними существует явная функциональная связь, и при сверхэкспрессии гена *Dlmo* у мутантов *Beadex Dlmo* конкурирует с *apterous* за связывание с кофактором *Chip* на уровне количественных стоиоиметрических изменений, зависящих от концентраций продуктов этих трех генов [3]. Впоследствии сведения о таких конкурентных взаимодействиях этих ключевых генов развития оказались очень важными не столько для характеристики процессов формирования крыла у дрозофилы, сколько для развития представлений о возможных молекулярных механизмах онкогенной активности ЛМО белков млекопитающих и человека: возникло предположение о том, что при раках лимфоидной системы в условиях сверхэкспрессии *Lmo* гена происходит дерегуляция транскрипции, и это приводит к потере контроля клеточной пролиферации и дифференцировки Т-клеток [3]. Самым важным был вывод о том, что ЛМО белки связаны с онкогенезом, обладают онкогенной активностью.

Таблица 1. Модификации фенотипа “вырезки крыла” у мух фондовой *Bx* линии в популяциях, родоначальниками каждой из которых была единственная особь *Beadex* с вырезками определенного типа

| Родоначальники | Число анализируемых особей с фенотипом <i>Beadex</i> | | | Число мух (%), обнаруживающих <i>Bx</i> -вырезки определенного типа (рис. 1, 2–7) | | | | | |
|------------------|--|-------|-------|---|------|------|------|------|------|
| | Самки | Самцы | Всего | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Фондовая линия | 248 | 163 | 411 | 10,2 | 26 | 28,4 | 31,6 | 3,6 | — |
| 1♂- <i>Bx</i> -2 | 473 | 313 | 786 | 9 | 24,5 | 11,4 | 35,6 | 16,3 | 3,29 |
| 1♂- <i>Bx</i> -3 | 264 | 174 | 438 | 7,3 | 29,3 | 8,0 | 43,3 | 9,4 | 2,5 |
| 1♂- <i>Bx</i> -4 | 260 | 435 | 695 | 6,9 | 24,8 | 18,4 | 21,2 | 17,4 | 10,9 |
| 1♂- <i>Bx</i> -5 | 400 | 181 | 581 | 3,6 | 16,5 | 14,4 | 29,6 | 22,3 | 13,1 |
| 1♀- <i>Bx</i> -4 | 318 | 260 | 578 | 4,0 | 25,0 | 19,2 | 33,9 | 14,7 | 3,1 |
| 1♀- <i>Bx</i> -5 | 238 | 247 | 485 | 11,75 | 31,1 | 10,7 | 20,6 | 18,5 | 7,2 |

У человека и млекопитающих обнаружены четыре LMO белка. Два из них, LMO 1 и LMO 2, идентифицированы при хромосомных транслокациях у пациентов с острыми формами Т-клеточной лейкемии и считаются онкогенами [4]. LMO 1 и LMO 2 специфичны для нервных клеток и клеточных зачатков. LMO 2 входит в состав функциональных комплексов, участвующих в гематопоэзе. Совсем мало известно о природе и особенностях организации LIM 3, который был открыт как структурный гомолог LMO 1 и LMO 2. Недавно обнаруженный белок LMO 4 содержит только 50% последовательностей, гомологичных LMO 1 и LMO 2 в области LIM повторов. Поэтому LMO 4 считается самым далеким родственником LMO семейства. Ген *Lmo 4* у человека картирован в хромосоме 1 (1p 22.3), кодирует белок из 165 аминокислотных остатков и играет важную роль в патогенезе опухолей, участвуя в различных генетических взаимодействиях и в формировании функциональных комплексов. LMO 4 взаимодействует с *BRCA 1* (breast cancer 1) геном-супрессором опухоли, репрессируя транскрипционную активность *BRCA 1* в тканях груди [12]. Больше того, *Lmo 4* часто сверхреплицируется в первичных инвазивных карциномах. Так что LMO 4, так же как и LMO 1 и LMO 2, считается белком-онкогеном. В двух линиях мышей, содержащих трансген, наблюдали неоплазию у небольшого числа мышей и достаточно длительный (несколько месяцев) латентный период в развитии опухолей груди, которые возникали лишь у небольшой части особей [12].

Все настойчивее становятся попытки связать с процессами туморогенеза экспериментальные факты, свидетельствующие о возможном влиянии LMO 4 и его сверхэкспрессии на развитие опухолей, на нейрогенез, развитие центральной нервной системы, головного мозга. Так, показано [9], что при болезни Альцгеймера наиболее заметные изменения активности LMO 4 происходят в двух участках мозга, наиболее уязвимых при этой болезни.

Отсутствие конечной дифференцировки и накопление недифференцированных “незрелых” клеток — наиболее характерные последствия сверхэкспрессии *Lmo* генов. Сведения о доминантно-негативных функциях LMO могут быть успешно использованы при выяснении роли LMO в разных сигнальных путях, а также для поиска молекулярных механизмов, при помощи которых LMO функционируют при сверхэкспрессии. К сожалению, естественные мишени LMO пока неизвестны, и нужны новые методические подходы, чтобы их обнаружить.

1. *Shores M., Orgad S., Shmueli O. et al.* Overexpression *Beadex* mutations and loss of function held up-mutations in *Drosophila* affect the 3' regulatory and coding components, respectively, of the *Dlmo* gene // *Genetics*. – 1998. – **150**. – P. 283–299.
2. *Zeng C., Justice N. J., Abdelilah S. et al.* The *Drosophila* LIM-only gene *dLMO*, is mutated in *Beadex* alleles and might represent an evolutionarily conserved function in appendage development // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1998. – 95 – P. 10637–10642.
3. *Milan M., Diaz-Benjumea F. J., Cohen S. M.* *Beadex* encodes an LMO protein that regulates Apterous LIM homeodomain activity in *Drosophila* wing development // *Genes Develop.* – 1998. – **12**. – P. 2912–2920.
4. *Boehm T., Baer R., Lavenir I. et al.* The mechanism of chromosomal translocation t(11; 14) involving T-cell acceptor C delta locus on human chromosome 14q 11 and transcribed region of chromosome 11p15 // *EMBO J.* – 1988. – **7**. – P. 385–394.
5. *Lifschytz E., Green M. M.* Genetic identification of dominant overproducing mutations: the *Beadex* gene // *Mol. and Gen. Genet.* – 1979. – **171**. – P. 153–159.
6. *Lai E. C., Posakony J. W.* The *Bearded* box, a novel 3' UTR sequence motif mediates negative post transcriptional regulation of *Bearded* and Enhancer of *Split* gene expression // *Development*. – 1997. – **124**. – P. 4847–4856.
7. *Vach I.* The LIM domain: regulation by association // *Mech. Develop.* – 2000. – **91**. – P. 5–17.
8. *Губенко И. С.* Гены, кодирующие белки с LIM доменами у *Drosophila*: организация, функции, взаимодействия // *Цитология и генетика*. – 2006. – № 4. – С. 44–67.

9. *Vu D., Marin P., Walzer C. et al.* Transcription regulator LMO 4 interferes with neurogenesis in human SH-SY5 neuroblastoma cells // *Mol. Brain Res.* – 2003. – **115**. – P. 93–103.
10. *Wang N., Kudryavtseva H., Chen I. et al.* Expression of an engrailed – LMO 4 fusion protein in mammary epithelial cell inhibits mammary gland development in mice // *Oncogene.* – 2004. – **23**. – P. 1507–1513.
11. *Tsai L. F. Y., Bainton R. J., Blau J., Heberlin U.* LMO mutants reveal a novel role for circadian pacemaker neurons in cocaine-induced behaviors // *PLOS Biology.* – 2004. – **2**. – P. 2122–2132.
12. *Sum E. Y., Segara D., Duscio B. et al.* Overexpression of LMO 4 induced mammary hyperplasia, promotes cell invasion, and predictor of poor outcome in breast cancer // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2005. – **102**. – P. 7659–7664.
13. *Sum E. V. M., Peng B., Yu X. et al.* The LIM domain protein LMO 4 interacts with cofactor Chip and the tumor suppressor BRCA1 and inhibits BRCA activity // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **277**. – P. 7849–7856.
14. *Mizunuma H., Miyazawa J., Sanada K., Imai K.* The LIM only protein, LMO 4, an the LIM domain binding protein LDB 1, expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity // *Brit. J. Cancer.* – 2003. – **88**. – P. 1513–1518.
15. *Matthews J. M., Visvader J. E.* LIM domain binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins // *EMBO reports.* – 2003. – **4**, No 12. – P. 1132–11.

*Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 21.08.2008

I. S. Gubenko, R. P. Subbota, Corresponding Member of the NAS of Ukraine
S. S. Maliuta

Overproductive hypermorphic regulatory mutation of *LIM*-only genes in *Drosophila* and mammals: regulation of development and oncogenesis

*Gene regulation is, in part, determined by interactions of distinct cofactors or functional gene complexes with transcription factors. The *Beadex* mutation in *Drosophila* causes both the *Dlmo* overexpression and the wing scalloping phenotype. In mammals, a deregulation of *LIM*-homeo-domain activity by *LMO* overexpression leads to the failure in control over the cell proliferation and (or) cell differentiation. The important role of the *LMO* overexpression in development and oncogenesis is discussed.*