

УДК 575.16:595.773.4

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОМНЫХ РАЙОНОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭКСПРЕССИЮ *lawc/Trf2* В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ *D. MELANOGASTER*

© 2012 г. О. Б. Симонова¹, Е. А. Модестова², Ю. Е. Воронцова¹, Р. О. Черезов¹

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

² Институт биологии гена РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

E-mail: osimonova@hotmail.com

Поступила в редакцию 11.07.11 г.

Окончательный вариант получен 31.01.12 г.

Мутации *leg-arista-wing complex (lawc)* нарушают экспрессию белка дрозофилы, гомологичного базовому фактору транскрипции человека ТВР (TATA-box binding protein) Related Factor 2 (TRF2), специфически контролирующего развитие. Впервые проведен генетический скрининг различных областей генома с целью выявления межгенных взаимодействий *lawc/Trf2* с другими генами и геномными районами, для чего применялась коллекция линий Deficiency Kit с делециями, в сумме перекрывающими значительную часть генома. В результате генетического картирования были выявлены 26 цитологических зон, делеции которых вызывают либо гибель особей, либо модификацию мутантного фенотипа, вызванного пониженной экспрессией белка TRF2. Эти делеции можно использовать в дальнейшем для выявления как новых генов-мишеней белка TRF2, так и его позитивных или негативных регуляторов. Известно, что в процессе клеточной дифференцировки TRF2 может входить в состав высокомолекулярных комплексов, содержащих фактор, контролирующий репликацию хромосом DREF и компоненты хроматин-ремодулирующего комплекса NURF. В данной работе установлены новые генетические взаимодействия *lawc/Trf2* с рядом генов, кодирующих базовые и специфические факторы транскрипции. В подавляющем большинстве нарушение этих взаимодействий вызывает дефекты развития и гибель особей. Однако в случае с геном *e(y)1*, кодирующем фактор транскрипции *Taf9*, его взаимодействие с *lawc/Trf2* ограничено репродуктивной системой самцов. Мутантные самцы *lawc^{p1}e(y)1^{u1}* становятся стерильны из-за нарушения созревания сперматоцитов первого порядка и недостаточной премейотической конденсацией хромосом клеток полового пути.

Ключевые слова: делеция, аутосома, цитологическая карта, экспрессивность, пенетрантность, генетический скрининг, гаплонедостаточность, фактор транскрипции, сперматогенез, *Drosophila melanogaster*.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс индивидуального развития организма сопровождается активацией конкретных сигнальных путей, которые включают различные программы клеточной детерминации и дифференцировки. Для выявления эволюционно-консервативных генов-участников сигнальных путей и характеристики их специфических функций применяют генетические скрининги, выполненные на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*, которая является объектом, удобным для такого рода поиска, и широко используется для детального исследования многих иерархически консервативных механизмов. Скорость, с которой осуществляется направленный скрининг компонентов сигнальных путей при работе с дрозофилой, является одним из самых мощных преимуществ этого модельного объекта перед другими. Прин-

цип скрининга заключается в выявлении локусов, нарушение экспрессии которых специфически модифицируют определенный мутантный фенотип. При таком подходе используют восприимчивый генетический фон, который слабо выражен, но легко заметен (например, “грубоватые” глаза, небольшая вырезка крыловой пластинки). Поиск мутаций на слабовыраженном генетическом фоне позволяет обнаружить *транс-*действующие регуляторные факторы, например, гены-энхансеры, если мутация усиливает фенотипическое проявление, либо гены-супрессоры, если происходит ослабление фенотипа.

С целью выявить возможные межгенные взаимодействия скрещивают дрозофил из двух лабораторных линий, несущих мутации по разным генам. Обычно такие скрещивания проводят, предполагая, что исследуемые гены участвуют во

взаимосвязанных процессах. При этом не будут выявлены взаимодействия, о которых ничего неизвестно, или же взаимодействия с генами, мутации по которым еще не описаны или недоступны.

Другой, более масштабный, но менее точный способ поиска межгенных взаимодействий – делеционное картирование. Строго говоря, это один из старых методов, получивших новое развитие в рамках проектов по картированию генома дрозофилы. Из множества делеций составляется так называемый Deficiency Kit – минимальное количество делеций, затрагивающих наибольшую часть генома *Drosophila melanogaster*. В настоящей работе мы используем Bloomington Deficiency Kits (DF2 и DF3), по последним данным его полный набор составляют 238 линий, что соответствует от 85 до 91% полос на карте политенных хромосом.

В последнее время создана система делеционного картирования с гораздо большим разрешением, так называемые Exelixis Deficiencies (Parks et al., 2004). Геном дрозофилы насыщался инсерциями трансгенных конструкций на основе Р-элемента, включавших последовательности сайт-специфичной рекомбинации. С помощью рекомбинации между такими конструкциями можно получать делеции с четко устанавливаемыми границами (Thibault et al., 2004). Линии имеют изогенное происхождение и перекрывают чуть более 50% генома. Районы, по которым в принципе невозможно получить делеции из-за летальности гетерозиготных особей (гаплонедостаточности), минимизируются тщательным подбором изначально полученных инсерций.

Мутация *leg-aristae-wing complex (lawc^{p1})* проявляла варьирующую экспрессивность. При сильной экспрессивности мутантов характеризуют расставленные, приподнятые, обрезанные крылья; дополнительные щетинки на голове, груди и щитке; “грубоватые” глаза; более того, нарушалась сегментация ног и ариста трансформировалась в тарзус (Симонова и др., 1992; Симонова, 2000). Со временем экспрессивность мутации резко снизилась (изменения ограничиваются лишь дополнительными щетинками). Слабый фенотип послужил отличным фоном для поиска генов, мутации которых либо приводят к восстановлению утраченных признаков фенотипа *lawc*, либо становятся гаплонедостаточными летелями в комбинации с аллелем *lawc^{p1}*.

Последние исследования показали, что мутация *lawc* вызывает снижение уровня экспрессии фактора транскрипции, который гомологичен белку TRF2 человека (Копытова и др., 2005). Этот белок принадлежит семейству TBP-подобных белков, являющихся альтернативными факторами базовой транскрипции (Rabenstein et al., 1999).

Процесс транскрипции у эукариотических организмов осуществляют РНК-полимеразы. Для того чтобы РНК-полимераза связалась с промотором гена, необходимо присутствие большого числа белковых факторов транскрипции. Считается, что основным и универсальным фактором базовой транскрипции является белок TBP, связывающийся с коровой последовательностью ТАТА, входящей в состав большинства промоторов. Совсем недавно были обнаружены еще три гена, продукты которых имеют структурное сходство ДНК-связывающего домена и, как полагают, выполняют схожую функцию, проявляя при этом некоторую тканевую специфичность. Это гены *TBP related factor 1, 2 и 3 (Trf1 и Trf2, Trf3)*. Интересно, что в геноме дрожжей есть только один ген этого семейства – *Tbp*. У дрозофилы их три: *Tbp, Trf1 и Trf2*. У человека нет гена *Trf1*, но наряду с *Tbp* и *Trf2* присутствует другой гомолог – *Trf3* (Persengiev et al., 2003)

В отличие от TBP, TRF2 входит в состав высокомолекулярного комплекса (500 кДа) и следовательно, может быть ассоциирован с набором белков, которые отличаются от TBP- и TRF1-ассоциированных факторов. Были идентифицированы TRF2-содержащие комплексы дрозофилы, в состав которых входят компоненты хроматин-ремодулирующего комплекса NURF (Nucleosome Remodelling Factor), белка DREF (DNA Replication-related Element (DRE)-binding Factor), а также другие белки, которые могут взаимодействовать с хроматином (Hochheimer et al., 2002). Биохимический анализ TRF2-содержащего комплекса дрозофилы выявил некоторые TRF2-специфичные промоторы. Исследования *in vitro* показали, что DREF-содержащий TRF2-комплекс участвует в распознавании промотора гена *PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)*. Анализ экспрессии генов выявил несколько дополнительных генов-мишеней TRF2, вовлеченных в репликацию ДНК и клеточную пролиферацию, которые содержат элемент DRE (Hochheimer et al., 2002). Однако генетических экспериментов позволяющих выявлять межгенные взаимодействия с участием гена *Trf2 in vivo* не проводилось, в силу отсутствия его жизнеспособных мутаций. Единственной мутацией, нарушающей уровень экспрессии TRF2, оказалась мутация *lawc^{p1}*. В предыдущих исследованиях мы установили ряд генов X-хромосомы, мутации которых усиливают *lawc*-фенотип: *cut* (Симонова и др., 1992), *scute* (Симонова и др., 1996), *zeste* (Симонова и др., 1998). Аутосомные мутации практически не исследовались.

В данной работе проведены крупномасштабные генетические эксперименты по скринированию генома дрозофилы, с целью обнаружить другие гены, с которыми может взаимодействовать *lawc/Trf2* в различных клетках, тканях и органах в

процессе развития. В результате были выявлены 14 “летальных” цитологических зон, содержащих локусы, возможно, участвующих с геном *lawc/Trf2* в одних и тех же процессах. Кроме того, мы провели поиск взаимодействий *lawc^{p1}* с рядом мутаций генов, кодирующих основные компоненты (транскрипционные факторы, TF), участвующие в базовой транскрипции. Обнаружены генетические взаимодействия *lawc/Trf2* с генами, кодирующими субъединицы базового фактора транскрипции TF_{IIH} и ряда факторов, ассоциированных с белком TBP (TBP associated factors – TAFs).

Более того, было изучено взаимодействие *lawc/Trf2* с генами группы *enhancer of yellow (e(y)1, 2, 3)*. Гены этой группы кодируют факторы, являющиеся компонентами белковых комплексов, регулирующих эффективность транскрипционного процесса, осуществляемого РНК-полимеразой II (Soldatov et al., 1999; Georgieva et al., 2001; Shidlovskii et al., 2005). Ранее было показано, что продукты генов *Taf9/e(y)1* и *e(y)2* взаимодействуют между собой (Georgieva et al., 2001). Мы установили, что мутации этих генов на фенотип *lawc^{p1}* не влияют. Однако самцы *lawc^{p1}e(y)1^{u1}/Y*, в отличие от самцов *lawc^{p1e(y)2^{u1}/Y}*, становятся стерильными из-за нарушения дифференцировки сперматоцитов первого порядка и премеиотической конденсации хромосом. То есть, проявление комбинации мутации гена *Taf9/e(y)1* и *lawc^{p1}* тканеспецифично ограничено репродуктивной системой самцов. В отличие от первых двух комбинаций совмещение *lawc^{p1}* с мутацией третьего гена из этой группы – *e(y)3^{u1}* – вызвало гибель дрозофил, что также говорит о явных взаимодействиях продуктов этих генов в процессе развития дрозофилы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетические эксперименты. В работе использовался ряд линий и мутаций *Drosophila melanogaster*, обозначения которых даны согласно принятой символике (Lindsley, Zimm, 1992). *lawc^{p1}* – исходная линия со слабой мутацией в гене *lawc/Trf2*, вызванной инсерцией двойной копии Р-элемента в транскрибируемый, но не транслируемый 5' район гена (Симонова и др., 1992; Копытова и др., 2005). В контрольных экспериментах и для подтверждения специфичности найденных взаимодействий использовалась линия с реверсией мутации *lawc^{p1}* – *lawc^{R30}* (Петрук и др., 1998) и линии с конститутивной экспрессией белка TRF2 – *lawc^{p1}p{w+[LAWC2]}* (Воронцова и др., 2007).

Делеционные картирование проводили при помощи так называемого Deficiency Kit, составленного и поддерживаемого в Bloomington Stock Center. Deficiency Kit представляет собой набор

делечий, перекрывающий значительную часть генома дрозофилы. Набор стандартных делечий по 2 и 3 хромосомам был получен из коллекционного Центра линий дрозофилы (Блумингтон, США). Перечень использованных линий с описанием генотипов дан на сайте Bloomington Stock Center, размещенном в базе данных дрозофилы FlyBase (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df/dftop.htm>).

Самки *lawc^{p1}* скрещивались с самцами линий из Deficiency Kit, несущими делецию в одной из аутосом и гомологичную ей хромосому-балансер. Анализировались самцы F₁ *lawc^{p1}* двух генотипов: с хромосомой-балансером (определялась по соответствующим маркерным мутациям) и делецией. Отсутствие, резкое снижение жизнеспособности, фенотипические аномалии самцов с делецией интерпретировались как выявление межгенных взаимодействий *lawc/Trf2* и неизвестных генов, локализованных в области делеции. Как правило, делеции Deficiency Kit имеют значительную протяженность и включают множество изученных генов и неизвестных открытых рамок считывания. Поэтому мы повторяли эксперименты с более мелкими делециями по исследуемым районам и таким образом сужали зону летальных взаимодействий.

Для изучения взаимодействий гена *lawc/Trf2* с другими *транс*-регуляторными генами группы *enhancer of yellow* использовались линии с гипоморфными мутациями этих генов *e(y)1^{u1}*, *e(y)2^{u1}*, *e(y)3^{u1}* (Georgiev, Gerasimova, 1989; Georgiev et al., 1990). Их парные комбинации с мутацией *lawc^{p1}* были созданы с помощью генетической рекомбинации. В качестве контроля найденных взаимодействий использовалась линия *w; P{e(y)3}* с конститутивной экспрессией белка E(y)3 (Shidlovskii et al., 2005), предоставленная П.Г. Георгиевым (ИБГ РАН).

Флуоресцентное окрашивание семенников. Семенники выделяли в растворе фосфатного буфера PBS и фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 15 минут. Инкубацию с первичными моноклональными мышинными антителами к тубулину (Hybridoma Bank) проводили в течение одного часа при +25°C. Антитела к тубулину использовали в разведении 1 : 100 в буфере PBT (PBS, 0.2% Triton X-100). Вторичными козьими антителами против мыши Су2 в разведении 1 : 100 (Molecular Probes, Invitrogen) окрашивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее образцы отмывали в буфере PBS и окрашивали ДНК-специфичным красителем DAPI (1 мкг/мл). Материал переносили на предметное стекло и заключали в среду, препятствующую выгоранию (Vectashield mounting medium H-1000, Vector Laboratories). Анализ полученных

препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus CX41.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск межгенных взаимодействий при помощи делеционного картирования. Поиск взаимодействий осуществлялся только по аутосомам (2 и 3 хромосомы). Для этого мы использовали набор музейных линий (Deficiency Kit – более 200 линий), с делециями, в сумме перекрывающимися значительную часть аутосом. Анализировались самцы *lawc^{p1}/Y; Df/+*, несущие в гетерозиготе делеции (подопытный класс). Альтернативный класс самцов *lawc^{p1}/Y; Balancer/+*, (контроль) был представлен особями, не несущими делеций. Он идентифицировался по стандартным маркерным мутациям, характерным для аутосомных хромосом-балансеров. Сами по себе делеции в гетерозиготе не вызывают гибели особей или сильных фенотипических нарушений. Однако если на фоне *lawc^{p1}* в линии будут возникать морфологические аномалии или отклонения от стандартного расщепления, то можно говорить о существовании межгенных взаимодействий. Следует отметить, что мы не претендуем на обнаружение всех генов, задействованных в биохимически связанных процессах – это невозможно в силу ограниченности метода. Какие-то взаимодействия в принципе невозможно проследить, наблюдая мутации в гетерозиготном состоянии (применительно к нашим экспериментам, это означает, что отсутствие взаимодействий не указывает на их отсутствие в живом организме).

Исходно мы выявили 14 линий с делециями, которые в гетерозиготном состоянии вызывали гибель слабых *lawc*-мутантов: [21A1; 21B7-8], [24C2-8; 25C8-9], [36E4; 38A6-7], [38A6-B1; 40A3-B1], [46D7-9; 47F15-16], [48F4; 49A11], [49C1-4; 50C23-D2], [55A; 55F], [64C; 65C11], [66D6; 66E1-2], [67A2-5; 67D7-9], [75B8; 75F1], [86E2; 87C6-7], [91F1-2; 92D3-6]. Обнаружив взаимодействие слабой мутации с делецией из Deficiency Kit, для уточнения “летальных” цитологических зон мы использовали небольшие делеции. Для этого в скрещиваниях было задействовано еще 77 линий. В результате было обнаружено, что в 9 дополнительных линиях содержатся гаплонедостаточные цитологические зоны, делеции которых в гетерозиготном состоянии вызывают гибель слабых *lawc*-мутантов. Их мы использовали для уточнения границ “летальных” зон. Еще 25 линий несли доминантные модификаторы слабой мутации *lawc^{p1}*. В некоторых случаях “летальные” зоны почти полностью перекрывались более мелкими делециями с более слабым воздействием на фенотип мутантов. Очевидно, эти цитологические районы содержат сразу несколько локусов, вызывающих доминантное коммулятив-

ное воздействие на *lawc^{p1}*. Возможно также, что в этих районах локализируются супрессоры, нейтрализующие влияние сильных *lawc^{p1}*-модификаторов. Для всех случаев были поставлены контрольные эксперименты с линией, содержащей реверсию *lawc^{R30}*. Гибели особей не наблюдалось, поэтому все обнаруженные взаимодействия вызваны мутацией *lawc^{p1}*. Более того, жизнеспособность особей восстанавливалась на фоне *mis*-экспрессии изоформ белка TRF2, что доказывает участие этого белка в выявленных взаимодействиях.

Мы отметили локализацию этих делеций на цитологической карте аутосомных хромосом дрозофилы. Результаты представлены на рис. 1. Прямой толстой линией изображены участки цитологической карты, цифрами сверху обозначены соответствующие секции, а буквами ниже их подсекции. Расположенные ниже отрезки соответствуют данным о размерах исследованных делеций, неточно картированные области отмечены пунктирной линией. За символом # над каждым отрезком следует номер линии из Bloomington Stock Center. Под обозначением делеции знак ☺ обозначает жизнеспособность при совмещении с мутацией по *lawc*, ☹ – гибель, в случае сильных нарушений приведен их фенотип. Если линия не обозначена на карте, значит, взаимодействия не обнаружены, самцы с делецией и мутацией *lawc^{p1}* выживают и не имеют видимых нарушений. Цитологические области [22B2-3; 24A1], [28C; 29B11], [44F10; 46A1], [51B7; 51D2], [52F5; 54B17], [56F16; 57B3], [62A9; 64A11], [69B3; 71C1], [79E9; 83B] не тестировались в силу отсутствия доступных делеций этих районов.

Проанализировав результаты делеционного картирования, мы выявили 22 более мелких цитологических района, где расположены различной силы доминантные энхансеры фенотипа *lawc^{p1}*, из них 12 вызывали гибель особей, остальные усиливали фенотипическое проявление мутантов. Также было выявлено 4 района, содержащих вероятные супрессоры, снимающие эффекты энхансеров *lawc^p* (Табл. 1, рис. 2).

Разумеется, ген *lawc/Trf2* не может “взаимодействовать” с протяженным участком хромосом длиной в несколько секций. Речь идет о взаимодействии продуктов двух или более генов, и поиск отдельных генов логично должен быть нашей следующей задачей.

Был проведен скрининг генов, попадающих в картированные области летальных взаимодействий, в базе данных <http://flybase.bio.indiana.edu>. Среди известных генов, локализованных в этих районах много факторов как базовой, так и специфической транскрипции, а также генов, участвующих в компактизации хроматина и правильном расхождении хромосом при митозе и мейозе.

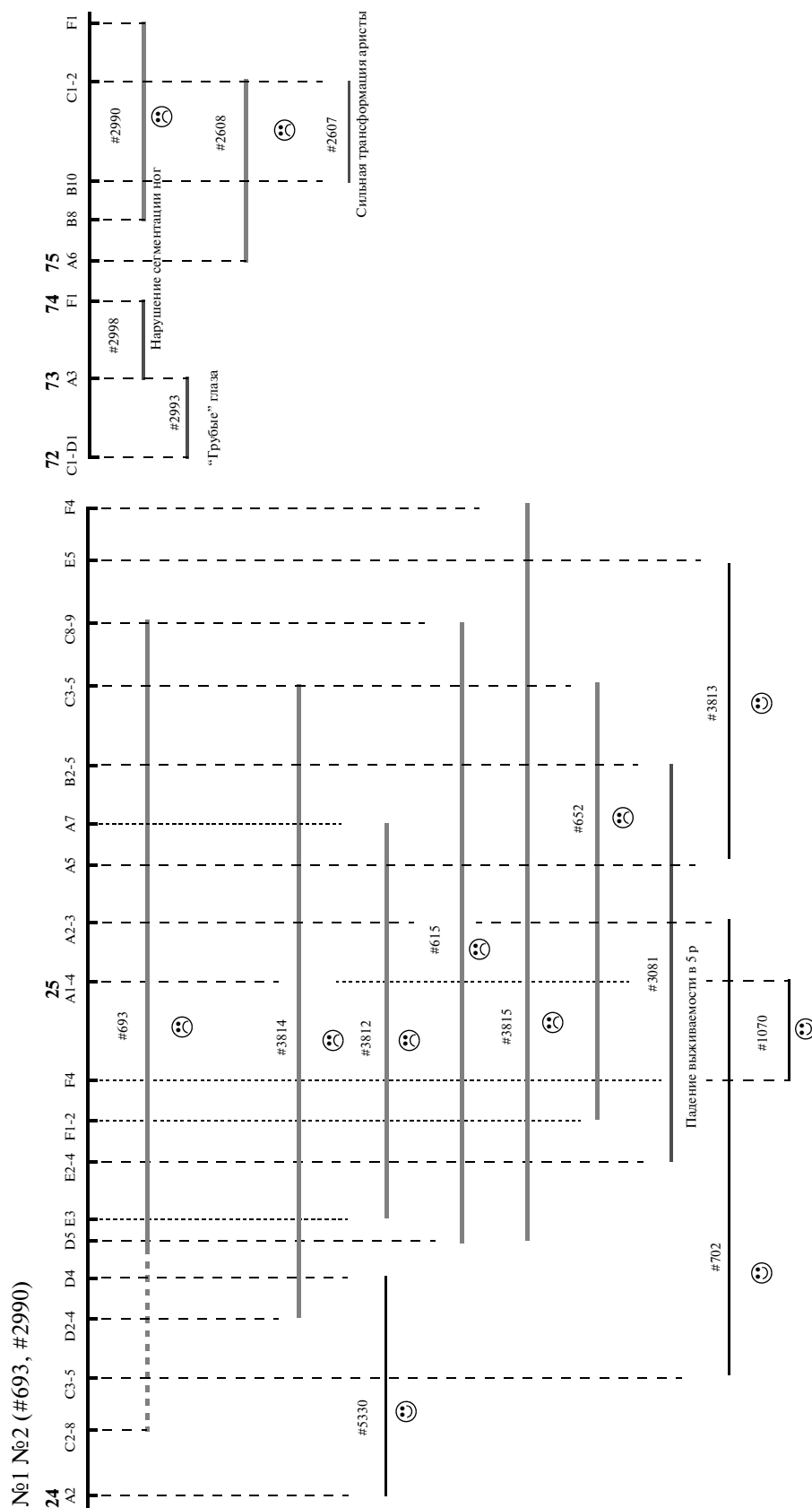


Рис. 1. Цитологическое картирование районов, которые в гетерозиготном состоянии модифицируют фенотип *lawe^{pl}*. Объяснения в тексте.

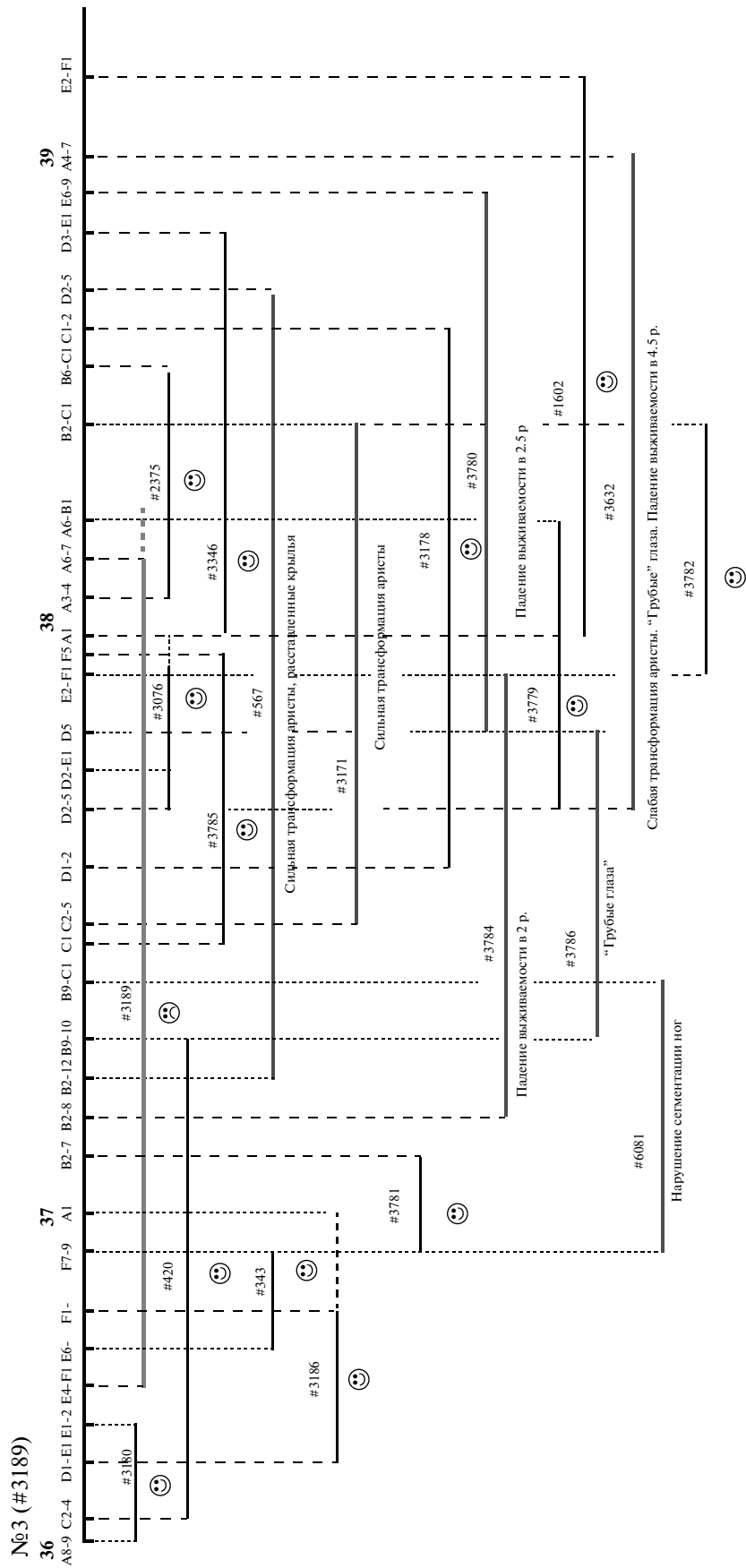


Рис. 1. Продолжение.

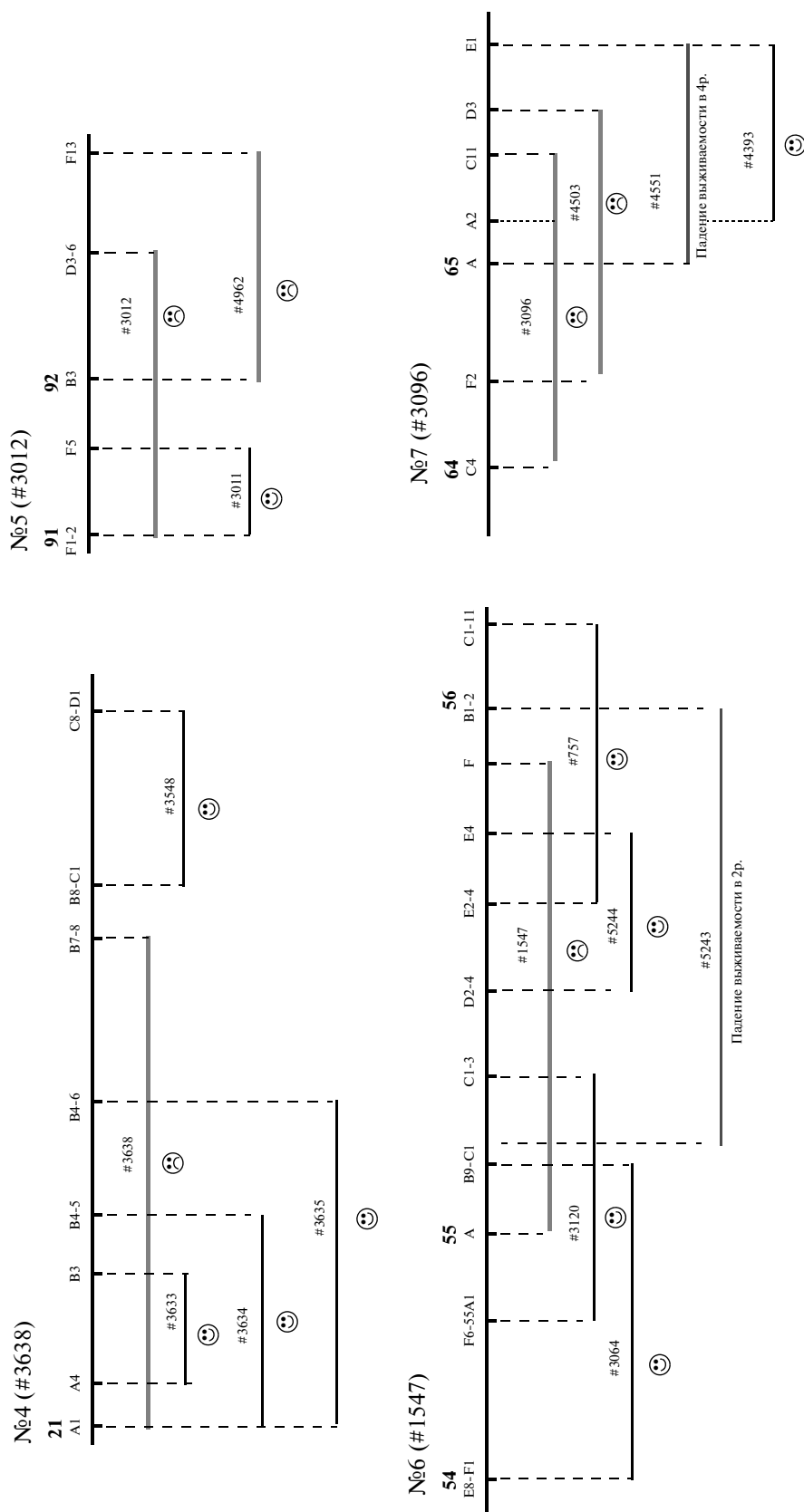


Рис. 1. Продолжение.

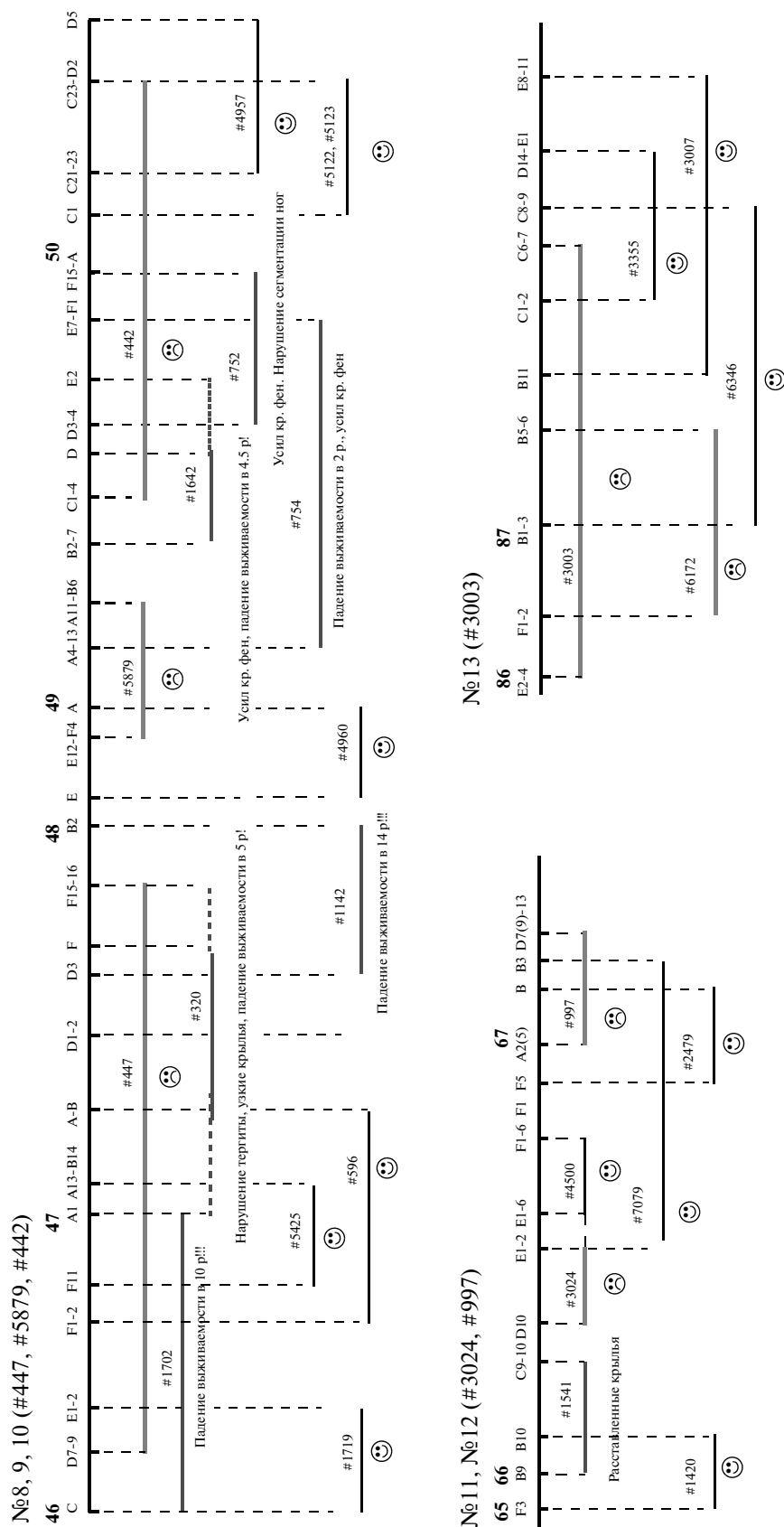


Рис. 1. Продолжение.

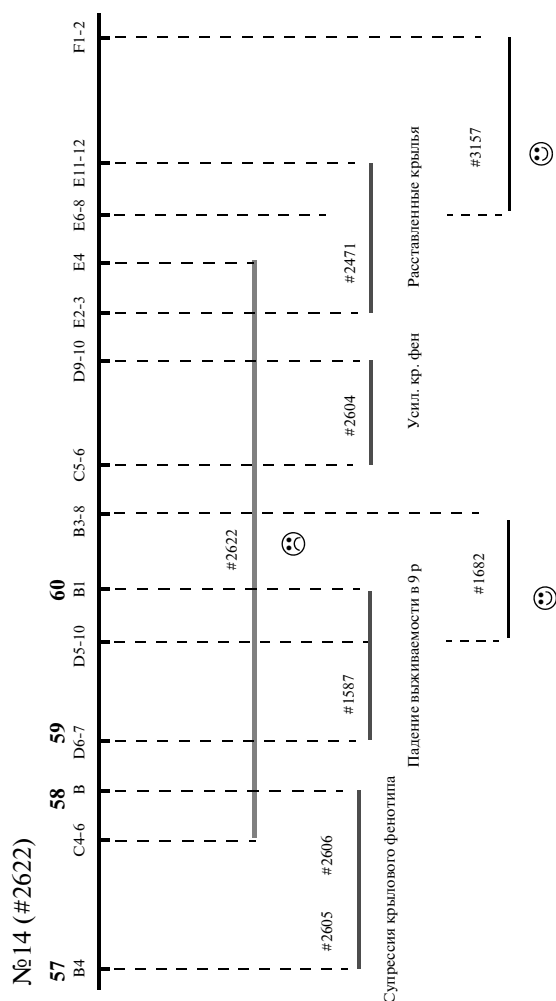


Рис. 1. Окончание.

Мы сочли наглядным вынести эти данные в табл. 2. По многим генам сейчас нет доступных мутаций в мировой коллекции, но мы рассматриваем всех их как первоочередных кандидатов на поиск взаимодействий.

Сходным образом в ряде случаев мы искали взаимодействия с мутациями по отдельным ге-

нам. Так как среди генов, локализованных в “летальных” зонах, было много транскрипционных факторов, мы провели подобный эксперимент с рядом мелких делеций и мутаций в генах, кодирующих транскрипционные факторы TF_{II} , участвующие в базовой транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II. Тестировались $TF_{II}B$, $TF_{II}E$, $TF_{II}H$, *TATA-box binding protein (TBP)*, а также группа генов семейства *TBP associated factor (Taf)*, табл. 3). Так как в настоящее время белки *TAF* обозначаются по новой унифицированной системе, чтобы не возникло путаницы, мы приводим таблицу новых и старых обозначений (табл. 4). Анализ взаимодействия *lawc^{p1}* и существующих мутаций/делеций ряда генов, кодирующих факторы базовой транскрипции, показал, что в одних случаях происходит сильное взаимоусиление фенотипических признаков, даже приводящее к летальности компаундов (компоненты комплекса $TF_{II}H$ и ряд генов семейства *taf*: *taf_{II}30\alpha*, *taf_{II}40/e(y)1*, *taf_{II}60*, *taf_{II}110*, *taf_{II}150*). В случае *TBP* [57B7-10] происходит супрессия мутантного фенотипического проявления *lawc^{p1}*, а в остальных случаях никаких взаимодействий не наблюдалось. Данные суммированы в сводной таблице 5.

Таким образом, взаимоусиление фенотипических мутантных признаков является надежной гарантией того, что эти гены совместно участвуют в регуляции транскрипции. Тот факт, что взаимоусиление проявляется не со всеми компонентами, входящими в состав базовой транскрипционной машины, говорит о том, что это участие, по видимому, ограничивается определенным набором белок-белковых взаимодействий.

Для изучения взаимодействия гена *lawc* с *транс*-регуляторными факторами транскрипции группы *enhancer of yellow (Taf9/e(y)1, e(y)2, e(y)3)* при помощи кроссинговера были созданы генетические компаунды, содержащие комбинации жизнеспособных мутаций этих генов с мутацией *lawc^{p1}*. Оказалось, что совмещение мутаций по этим генам приводит либо к гибели (*e(y)3*), либо к нарушению фертильности полученных компаундов в сочетании со взаимоусилением мутантных

Таблица 1. Делеции цитологических районов II и III хромосом, которые в гетерозиготном состоянии модифицируют фенотип *lawc^{p1}*

Энхансеры				Возможные супрессоры
Сильные		Слабые		
[21B6-7; 21B7-8]	[64F2; 65A2]	[24D5; 24E2-4]	[59D6-7; 59D5-10]	[25A5; 25B2-5]
[25A2-3; 25A5]	[66D10; 66E1-2]	[25B2-5; 25C3-5]	[60C5-6; 60D9-10]	[55F; 56B1-2]
[37B9-10; 37C1]	[67B3 67D7-13]	[46E1-2; 46F1-2]	[60E2-3; 60E4]	[57B4; 58B]
[49A; 49A4-13]	[75B8; 75B10]	[47D1-2; 47D3]	[66B10; 66C9-10]	[65D3-65E1]
[49F15; 50C1]	[86F1-2; 87B1-3]	[49B2-7; 49E2]	[72C1-D1; 74F1]	
[55C1; 55D2-4]	[92B3; 92D3-6]			

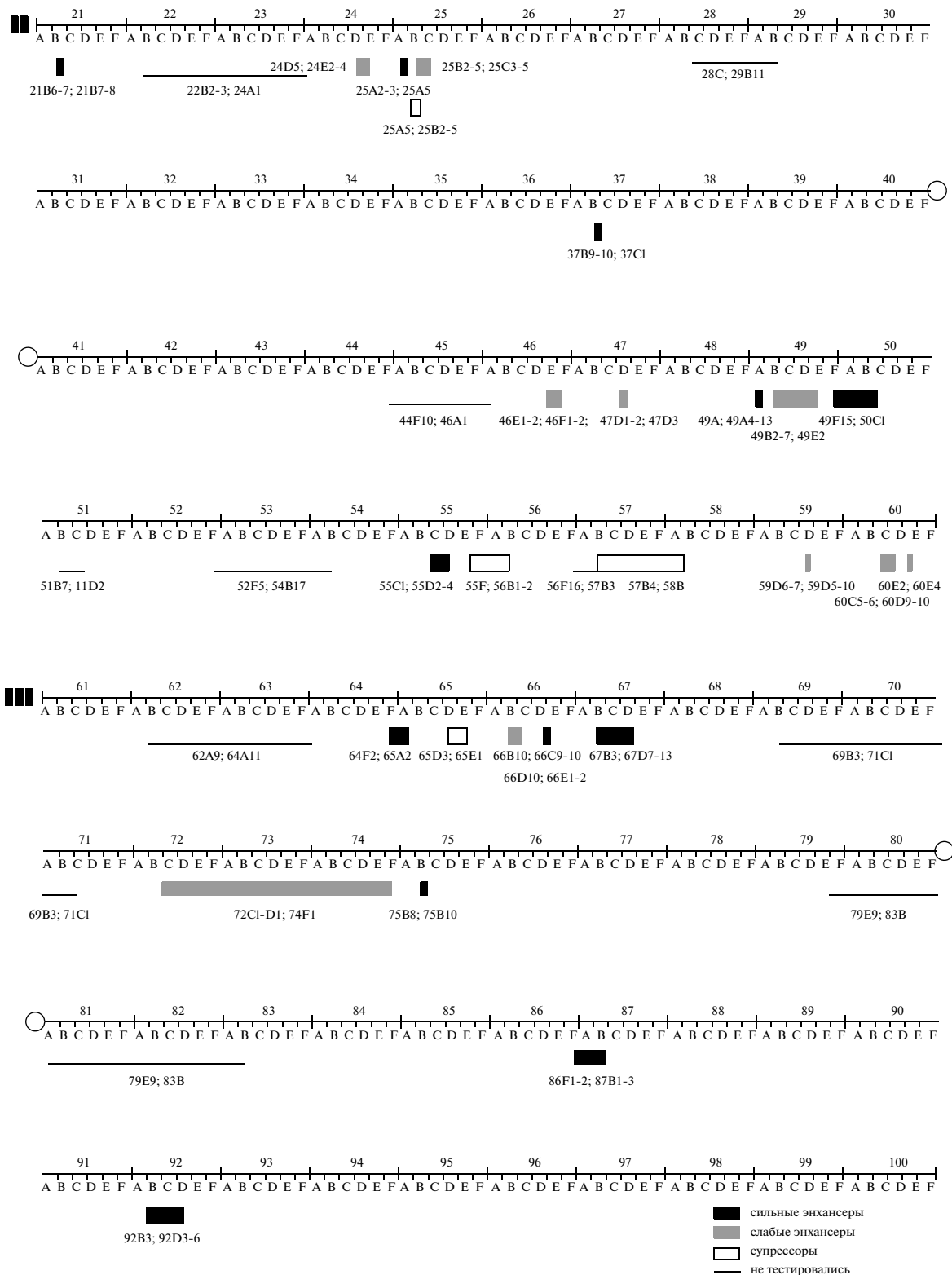


Рис. 2. Суммарный результат делеционного картирования. Цифрами обозначены секции, а буквами – подсекции II и III политенной хромосомы слюнных желез. Центромеры обозначены неокрашенными кружками. Прямоугольниками обозначены районы, модифицирующие *lawe^{D1}*-фенотип: черными прямоугольниками обозначены сильные энхансеры, серыми – слабые энхансеры, белыми – супрессоры. Тонкими линиями обозначены районы, которые не тестировались в нашем эксперименте.

Таблица 2. Классификация расположенных в “летальных” зонах генов, которые могут взаимодействовать с *lawc/Trf2*

Базовые факторы комплекса РНК-полимеразы II	Специфические факторы транскрипции/локализация	Факторы, участвующие в компактизации хроматина	Гены митоза
<i>MAT</i> (TF _{IIH})	<i>net/21B1</i>	<i>MTF-1 Metal regulatory transcription factor 1</i> – специфический фактор транскрипции (комплекс РНК-полимеразы II)/67B5-67B6	<i>Top2 (Topoisomerase 2)</i>
<i>Ss11</i> (TF _{IIH})	<i>bsh (brain-specific homeobox)/3&A3</i>	<i>Top3alpha (Topoisomerase 3alpha)</i>	<i>Vls (valois)</i>
<i>Tfb4</i> (TF _{IIH})	<i>E2f2 (E2F transcription factor 2)/39A5</i>	<i>spir (spire)</i> /организация и биогенез актиновых компонентов цитоскелета	<i>barr/конденсация хромосом</i>
<i>Tfb2</i> (TF _{IIH})	<i>Mio (Mlx interactor)/39C1-39C2</i>	<i>dia (diaphanous)</i> /организация актиновых компонентов цитоскелета	<i>CG2508/анафаза митоза</i>
<i>Hay</i> (TF _{IIH})	<i>crc (cryptocephal)/39C2-39C3</i>	<i>Df31 (Decondensation factor 31)</i> /ремоделирование хроматина	<i>cnn/сборка веретена деления</i>
<i>Taf60 (TBP-associated factor 60kD) – TF_{IID}</i>	<i>dimm (dimmed)/39D1</i>		<i>Sse (Separase)/протеиназа, основной белок, контролирующей расхождение хромосом</i>
<i>Taf150 (TBP-associated factor 150kD) – TF_{IID}</i>	<i>Bin (biniou)/65D6</i>		<i>CG17498/чек-пойнт митотического веретена деления</i>
<i>Taf110 (TBP-associated factor 110kD) – TF_{IID}</i>	<i>Jra (Jun-related antigen)/46E4-46E5</i>		<i>Vj1/конденсация митотических хромосом</i>
<i>Taf30α (TBP-associated factor 30kD) – TF_{IID}</i>	<i>vis (vismay)/49A10</i>		<i>eIF-4E</i>
<i>e(y)1/Taf40 (TBP-associated factor 40kD) – TF_{IID}</i>	<i>achi (achintya)/49A10</i>		<i>Gap1</i>
<i>Taf12L/Taf30-2 (TBP-associated factor 30kD subunit-2) – TF_{IID}</i>	<i>bic (bicaudal)/49D6</i>		
<i>Taf18 (TBP-associated factor 18kD) – TF_{IID}</i>	<i>MTF-1 (Metal regulatory transcription factor 1)/67B5-67B6</i> <i>lolal (lola like)/55B9</i> <i>tsh (teashirt)/40A5</i>		

признаков (*Taf9/e(y)1*). Мутация *e(y)2* не повлияла на фенотип *lawc^{p1}*.

Нарушения в репродуктивной системе самцов *lawc^{p1}e(y)1^{u1}/Y*. У самцов герминативная и две соматические стволовые клетки одновременно делятся. В результате деления каждой стволовой клетки одна дочерняя клетка сохраняет свою функцию, а одна дифференцируется (рис. 3). Дифференцирующиеся соматические клетки, цистобласты, больше не делятся, а клетки полового пути, гониобласты, претерпевают 4 митотических деления с неполным цитокинезом, образуя 16-клеточную сперматоцисту. Каждая из 16 клеток в результате мейоза формирует 4 сперматозоида. Таким образом, из каждого гониобласта в норме образуется 64 сперматозоида.

Морфологический анализ репродуктивной системы мутантных самцов *lawc^{p1}e(y)1^{u1}/Y* показал, что их стерильность вызвана нарушением дифференцировки герминативных клеток на стадии сперматоцитов I порядка (перед первым мейотическим делением). Хроматин у самцов *lawc^{p1}e(y)1/Y* декомпактизован, хромосомы разбросаны по периферии клетки. В результате стадия сперматоцита первого порядка затягивается, мейотические формы практически отсутствуют. На рис. 4 представлена иллюстрация возникающих аномалий, сперматоциты отличаются от нормы более размытым окрашиванием хроматина.

В ряде случаев происходит нарушение расхождения хромосом, при котором формируются полиплоидные клетки. На рис. 3 в рамке внизу видно аномальное деление клетки, в результате кото-

Таблица 3. Взаимодействие *lawc^{p1}* с мутациями и/или делециями генов, кодирующих субъединицы базовых факторов транскрипции РНК-полимеразы II (TF_{II}) и TBP-ассоциированных факторов (TAFs)

Ген [локализация]	Df номер линии	Самки	Подопытные самцы	Контрольные самцы	Фенотип компаундов
TF_{II}H					
<i>SsII</i> [79F5-6]	79F; 80A #4370	271	73	48	Аномалия тергитов, микрохет и всего DC-кластера щетинок.
<i>MAT1</i> [47B7-10]	46D7-9; 47F15-16 #447	310	0	126	† (Компаунды не живут)
<i>Tfβ4</i> [21E3-4]	21D1-2; 22B2-3 #3084	327	74	98	Слегка “грубоватые” глаза, слабое усиление трансформации аристы.
<i>Tfβ2</i> [71D3-E1]	71C; 71F #2992	177	26	23	Слабое усиление, “грубые” глаза.
	71F1-4; 72D1-10 #3640	156	32	65	Недоразвитие ног у 50% компаундов.
<i>hay</i> [67E3-4]	67E1-2; 68C1-2 #89	126	39	21	Сильная трансформация аристы с высокой пенетрантностью.
TF_{II}E					
<i>TF_{II}Eα</i> [68C12-13]	68B1-3; 68F3-6 #2610	94	24	26	Нет взаимодействий.
	68C8-11; 69B4-5 #2612	59	19	15	Нет взаимодействий.
	68A2-3; 69A1-3 #264	60	18	22	Нет взаимодействий.
<i>TF_{II}Eβ</i> [64B5-6]	63E1-2; 64B17 #3687	67	18	20	Нет взаимодействий.
	63F4-7; 64C13-15 #3686	103	10	12	Нет взаимодействий.
TF_{II}B					
<i>TF_{II}B</i> [31E1-2]	31C-D; 32D-E #1469	272	54	54	Нет взаимодействий.
	31B; 32A #3366	158	44	19	Нет взаимодействий.
TF_{II}D					
<i>TBP (TATA-binding protein)</i> [57B7-10]	57B4; 58B #2605	166	22	25	Супрессия крылового фенотипа.
	57B4; 58B #2606	328	51	72	Супрессия крылового фенотипа.

Таблица 3. Окончание

Ген [локализация]	Df номер линии	Самки	Подопытные самцы	Контрольные самцы	Фенотип компаундов
Tafs (TBP-associated factors)					
Taf60 [76B9-11]	Taf60¹	491	0	105	† (Компаунды не живут)
	76B1-2; 76D5 #3617	402	37	102	Ноги-культы, много эктопических щетинок. Снижение выживаемости в 2.8 раза
Taf150 [67C3-4]	67A2(67A5); 67D7-13 (67D9-13); #997	146	0	56	† (Компаунды не живут)
Taf110 [72D5-7]	72C1-D1; 73A3-4 #2993	273	37	27	Очень сильная трансформация аристы.
	Taf110¹	210	130	80	Нет взаимодействий.
Taf230 [84A2]	84A1-2; 84A4-5 #2172	266	60	54	Нет взаимодействий.
	Taf230¹ #5300	226	52	41	Нет взаимодействий.
	84A1-2; 84B1-2 #1884	62	27	30	Нет взаимодействий.
Taf30α [86E20-F1]	86E2-3; 87C6-7 #3003	17	0	16	† (Компаунды не живут)
	86E3; 87A9 #5916	134	17	14	Нет взаимодействий.
	86C13; 87B1-5 #3128	151	68	71	Нет взаимодействий.
Taf30β [30D1]	30C1-2; 30F #556	491	158	130	Нет взаимодействий.
Taf24, Taf16 [23B1]	23A6; 23B1 #3910	118	56	41	Нет взаимодействий.
	23C1; 23E1-2 #1567	130	40	37	Нет взаимодействий.
	22F3-4; 23C3-5 #90	97	23	42	Нет взаимодействий.

Примечание: во второй графе жирным шрифтом отмечены районы локализации делеций, совпадающие с районом локализации соответствующего транскрипционного фактора.

Таблица 4. Новая и старая номенклатура генов семейства *Taf*, используемых в нашей работе

Новое название	Старое название
TAF1	TAFII230
TAF2	TAFII150
TAF4	TAFII110
TAF6	TAFII60
TAF9	TAFII40
TAF10	TAFII24
TAF10b	TAFII16
TAF11	TAFII30 beta
TAF12	TAFII30 alpha

рого весь хроматин сосредотачивается только в одной из дочерних клеток. Вероятно, нарушение конденсации хроматина вызывает его аномальную сегрегацию из-за невозможности прикрепления нитей веретена деления к центромерам. Это приводит к гибели клеток и дефициту сперматозоидов у мутантных самцов *lawc^{p1}e(y) I^{u1}/Y*.

У самцов дикого типа семенные пузырьки наполнены спермой. У мутантных самцов зрелая сперма практически отсутствует, семенной пузырек спавшийся (рис. 4). Перед тем как разделиться, сперматозоиды у самцов дикого типа упакованы плотными, ярко окрашивающимися “пачками”. У мутантных особей таких конгломератов

Таблица 5. Взаимодействие *lawc^{p1}* с мутациями и/или делециями ряда основных транскрипционных факторов РНК-полимеразы II. Подчеркнуты локусы, мутации в которых приводят к летальному исходу на фоне *lawc^{p1}*

Сильные взаимодействия	Нет взаимодействий
<i>TF_{II}H</i> (<i>Ssl1</i> , <u><i>MAT1</i></u> , <i>Tfb4</i> , <i>Tfb2</i> , <i>hay</i>) <u><i>e(y)3</i></u>	<i>TF_{II}E</i> (<i>TF_{II}Eα</i> , <i>TF_{II}Eβ</i>) <i>TF_{II}B</i> <i>TF_{II}D</i> (<i>TBP</i> (<i>TATA-binding protein</i>))
<i>Tafs</i> (<i>TBP-associated factors</i>):	
<u><i>Taf60</i></u> , <u><i>Taf150</i></u> , <i>Taf110</i> , <u><i>Taf30α</i></u> , <u><i>e(y)1/Taf40</i></u>	<i>Taf250</i> , <i>Taf30</i> , <i>Taf24</i> , <i>Taf16</i>

нет, возможно, это следствие не только редкого вступления в мейоз, но и гибели части клеток.

Таким образом, совмещение мутаций *lawc^{p1}* и *e(y)1^{u1}* приводит к узко специфическому нарушению – самцовой стерильности, возникающей из-за отсутствия дифференцировки половых клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

Целью работы было выявление “летальных” цитологических районов, в которых расположены локусы, имеющие общую с геном *lawc/Trf2* функциональную нагрузку. Для этого мы провели скрининг генома дрозофилы с использованием слабой мутации *lawc^{p1}* и набора музейных линий (deficiency kit) с делециями, в сумме перекрывающими весь геном за исключением X-хромосомы. Были выявлены 14 “летальных” цитологических зон, содержащих либо возможные гены-мишени белка TRF2, либо его позитивные регуляторы.

Важно, что иногда при уточнении “летальных” цитологических зон они могли распадаться на несколько зон с пониженной жизнеспособностью и морфологическими аномалиями у компаундных особей. Например, в секциях 36–40, где локализованы две соседствующие делеции, ряд более мелких делеций вызывает у мутантных по *lawc* особей снижение жизнеспособности, аномалии в развитии ног и фасеток глаза, а также характерные для сильных *lawc*-мутаций вырезки крыловой пластинки. Возможно, гибель особей при постановке опыта с большими делециями объясняется наличием сразу нескольких взаимодействий. В

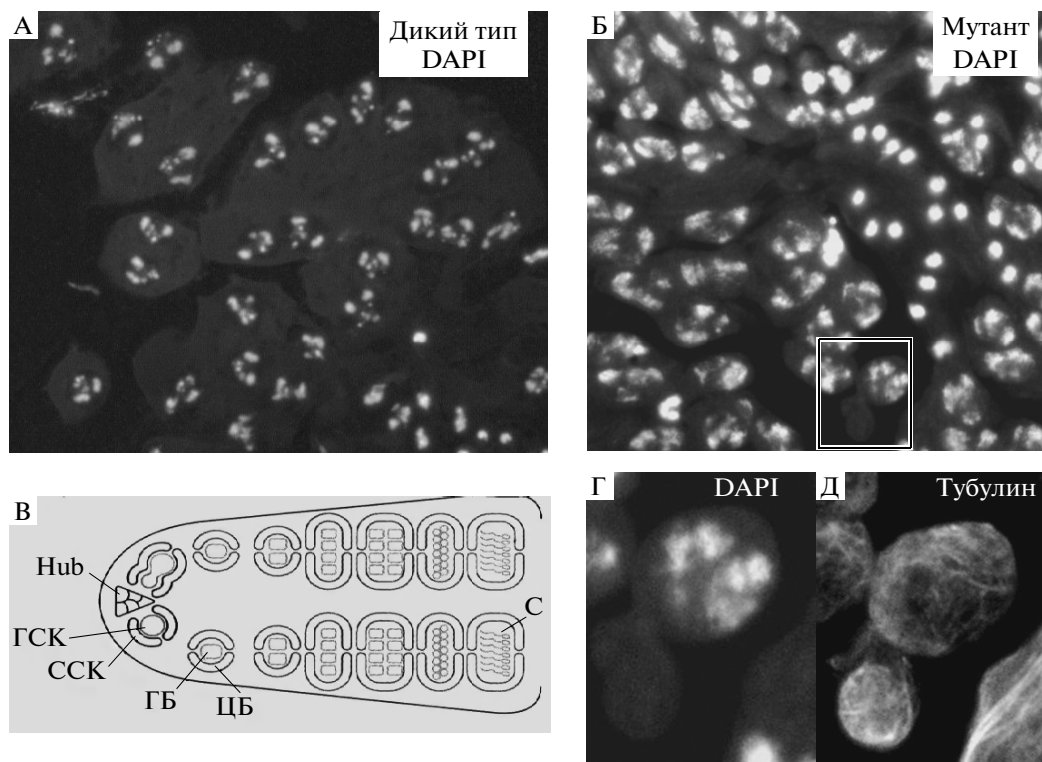


Рис. 3. Аномальное деление герминативных клеток во время сперматогенеза у мутанта *lawc^{p1}e(y)1/Y*.

А, Б – сперматоциты I порядка (А – дикий тип, Б - *lawc^{p1}e(y)1/Y*). Рамкой обозначена область с аномальным делением клетки, увеличенная на Г–Д. В – схема сперматогенеза: ГБ – гониобласты, ГСК – герминативные стволовые клетки, С – сперматозоиды, ССК – соматические стволовые клетки, ЦБ – цистобласты, Hub – группа клеток, определяющих локализацию (нишу) ГСК. Г, Д – область отмеченная рамкой на Б (Г – окрашивание DAPI, Д – окрашивание антителами к тубулину (использовался как маркер веретена деления)).

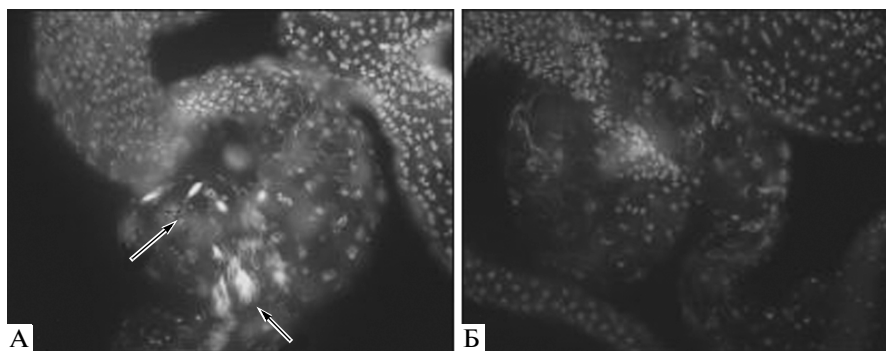


Рис. 4. Семенник особи дикого типа (А) и стерильного мутанта (Б). Стрелки указывают на упакованные сперматозоиды. Окрашивание DAPI.

результате такого детального анализа были обнаружены: 12 цитологических зон, которые в гетерозиготном состоянии вызывают гибель *lawc*-мутантов; 10 цитологических зон, которые в гетерозиготном состоянии усиливают мутантный *lawc*-фенотип; и 4 цитологические зоны, которые в гетерозиготном состоянии супрессируют мутантный *lawc*-фенотип.

В настоящее время в крупнейших американских и европейских лабораториях в рамках проекта “Genome Project” идет работа по насыщению генома инсерционными мутациями в области предполагаемых рамок считывания неизвестных пока генов. Мы планируем использовать имеющиеся в мировых коллекциях линии с такими мутациями в генах, локализованных в “летальных” цитологических районах, для постановки генетических экспериментов.

Первые гены-мишени фактора TRF2 были идентифицированы в экспериментах по коиммунопреципитации, в которых было обнаружено, что TRF2 ассоциирован с 18 полипептидами, среди которых были компоненты хроматин-ремодулирующего комплекса NURF, включая каталитическую субъединицу АТФ-азу ISWI, и фактор DREF, связывающийся с последовательностью DRE (DNA replication-related element; 5'-TATC-GATA) (Hochheimer et al. 2002, табл. 6).

DREF, как известно, вовлечен в регуляцию генов, контролирующей клеточный цикл и клеточную пролиферацию, таких, как *proliferating cell nuclear antigen (PCNA)*, посредством связывания с последовательностью DRE — альтернативным сайтом начала транскрипции, расположенном выше промотора этого гена, регулируемого комплексом TF_{II}D. Стоит отметить, что по данным компьютерного анализа генома дрозофилы элемент DRE входит в состав многих промоторов и является превалирующим коровым промоторным мотивом (Ohler et al. 2002; Tomancak et al. 2002).

На клетках человека было показано, что сверхэкспрессия TRF2 активирует транскрипцию промотора гена *neurofibromatosis type 1 gene (NF-1)*, не имеющего TATA-бокса (TATA-less). Интересно, что этот эффект зависел от его способности связываться с TF_{II}A. Также, сверхпродукция TRF2 репрессировала транскрипцию гена *c-fos*, промотор которого содержит TATA-бокс. Предполагают, что причиной этого явилось TRF2-опосредованное изолирование фактора TF_{II}A от промотора, то есть, избыточный TRF2 связывался с TF_{II}A и не давал ему контактировать с промотором (Chong et al. 2005).

Было показано, что схожим образом, через свою способность связываться с TF_{II}A, TRF2 цыпленка может ингибировать транскрипцию с TATA-промоторов и стимулировать транскрипцию с промоторов без TATA-бокса (TATA-less), а TRF2 мыши ингибировать транскрипцию гена *wee1* (Ohbayashi et al., 2003; Tanaka et al., 2007). Мы не изучали взаимодействия *lawc/Trf2* с TF_{II}A, зато впервые показали, что *lawc/Trf2* генетически взаимодействует с компонентами другой субъединицы комплекса РНК-полимеразы II — TF_{II}H (гены *Ssl1, MAT1, Tfb4, Tfb2, hay*) (табл. 3).

По данным Рабенштейна с соавторами (Rabenstein et al., 1999) сайты связывания TRF2 на политенных хромосомах *D. melanogaster* отличаются от сайтов локализации ТВР и TRF1. Иммуноокрашивание политенных хромосом слюнных желез личинки дрозофилы показало, что TRF2 локализуется в сайтах 74EF, 75B, 45F-46A, 55E, 71DE, 72D, 78D, 85EF, 88D, 93D, а также еще в 40 других сайтах. Первые четыре из упомянутых сайтов, совпадают с районами, которые становились гаплонедостаточными на фоне мутации *lawc^{pl}*.

Хотя функция TRF2 до конца не выяснена, показана его необходимость для эмбриогенеза и сперматогенеза модельных организмов. Исследование функций TRF2 у *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* и *Danio rerio* продемонстрировало необходимость TRF2 для контроля генов, экспрес-

Таблица 6. Характеристика генов, кодирующих субъединицы, входящие в состав TRF2-содержащего комплекса, выявленного Хокхеймером с соавторами (Hochheimer et al., 2002)

Ген*	Локализация	Особенности белкового продукта	Ссылки
<i>CG30020</i>	47C5**	ДНК-связывающий белок, возможно, мишень Dorsal.	Stathopoulos, et al., 2002.
<i>putzig (pzig)</i>	78C5	Связывается с ДНК, участвует в организации структуры хромосом, необходим для клеточной пролиферации.	Kugler et al., 2007.
<i>Imitation SWI (Iswi)</i>	49B10**	Являясь АТФазой комплекса <i>NURF</i> , участвует в АТФ-зависимом ремоделировании хроматина. Ассоциирован с микротрубочками веретена и необходим для хромосомной сегрегации.	Corona et al., 2007; Yokoyama et al., 2009.
<i>CG12272</i>	72D8	<i>CG12272</i> – не исследован.	
<i>CG13957</i>	14B9***	<i>CG13957</i> – не исследован.	
<i>DNA replication-related element factor (DREF)</i>	30F2-30F3	Транскрипционный фактор, участвует в организации митотического веретена деления, регулирует транскрипцию на промоторах, зависимых от РНК-полимеразы II.	Hirose, et al., 1993.
<i>trailer hitch (tral)</i>	69C4***	Вовлечен в пост-транскрипционную регуляцию работы генов, участвуя в транспортировке везикул от эндоплазматического ретикулума к комплексу Гольджи; в организацию актинового цитоскелета; в организацию цитоскелета из микротрубочек; в спецификацию дорсо-вентральной оси ооцита.	Monzo et al., 2006; Snee, Macdonald, 2009.
<i>washout (wash)</i>	48E6	Участвует в формировании трахейной системы.	Liu, et al., 2009.
<i>Chromatin assembly factor 1 subunit (CAF-1)</i> синоним <i>NURF-55</i>	88E3	Компонент комплексов, участвующих в модификации гистонов и ремоделировании хроматина.	Martinez-Balbas et al., 1998; Parrish et al., 2006; Ridgway, Almouzni, 2000.
β - <i>Tubulin at 60D</i> (β <i>Tub60D</i>)	60C6	Структурный компонент цитоскелета. Контролирует поведение личинок, аксоногенез.	Bialojan, et al., 1984; Hoyle, Raff, 1990.
<i>Nucleosome remodeling factor 38kD (NURF-38)</i>	60D5	Неорганическая дифосфатазная активность. Вовлечен в передачу сигналов через экдизоновый рецептор; в формирование нуклеосом; транскрипцию; ремоделирование хроматина.	Tsukiyama, Wu, 1995; Gdula et al., 1998.

Примечания:

* – В скобках дано сокращенное название гена.

** – Совпадает с районом, модифицирующим *lawc*-фенотип.

*** – Район на взаимодействие с *lawc^{p1}* не исследовали.

сирующихся на стадии зиготы (ранние стадии эмбриогенеза). С другой стороны, инактивация гена *Trf2* у мышей продемонстрировала отсутствие его влияния на эмбриогенез, но показала, что он необходим для сперматогенеза (Shimada et al., 2003). Наши данные, полученные на *D. melanogaster*, говорят о том, что TRF2 функционирует в сперматогенезе совместно с продуктом

гена *e(y)1*, поскольку снижение экспрессии *e(y)1* у мутантов *lawc^{p1}* оказалось критичным для сперматогенеза. Самцы *lawc^{p1}e(y)1^{u1}* не могли размножаться из-за дефектов, вызванных слабой дифференцировкой сперматоцитов первого порядка. Мутантов *lawc*, специфически нарушающих сперматогенез, пока не обнаружено. Однако следует отметить, что у самцов *ph^{p1}lawc^{p1}/Y* из линии

с репрессией гена *lawc* при помощи химерного белка Р-Ph (Belenkaya et al., 1998) также наблюдается задержка в прохождении I митотического деления (Модестова и др., 2003). В семенниках накапливаются сперматоциты первого порядка, в семяприемниках обнаруживается небольшое количество спермы, но потомство эти особи оставляют, несмотря на сокращенную продолжительность жизни. То есть в обеих линиях *lawc^{p1}e(y)I^{u1}* и *ph^{p1}lawc^{p1}* возникают сходные нарушения, но степень их выраженности различается. Учитывая этот факт можно предположить, что продукт гена *e(y)I* участвует в тканеспецифической, ограниченной половой системой самцов, регуляции экспрессии *lawc/Trf2*. Известно, что ген *e(y)I* кодирует белок TAF_{II}40 (TAF9, согласно новой классификации (табл. 4, Tora L. 2002)) и экспрессируется преимущественно в яичниках (Soldatov et al., 1999). Мы впервые в генетических экспериментах получили доказательства того, что *e(y)I* может функционировать также в семенниках, очевидно взаимодействуя с геном *lawc/Trf2*.

Было показано, что TAF_{II}40 колокализуется с другим белком семейства TAF_{II} – TAF_{II}60 (TAF6 по новой классификации) и происходит это вблизи промоторов DPE (Burke, Kadonaga, 1997). В генетических экспериментах на дрозофиле было выявлено, что мутации, нарушающие аминокислотные последовательности TAF_{II}40 и TAF_{II}60, приводят как к понижению, так и к усилению транскрипции генов, чья экспрессия контролируется или предположительно контролируется промоторами DPE (Soldatov et al., 1999; Aoyagi, Wassarman, 2001). Природа промотора *lawc/Trf2* до сих пор не выяснена. Чтобы проанализировать, как влияет TAF_{II}60 на экспрессию TRF2, мы объединили мутации, кодирующих их генов *lawc^{p1}* и *Taf60^l*. Внедрение одной дозы мутации *Taf60^l* в мух линии *lawc^{p1}* привело к гибели особей *lawc^{p1}; Taf60^l/+* на ранних стадиях развития (табл. 3). Из этого следует вывод о том, что в отличие от *TAF_{II}40/e(y)I* характер взаимодействий *Taf_{II}60* с *lawc/Trf2* менее специфичен.

С белком TAF_{II}40 взаимодействует продукт другого гена – *e(y)2*. Было показано, что этот ген кодирует эволюционно консервативный фактор транскрипции, который формирует с TAF_{II}40 комплексы на хромосомах (Georgieva et al., 2001). В наших экспериментах снижение концентрации белка E(Y)2 не повлияло на фенотип *lawc*-мутантов, на их репродуктивность или жизнеспособность. Отсутствие генетических взаимодействий предполагает либо наличие неких компенсаторных механизмов, восстанавливающих нехватку белка E(Y)2, либо несущественность снижения концентрации этого белка для процессов, контролируемых белком TRF2. Возможно и то, что при регуляции сперматогенеза TAF_{II}40 может

входить в состав транскрипционных комплексов и без своего напарника E(Y)2.

Совмещение *lawc^{p1}* с *e(y)3^{u1}* приводило к гибели особей. Ген *e(y)3* кодирует белок Supporter of Activation of Yellow Protein (SAYP) (Shidlovskii et al., 2005; Chalkley et al., 2008). Недавно показали, что в состав SAYP входит эволюционно консервативный домен SAY, способный связываться с субъединицей комплекса ремоделирования хроматина Brahma (SWI/SNF) – VAP170 – и субъединицей преинициаторного транскрипционного комплекса TF_{II}D – TAF5. В результате на промоторе формируется стабильный суперкомплекс VTFly (Brahma and TF_{II}D in one assembly), который выступает, в качестве активатора транскрипции (Vorobyeva et al., 2009). Гибель мутантов, несущих одновременно две слабые мутации *lawc^{p1}* и *e(y)3^{u1}*, каждая из которых по отдельности не нарушает жизнеспособность, говорит о взаимодействиях этих двух генов. Двойные мутанты восстанавливают жизнеспособность на фоне эктопической экспрессии как TRF2, так и SAYP. Однако в последнем случае у “спасенных” особей появляется сильный *lawc*-фенотип (трансформация аристы в тарзусные структуры, вырезки на крыльях, дополнительные макрохеты). Это доказывает специфическое участие белков TRF2 и SAYP в выявленных взаимодействиях. Возможно, суперкомплекс VTFly является позитивным активатором гена *lawc/Trf2*. Возможно также, что TRF2, являясь альтернативным фактором белка ТВР в составе TF_{II}D, может взаимодействовать с суперкомплексом VTFly через белок SAYP. Другой вариант – существование альтернативного суперкомплекса, включающего компоненты TRF2-содержащего комплекса (NURF и др.) и белок SAYP. В дальнейшей работе мы планируем исследовать причину гибели двойных мутантов.

Мы выражаем благодарность Bloomington Drosophila Stock Center за предоставленные линии дрозофил с набором делеций (Deficiency Kit). Также благодарим П.Г. Георгиева за предоставленные линии дрозофил с мутациями генов группы *e(y)*, *taf_{II}60*, *taf_{II}110* и *taf_{II}150*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронцова Ю.Е., Модестова Е.А., Бурдина Н.В. и др. Восстановление жизнеспособности летальных мутантов гена *leg-arista-wing complex* на фоне конструкций, экспрессирующих домены гена *trf2*, у *Drosophila melanogaster* // ДАН. 2007. Т. 417. № 1. С. 133–135.
- Копытова Д.В., Краснов А.Н., Симонова О.Б. и др. Изучение гена *lawc-trf2* *Drosophila melanogaster*, и его белкового продукта // ДАН. 2005. Т. 405. № 1. С. 380–382.
- Модестова Е.А., Копытова Д.В., Георгиева С.Г. и др. Использование генетической системы химерного

- белка Р-Ph для репрессии транскрипции гена *leg-
arista-wing complex* у дрозофилы // Генетика. 2003.
№ 5. С. 713–716.
- Петрук С.Ф., Джагаева И.В., Солдатов А.В. и др. Кло-
нирование гена гена *leg-arista-wing complex (lawc)* и
анализ его мутантных производных у дрозофилы //
Генетика. 1998. Т. 34. № 3. С. 446–448.
- Симонова О.Б., Кузин Б.А., Георгиев П.Г. и др. Новая ре-
гуляторная мутация *Drosophila melanogaster* // Гене-
тика. 1992. № 2. Т. 28. С. 164–167.
- Симонова О.Б., Петрук С.Ф., Корочкин Л.И. Генетиче-
ский анализ мутации *lawc^{p1}* в ее комбинациях с
различными аллелями генов AS-C у дрозофилы //
Генетика. 1996. Т. 32. № 7. С. 949–955.
- Симонова О.Б., Петрук С.Ф., Джагаева И.В. и др. Роль
мутации *lawc^{p1}* в регуляции экспрессии локуса
white у дрозофилы // Генетика. 1998. Т. 34. №3.
С. 349–354.
- Симонова О.Б. Новый транс-регуляторный локус дро-
зофилы // Генетика. 2000. Т. 36. № 11. С. 1464–
1474.
- Aoyagi N, Wassarman D.A. Developmental and transcrip-
tional consequences of mutations in *Drosophila*
TAFII60 // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 21. P. 6808–19
- Belenkaya T., Soldatov A., Nabirochkina E. et al. P-Element insertion at the *polyhomeotic* gene leads to formation of a novel chimeric protein that negatively regulates *yellow* gene expression in P-element-induced alleles of *Drosophila melanogaster* // Genetics. 1998. V. 150. P. 687–697.
- Bialojan S., Falkenburg D., Renkawitz-Pohl R. Characterization and developmental expression of β tubulin genes in *Drosophila melanogaster* // EMBO J. 1984. V. 3. P. 2543–2548.
- Burke T.W., Kadonaga J.T. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila* // Genes Dev. 1997. V. 11. P. 3020–31.
- Chalkley, G.E., Moshkin, Y.M., Langenberg, K. et al. The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex // Mol. Cell Biol. 2008. V. 28. P. 2920–2929.
- Chong J.A., Moran M.M., Teichmann M. et al. TATA-binding protein (TBP)-like factor (TLF) is a functional regulator of transcription: reciprocal regulation of the neurofibromatosis type 1 and c-fos genes by TLF/TRF2 and TBP // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. № 7. P. 2632–43.
- Corona D.F.V., Siriaco G., Armstrong J.A. et al. ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H1 assembly *in vivo* // PLoS Biol. 2007. V. 5. № 9. P. 2011–2022.
- Gdula D.A., Sandaltzopoulos R., Tsukiyama T. et al. Inorganic pyrophosphatase is a component of the *Drosophila* nucleosome remodeling factor complex // Genes Dev. 1998. V. 12. № 20. P. 3206–3216.
- Georgiev P.G., Gerasimova T.I. Novel genes influencing the expression of the *yellow* locus and *mdg4 (gypsy)* in *Drosophila melanogaster* // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 220. P. 121–126.
- Georgiev P.G., Kiselev S.L., Simonova O.B. et al. A novel transposition system in *Drosophila melanogaster* depending on the Stalker mobile genetic element // EMBO J. 1990. V. 9. № 7. P. 2037–2044.
- Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J. et al. The novel transcription factor e(y)2 interacts with TAF(II)40 and potentiates transcription activation on chromatin templates // Mol. Cell Biol. 2001. V. 21. № 15. P. 5223–5231.
- Hirose F., Yamaguchi M., Handa H. et al. Novel 8-base pair sequence (*Drosophila* DNA replication-related element) and specific binding factor involved in the expression of *Drosophila* genes for DNA polymerase and Proliferating Cell Nuclear Antigen. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 3. P. 2092–2099.
- Hochheimer A., Zhou S., Zheng S. et al. TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila* // Nature. 2002. V. 420. P. 439–445.
- Hoyle H.D., Raff E.C. Two *Drosophila* beta tubulin isoforms are not functionally equivalent // J. Cell Biol. 1990. V. 111. № 3. P. 1009–1026.
- Kugler S.J., Nagel A.C. Putzig is required for cell proliferation and regulates Notch activity in *Drosophila* // Mol. Biol. Cell. 2007. V. 18. № 10. P. 3733–3740.
- Lindsley D.M., Zimm G. The genome of *Drosophila melanogaster* NY: Academic Press, Inc. 1992. P. 1134.
- Liu R., Abreu-Blanco M.T., Barry K.C. et al. Wash functions downstream of Rho and links linear and branched actin nucleation factors // Development. 2009. V. 136. № 16. P. 2849–2860.
- Martinez-Balbas M.A., Tsukiyama T., Gdula D. et al. *Drosophila* NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 132–137.
- Monzo K., Papoulas O., Cantin G.T. et al. Fragile X mental retardation protein controls *trailer hitch* expression and cleavage furrow formation in *Drosophila* embryos // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 48. P. 18160–18165.
- Ohbayashi T., Shimada M., Nakadai T. et al. Vertebrate TBP-like protein (TLP/TRF2/TLF) stimulates TATA-less terminal deoxynucleotidyl transferase promoters in a transient reporter assay, and TFIIA-binding capacity of TLP is required for this function // Nucleic Acids. Res. 2003. V. 31. № 8. P. 2127–2133.
- Ohler U., Liao G.C., Niemann H. et al. Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome // Genome Biol. 2002. V. 3. № 12. P. 871–812.
- Parks A.L., Cook K.R., Belvin M. et al. Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. // Nat. Genet. 2004. V. 36. № 3. P. 288–292.
- Parrish J.Z., Kim M.D., Jan L.Y. et al. Genome-wide analyses identify transcription factors required for proper morphogenesis of *Drosophila* sensory neuron dendrites // Genes Dev. 2006. V. 20. № 7. P. 820–835.
- Persengiev S.P., Zhu X., Dixit B.L. et al. TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed // PNAS. 2003. V. 100. № 25. P. 14887–14891.
- Rabenstein M.D., Zhou S., Lis J.T. et al. TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 9. P. 4791–4796.

- Ridgway P., Almouzni G. CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair // *J. Cell Sci.* 2000. V. 113. № 15. P. 2647–2658.
- Shidlovski Y.V., Krasnov A.N., Nikolenko J.V. et al. A novel multidomain transcription coactivator SAYP can also repress transcription in heterochromatin // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 1. P. 97–107.
- Shimada M., Nakadai T., Tamura T.A. TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF) negatively regulates cell cycle progression and is required for the stress-mediated G(2) checkpoint // *Mol. Cell Biol.* 2003. V. 23. P. 4107–4120.
- Snee M.J., Macdonald P.M. Bicaudal C and trailer hitch have similar roles in *gurken* mRNA localization and cytoskeletal organization // *Dev. Biol.* 2009. V. 328. № 2. P. 434–444.
- Soldatov A., Nabirochkina E., Georgieva S. et al. TAFII40 protein is encoded by the *e(y)I* gene: biological consequences of mutations // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. № 5. P. 3769–3778.
- Stathopoulos A., Van Drenth M., Erives A. et al. Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Cell.* 2002. V. 111. № 5. P. 687–701.
- Tanaka Y., Nanba Y.A., Park K.A. et al. Transcriptional repression of the mouse *wee1* gene by TBP-related factor 2 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 352. № 1. P. 21–28.
- Thibault S.T., Singer M.A., Miyazaki W.Y. et al. A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. № 3. P. 283–287.
- Tora L. A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription // *Genes Dev.* 2002. V. 16. P. 673–675.
- Tomancak P., Beaton A., Weiszmann R. et al. Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis // *Genome Biol.* 2002. V. 3. № 12. P. 88.1–88.14.
- Tsukiyama T., Wu C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor // *Cell.* 1995. V. 83. № 6. P. 1011–1020.
- Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Nikolenko J.V. et al. Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex // *PNAS.* 2009. V. 106. № 27. P. 11049–11054.
- Yokoyama H., Rybina S., Santarella-Mellwig R. et al. ISWI is a RanGTP-dependent MAP required for chromosome segregation // *J. Cell Biol.* 2009. V. 187. № 6. P. 813–829.

Recovery of Genomic Regions Affecting *lawc/Trf2* Expression during *Drosophila melanogaster* Development

O. B. Simonova^a, E. A. Modestova^b, Yu. E. Vorontsova^a, and R. O. Cherezov^a

^a Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ulitsa Vavilova dom 26, Moscow 119334

^b Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, ulitsa Vavilova dom 34/5, Moscow 119334
e-mail: osimonova@hotmail.com

Abstract—*Leg-arista-wing complex (lawc)* mutations affect the expression of *D. melanogaster* proteins homologous to a human basic transcription factor, TBP (TATA-box binding protein) Related Factor 2 (TRF2), specifically involved in development. The paper for the first time reports the application of genetic screens for various genomic regions to recover genetic interactions between the *lawc/Trf2* gene and other genes and genetic loci by using Deficiency Kit lines with small deletions in total providing maximal coverage of the genome. The deletion mapping allowed us to recover 26 genomic regions that, when deleted, are lethal or modify the mutant phenotype due to a decreased TRF2 expression level. These deletions could be useful in identifying both novel TRF2 targets and its positive and negative regulators. There is evidence that TRF2 can be a component of high molecular DNA Replication-related Element Factor (DREF)- and Nucleosome Remodeling Factor (NURF)-containing complexes. The present study for the first time reports new genetic interactions of *lawc/Trf2* with genes that encode basic and specific transcription factors. In most cases, if mutated, those genes caused developmental defects or death of progeny. However, in the case of the *e(y)I* gene, coding for the *Taf9* transcription factor, only the male reproductive system is impaired when the *lawc/Trf2* phenotype is associated with a *e(y)I* gene mutation. Mutant *lawc^{P1}e(y)I^{u1}* males become infertile due to primary spermatocyte maturation arrest and impaired premeiotic chromosome condensation in germ cells.

Keywords: deletion, autosome, cytological map, expressivity, penetrance, genetic screening, haploinsufficiency, transcription factor, spermatogenesis, *Drosophila melanogaster*