

Генные сети индивидуального развития

Введение.....	2
1. Уровни регуляции экспрессии генов и предпосылки возникновения генных сетей индивидуального развития у эукариот.....	2
2. Понятия онтогенез, эмбриогенез и жизненный цикл.....	2
Генные сети индивидуального развития на примере генных сетей развития <i>Drosophila melanogaster</i>.....	2
I. Развитие протекающее до формирования клеток.....	3
1. Установление передне-задней оси тела дрозофилы генами, работающими в организме самки на стадиях формирования яйца.....	3
2. Ранний эмбриогенез - генная сеть сегментации.....	4
II. Развитие на клеточной основе.....	5
1. Поздний эмбриогенез - гибридная генная сеть поздних этапов сегментации.....	5
2. Основные особенности межклеточных взаимодействий (инструктивные взаимодействия, дифференцировка и детерминация, компетентность, градиенты морфогенов, ответ клетки на морфоген во времени).....	6
3. Межклеточные взаимодействия и градиенты морфогенов.....	7
4. В чем консервативность процессов развития: повторение в развитии консервативных каскадов передачи сигналов.....	8
5. Замечательный пример развития от зачатка до органа - генная сеть развития крыла дрозофилы.....	8
6. В чем консервативность процессов развития: повторение в развитии консервативных механизмов детерминации клеток - замечательный пример консервативного механизма детерминации клеток - латеральное ингибирование.....	9
Интеграция высокого уровня генных сетей развития на примере генных сетей развития нервной системы насекомых и позвоночных и механизмов детерминации тканей сегментов тела насекомых и позвоночных.....	10
1. Миграция клеток и аксонов в развитии нервной системы позвоночных и насекомых.....	10
2. Роль Нох-генов в иннервации у позвоночных.....	11
3. Нох-гены - центральные регуляторы генных сетей интеграторов морфогенеза: две основные функции Нох-генов.....	11
Есть ли общность в структурно-функциональных особенностях генных сетей развития животных и растений.....	12
ABC модель развития цветка и Нох-гены и топология графа генной сети развития цветка.....	12
Выводы - основные идеи лекции.....	13
Вместо заключения. Обращаясь к эволюции морфогенеза.....	13
Приложения.....	14

Введение

1. Уровни регуляции экспрессии генов и предпосылки возникновения генных сетей индивидуального развития у эукариот

Рассматривая процесс образования полнофункциональных белков, кодируемых эукариотическими генами, можно выделить несколько основных этапов, на которых возможна регуляция экспрессии генов эукариот - на слайде 1 показаны эти этапы. Интересно, что сравнивая мощность регуляции генов про- и эукариот и особенности строения их геномов, можно показать почему истинная многоклеточность и эмбриогенез так и не появился в эволюционной истории прокариот (интересующиеся данным вопросом могут обратиться к приложению 1).

2. Понятия онтогенез, эмбриогенез и жизненный цикл

Взглянем на процесс жизнедеятельности практически любого эукариотического многоклеточного организма, будь то растение или животное. В типичном случае, мы различим как минимум несколько стадий жизни - зачатие, рост и развитие, репродуктивный возраст, старение и смерть. Хотя и любой процесс жизнедеятельности организма целостен, для изучения отдельных его особенностей различают обширные по продолжительности периоды - на слайде 2 даны определения, разграничивающие по времени, основные периоды жизнедеятельности организма. В качестве примера на слайде 3 показан жизненный цикл *Drosophila melanogaster*; кстати, почему на рисунке показан именно жизненный цикл, подумайте? Сегодня, большая часть лекции будет посвящена лишь одному из таких периодов - эмбриогенезу. Важно то, что практически все морфологические преобразования, наблюдаемые в течение жизни организма, протекают именно в этот период.

Генные сети индивидуального развития на примере генных сетей развития *Drosophila melanogaster*

Наиболее хорошо изученным на молекулярном уровне на сегодня является процесс развития плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. Важно, что эмбриогенез плодовой мушки отнюдь не является образцом для эмбриогенезов иных групп животных. Эмбриогенез *Drosophila melanogaster* включает много достаточно высокоспециализированных стадий, не имеющих аналогов у других групп животных. Однако основные особенности молекулярных процессов, обуславливающих развитие, как оказалось, сходны практически для всех многоклеточных животных. Все процессы развития, как и любые другие биологические процессы, формализуются в виде генных сетей (интересующиеся этим вопросом могут обратиться к приложению 2). Рассмотрим генные сети эмбрионального развития плодовой мушки.

В общем виде, генные сети развития плодовой мушки можно подразделить на 2 резко отличающихся этапа: 1) генные сети установления осей тела и начальных стадий сегментации, работа которых проходит до формирования истинных клеток - в общей цитоплазме зиготы - синцитии (на слайде 4 показаны особенности развития *Drosophila melanogaster* на этих этапах; забегая вперед, как вы думаете, почему обязательно необходимо выделять этот этап?) и 2) генные сети эмбрионального развития,

работа которых проходит уже после формирования клеток организма *Drosophila melanogaster*.

На слайде 5 представлена схема процесса развития (кстати, почему не эмбрионального развития, подумайте?) организма *Drosophila melanogaster* с указанием основных этапов (справа сверху) развития и основных групп генов, детерминирующих развитие (справа снизу).

На слайде 6 представлена схема генной сети установления антерио-постериорной оси тела и ее спецификации. Заметьте, она имеет блочно-иерархическую структуру - ее упрощенно можно представить в виде нескольких взаимосвязанных подсетей: 1) генной сети установления антерио-постериорной оси тела и начальных этапов сегментации (ее гены покрашены синим), состоящей из гар-генов, функция продуктов которых состоит в разделении тела на крупные части путем образования градиентов морфогенов от передней к задней части яйцеклетки; 2) генной сети средних этапов сегментации, состоящей из генов парного правила (покрашены фиолетовым); 3) генной сети конечных этапов сегментации, включающей в себя гены сегментной полярности и контролирующей разделение **клеточной** (обратите внимание!) бластодермы на сегменты (покрашена зеленым); и, наконец, 4) генной сети отвечающей за сегмент-специфический органогенез, содержащей множество блоков, каждый из которых ответственен за формирование специфических тканей и органов в сегментах, причем, центральным элементом каждого блока этой сети является определенный Нох-ген, экспрессирующийся в соответствующем сегменте и кодирующий транскрипционный фактор.

I. Развитие протекающее до формирования клеток

1. Установление передне-задней оси тела дрозофилы генами, работающими в организме самки на стадиях формирования яйца

Любое развитие нового организма высших многоклеточных начинается с подготовки - с развития яйцеклетки и сперматозоида. Наиболее важную роль в начальных этапах развития нового организма играет именно развитие яйцеклетки. Рассмотрим важнейшие вехи этого процесса в контексте формирования антерио-постериорной (передне-задней) оси тела нового организма. На слайде 7 представлена схема яйцевого фолликула дрозофилы, забегаая вперед, вспомните курс эмбриологии, почему важны фолликулярные клетки и клетки-няньки (питающие клетки) для нормального формирования овоцита *Drosophila melanogaster*?

Изначальная асимметрия яйцеклетки *Drosophila melanogaster* устанавливается во время овогенеза. Овоцит развивается в яйцевой камере. Он располагается в постериорном (заднем) конце камеры (слайд 7). Питающие клетки обеспечивают овоцит мРНК и белками, используя сеть микротрубочек, которая собирается вокруг ядра овоцита. Терминальные фолликулярные клетки несут особую функцию – они определяют передний и задний полюса овоцита. Белок и мРНК Gurken локализованы строго около оболочки ядра овоцита. Ядро овоцита в определенный момент времени находится вблизи постериорного полюса овоцита плотно примыкающего к постериорному полюсу яйцевой камеры. В этот момент белок Gurken опосредованно воздействует на терминальные фолликулярные клетки. Терминальные фолликулярные клетки отвечают на стимул спецификацией постериорного полюса овоцита, что, в конечном счете, приводит к разбиению прежнего комплекса микротрубочек овоцита. Сеть микротрубочек овоцита выстраивается вновь, вытягивая плюс-полюс овоцита по направлению к его постериорному полюсу - в этот момент овоцит начинает свой рост (заинтересовавшиеся этим процессом могут обратиться к приложению 3). В то время как яйцевая камера растет антериорные (передние) терминальные фолликулярные клетки мигрируют по

направлению к овоциту, а ядро овоцита транспортируется по вновь созданной сети микротрубочек к её (сети микротрубочек) минус-полюсу. мРНК Bicoid и Nanos проникают в овоцит из клеток-нянек и, используя цитоскелетный каркас (сеть микротрубочек) овоцита, распределяются специфическим образом в anteriорный (к минус-полюсу микротрубочек) - Bicoid и posteriорный (к плюс-полюсу микротрубочек) - Nanos полюса овоцита. Белок Bicoid отвечает за формирование передних структур тела, Nanos - за формирование задних. На слайде 8 показано распределение белков Bicoid и Nanos в яйцеклетке и мутации вызванные мутациям по генам Bicoid и Nanos. На слайде 9 дана динамика распределения мРНК и белков Bicoid и Nanos. Обратите внимание на то, что Bicoid и Nanos антагонистично регулируют экспрессию генов работающих на более поздних стадиях развития, как вы думаете, для чего это необходимо?

Что обеспечивает спецификацию anteriорного и posteriорного полюса яйцеклетки? Так как показано, что рецептор - Torso и его лиганд - Trunk равномерно распределены по поверхности овоцита, то вероятно в спецификации anteriорного и posteriорного полюсов овоцита важную роль играет сайт-специфический протеолиз белка Trunk, обеспечивающийся с помощью терминальных фолликулярных клеток, функция которых может быть маркирована экспрессией в них гена Torso-like. Специфическим образом обрезанный Trunk может взаимодействовать с рецептором Torso, который, передавая сигнал, обеспечивает активацию MAP-киназного каскада, что в свою очередь приводит к дозо-зависимой (зависимой от интенсивности каскада передачи сигнала) активации экспрессии генов *Huckebein* и *Tailless* (слайд 10). На слайде 11 показано распределение активности Torso-каскада вдоль anteriо-posteriорной оси овоцита, заметьте, что в центральной области яйцеклетки присутствует ингибитор Torso-каскада, предотвращающий возможность формирования дополнительных терминальных структур.

Таким образом, генная сеть, формирования яйца довольно сложна и включает в себя межклеточные взаимодействия **особого** характера и что самое главное – **особое передвижение** внутриклеточных компонентов и миграцию клеток (речь о миграции клеток пойдет позднее). Что же на последующих этапах?

2. Ранний эмбриогенез - генная сеть сегментации

Как уже говорилось, процесс сегментации условно можно подразделить на раннюю, среднюю и позднюю сегментацию протекающую, как вы помните, уже после формирования истинных клеток (слайд 12). За раннюю сегментацию ответственны гар-гены, за среднюю - гены парного правила, за позднюю - гены сегментной полярности (слайд 12).

Особенности раннего эмбриогенеза дрозофилы

Внизу на слайде 12 вы можете заметить характерную особенность раннего эмбриогенеза дрозофилы - наличие специфических, ответственных только за экспрессию на ранних этапах развития энхансеров генов детерминирующих процесс развития. Это очень важно, потому, что на ранних стадиях развития дрозофилы - все процессы протекают в **единой** клетке (синцитии).

Иерархическая структура графа генной сети

На слайде 13 показана генная сеть ранних этапов сегментации. Отметьте важную ее особенность - иерархическую организацию ее графа! Это свойство особенно становится заметно если Вы начнете производить обход графа, например, от компонента BCD (Bicoid) или CAD (Caudal). Кроме этого в генной сети ранних этапов сегментации в меньшей степени просматривается ее организация в модули, обеспечивающие развитие

соответственно головы, средней и задней частей тела. Обратите внимание также на взаимосвязь этой сети с генными сетями формирования овоцита через Bicoid, Nanos и Torso - именно генные сети формирования овоцита играют роль пускового механизма запускающего работу генной сети ранних этапов сегментации.

Градиенты морфогенов

Каков внутренний механизм работы генной сети ранних этапов сегментации? Этим механизмом является формирование иерархически организованной системы паттернов экспрессии морфогенов. Посмотрите на слайд 14 - на слайде 14 показано формирование паттерна экспрессии гена *Kruppel* на базе специфического распределения иных морфогенов вдоль антерио-постериорной оси тела. Такой механизм развития может работать **только тогда**, когда все процессы протекают в **единой** клетке, которой является яйцеклетка *Drosophila melanogaster*. Наличие же специфических, ответственных только за экспрессию на ранних этапах развития энхансеров генов, участвующих в развитии на этой стадии, является молекулярной основой иерархической организации описываемой генной сети - сайты связывания этих энхансеров являются интеграторами, распознающими концентрацию определенных морфогенов вдоль антерио-постериорной оси тела.

Блочность графа генной сети

На слайде 15 показана генная сеть средних этапов сегментации. Эти этапы также проходят в единой клетке, которой является яйцеклетка. Однако они имеют гораздо более сложную молекулярную основу - граф генной сети уже содержит большее количество связей (сравните со слайдом 13), причем в графе генной сети этого этапа развития можно выделить молекулярно-генетический автомат, обеспечивающий паттернизацию (группа функционально тесно связанных генов *h*, *ftz*, *run*, *eve*, *prd*) вдоль антерио-постериорной оси тела. Если вернуться к слайду 12, то станет ясно, зачем нужен такой аппарат - для образования переодических структур - парасегментов. Также можно заметить (см. слайд 15), что генная сеть средних этапов сегментации связана с иными генными сетями - а именно с генной сетью ранних этапов сегментации, которая ее запускает, генной сетью сегмент-специфического органогенеза работающей под руководством Нох-генов, генной сетью конечных этапов сегментации. На слайде 16 показана организация энхансеров одного из генов генетического автомата генной сети средних этапов сегментации. Даже на такой примитивной схеме легко заметить сложную организацию энхансеров гена *eve* определяющих гораздо большее количество концентраций различных морфогенов, чем, например, энхансеры генов генной сети ранних этапов сегментации. Принципом работы внутреннего механизма генной сети средних этапов сегментации также является иерархическая организация системы паттернов экспрессии морфогенов.

II. Развитие на клеточной основе

1. Поздний эмбриогенез - гибридная генная сеть поздних этапов сегментации

Особенности позднего эмбриогенеза дрозофилы

На слайде 17 показана генная сеть поздних этапов сегментации. Что больше всего бросается в глаза? Строгая иерархическая организация в так называемые каскады передачи сигналов. Для чего это необходимо? Дело в том, что генная сеть поздних этапов сегментации начинает свою работу уже после того, как сформированы клетки. В этой генной сети всего лишь 3 морфогена - Hh, Wg и Dpp. Однако именно эти морфогены запускают каскады передачи сигналов (слайд 17).

Роль предыдущих этапов развития

На слайде 18 показана молекулярная основа, запускающая работу генной сети поздних этапов сегментации. После формирования клеточных оболочек концентрации определенных морфогенов, захваченных в процессе "огораживания" клеточной мембраной части общей цитоплазмы яйцеклетки (см. слайд 4 - образование клеточной бластодермы), сначала в цитоплазму, а затем в ядро клетки попадает специфическая концентрация определенных морфогенов генной сети средних этапов сегментации. Это и обуславливает запуск генной сети поздних этапов сегментации. Центральными интегрирующими элементами запуска генной сети являются энхансеры гена *en* (слайд 17).

Межклеточные взаимодействия и градиенты морфогенов

Однако ген *en* не кодирует диффундирующий в межклеточном пространстве морфоген - его продукт запускает экспрессию одних генов (например, экспрессию гена *hh*) и подавляет экспрессию других, что в конечном итоге приводит к образованию функционально активного диффундирующего во внеклеточном пространстве на небольшие расстояния белка-морфогена Hh (слайд 19).

Сигнальные каскады

Белок Hh связывается со своими рецепторами Ptc находящимися на соседних клетках, тем самым, индуцируя Hedgehog (Hh)- каскад, приводящий к активации экспрессии гена *wingless (wg)*. Ген *wg* кодирует диффундируемый во внеклеточном пространстве морфоген. Морфоген Wg индуцирует Wingless-каскад, приводящий к активации экспрессии гена *decapentaplegic (dpp)*, который также является диффундирующим во внеклеточном пространстве морфогеном. Морфоген Dpp запускает Decapentaplegic-каскад приводящий к активации экспрессии гена *wg*. Образуется петля положительной обратной связи (слайд 19)! Такие петли положительной обратной связи очень важны на поздних этапах развития поскольку обеспечивают, по крайней мере на некоторое время, клеточную память.

2. Основные особенности межклеточных взаимодействий (инструктивные взаимодействия, дифференцировка и детерминация, компетентность, градиенты морфогенов, ответ клетки на морфоген во времени)

Все поздние этапы развития *Drosophila melanogaster* идут на клеточной, а не на синцитиальной (как ранние этапы) основе! Поздние этапы развития осуществляются, в основном, за счет межклеточных взаимодействий. Можно выделить общие механизмы межклеточных взаимодействий. Генные сети таких механизмов являются основной частью генных сетей поздних этапов развития. Например, комбинация инструктивных межклеточных взаимодействий обуславливает формирование практически любой ткани (слайд 20). Необходимо различать дифференцировку и детерминацию. Как показано на слайде 21, дифференцировка проходит гораздо позднее детерминации и заключается в экспрессии детерминированного фенотипа клетки. Инструктивные межклеточные взаимодействия не могут осуществляться без способности определенной группы клеток отвечать на специфические индуктивные сигналы (компетентности - слайд 22) являющиеся градиентами морфогенов (слайд 23) или межклеточными контактами физического характера. Важно, что ответ клеток на индуктивные сигналы осуществляется на протяжении определенного времени (слайд 24) и в специфически очерченном пространстве, способствуя поэтапной гетерогенизации процессов развития, как во времени (гетерохронии), так и в пространстве (гетеротопии), что приводит к образованию

со временем все новых и новых тканей. По-видимому, именно эта гетерогенизация и обуславливает формирование множества морфотипов как клеток и тканей, так и организмов на принципиально единой молекулярной основе (интересующиеся данным вопросом могут обратиться к приложению 2).

3. Межклеточные взаимодействия и градиенты морфогенов

Установление спинно-брюшной оси тела - Dorsal и Decapentaplegic сигнальные каскады

Процесс установления спинно-брюшной оси тела *Drosophila melanogaster* ранее не рассматривался мною специально. Дело в том, что на ранних этапах установления спинно-брюшной оси работают мощные сигнальные каскады, а на поздних - имеется полный спектр взаимодействий между сигнальными каскадами, инструктивными межклеточными взаимодействиями и градиентами морфогенов. На слайде 25 представлен Dorsal-каскад передачи сигналов отвечающий за определение вентральной части овоцита, работающий на ранних стадиях развития овоцита (заинтересовавшиеся этим процессом могут обратиться к приложению 3). Индуцируют каскад вентральные фолликулярные клетки (вспомните роль терминальных фолликулярных клеток в Torso-каскаде). Основные белок-белковые взаимодействия проходят в периветеллиновом пространстве. Каскад этих белок-белковых взаимодействий оканчивается связыванием белка Spatzle со своим рецептором - Toll. Toll затем индуцирует киназный каскад, фосфорилирующий в конечном счете белковый комплекс Cactus-Dorsal. После этого комплекс Cactus-Dorsal распадается, образуя при распаде активный транскрипционный фактор Dorsal. На этом процесс спецификации спинно-брюшной оси тела приостанавливается до стадии синцитиальной бластодермы. На стадиях формирования синцитиальной, а потом и клеточной бластодермы транскрипционный фактор Dorsal проникает в ядра вентральной стороны яйцеклетки, ингибируя при этом экспрессию генов специфицирующих спинную сторону эмбриона и активируя экспрессию генов специфицирующих брюшную сторону (слайд 26 - верхние рисунки), некоторые же гены (например, *sog*) активируются при его низкой концентрации и ингибируются при высокой (слайд 26 - рисунок слева). Градиент концентрации белка Dorsal в ядрах бластодермы четко коррелирует с местом формирования определенных тканей (слайд 26 - нижние рисунки) обуславливая серию сигнальных каскадов, приводящих, в конечном счете, к серии инструктивных межклеточных взаимодействий детерминирующих клетки к образованию специфических тканей, к миграции (клетки нейроэктодермы, мезодермы), апоптозу (амниосероза).

Детерминация клеток имагинальных дисков на поздних этапах развития

Имагинальные части тела дрозофилы развиваются из специфических структур - имагинальных дисков (слайд 28). Важно то, что определение клеток имагинальных дисков происходит еще на стадии клеточной бластодермы. На слайде 27 показан ряд этапов начала формирования крылового и ножного имагинальных дисков. На ранней стадии 11 на границах экспрессии (яркий пример инструктивных межклеточных взаимодействий) генов *wg* и *en* (слайд 28) выделяется группа клеток экспрессирующих ген *Dll*, причем вследствие индуктивных воздействий со стороны клеток экспрессирующих *en* и расположенных по соседству клеток не экспрессирующих *wg* часть клеток экспрессирующих *Dll* начинает экспрессировать ген *dpp*. В последствии (на стадии 12) эти клетки экспрессируют ген *Vg*, что детерминирует их к формированию зачатка крылового имагинального диска. Остальные клетки формируют зачаток имагинального диска ноги.

4. В чем консервативность процессов развития: повторение в развитии консервативных каскадов передачи сигналов

Как вы могли уже заметить (слайд 29), каскады передачи сигналов повторяются из одного процесса в другой (dpp-каскад в генных сетях поздних этапов сегментации, установления дорсальной идентичности тканей, детерминации клеток крылового имагинального диска, и т.п.). Действительно, как было недавно показано - существует удивительно мало ключевых паракринных путей передачи сигналов принимающих участие в морфогенезе большинства тканей, что является следствием высокой гетерогенности процессов развития на клеточной основе. Например, **высококонсервативные пути передачи сигналов** (Hh, Dpp, Wg, Notch, EGFR) принимающие участие в развитии крыловой пластинки **повторяются** в общей сложности с небольшими изменениями **сотни раз** в процессе развития дрозифилы. На слайдах 30-34 представлены упрощенные схемы этих путей передачи сигналов. Наиболее сложным является EGFR-каскад передачи сигналов. Основные элементы EGFR-каскада показаны на слайде 34. Слева показан процесс созревания и презентации лиганда EGF-рецептора (у дрозифилы EGF-рецептор называется *Drosophila* ER или DER) - белка Spitz (Spi). Две белковых молекулы вовлечены в этот процесс - S (Star) и Rho (Rhomboid) причем S действует в эндоплазматическом ретикулуме, а Rho - в комплексе Гольджи. Справа на слайде показаны наиболее важные звенья EGFR-каскада, который может идти как в соседних клетках, не производящих лиганд Spi (паракринная регуляция - слева на слайде), так и в той же клетке, которая производит лиганд Spi (аутокринная регуляция - справа на слайде). Элементы EGFR-каскада, выделенные жирным шрифтом наиболее многофункциональны.

С димеризующимся после активации EGF-рецептором могут связываться 4 лиганда - Spi, Vn, Grk, Aos. Активируясь, EGF-рецептор инициирует активацию серии белков (например, Drk, Csw, Sos, Dos, Ras1, Ksr). Активация этих компонентов приводит к запуску сначала dMEK, а затем dMAPK киназных каскадов. ERK дифосфорилируется (dp-ERK) и входит в ядро, где активирует и/или ингибирует множество транскрипционных факторов (на слайде 34 показаны Pnt, Yan и dJun). EGFR-каскад полифункционален - он может вызывать как изменение динамики клеточного цикла, так и изменения внутреннего строения клеток индуцирующие морфогенетические изменения.

5. Замечательный пример развития от зачатка до органа - генная сеть развития крыла дрозифилы

Замечательным примером тонкой пространственно-временной интеграции сигнальных каскадов, градиентов морфогенов и инструктивных взаимодействий в процессе развития органа является развитие крыла *Drosophila melanogaster*. Общий вид крыла вы можете увидеть на слайде 35 (буквами отмечены номенклатурные обозначения жилок крыла). На слайде 36 вы можете увидеть каким образом происходит наследование крыловым имагинальным диском экспрессии гена *en*, паттерн экспрессии которого, детерминируется на ранних этапах эмбриогенеза. Вспомните, каким образом детерминируются полосы экспрессии морфогенов до стадии образования клеток, и как образуются зачатки крылового и ножного имагинальных дисков. Один процесс настолько тонко подогнан к другому, что любое малое изменение в предыдущем процессе радикально изменяет или вообще исключает последующий! В развитии везде и всюду так - генная сеть одного процесса обуславливает работу другой, а та - третьей. Великолепная иерархия! Интересно на чем же она держится - на механизме наследования детерминированного состояния - так называемой клеточной памяти - на слайде 37 показан именно этот процесс. Поддержание экспрессии селекторного гена *en* осуществляется с помощью белков так называемого ремоделинга хроматина (Pc, Trx, Ph) которые обеспечивают установление контуров

положительной обратной связи, поддерживающих экспрессию *en*. Ген *en* является селекторным - то есть геном, обеспечивающим детерминацию определенной группы клеток к развитию в определенную ткань. Экспрессия гена *en* обуславливает формирование постериорной (задней) части крыла, из которой в последствие разовьются жилки L1, M, L2, L3 и участки между ними (слайд 35). **Механизм ремоделинга хроматина очень важен** в процессе развития - именно он обеспечивает "клеточную память". Без него практически не обходится ни один процесс детерминации, которых в течение развития может быть сотни тысяч.

На следующем слайде (38) показаны процессы, происходящие на границе постериорного (заднего) и антериорного (переднего) компартментов в развивающемся крыловом имагинальном диске - налицо наличие центрального регулятора *Ci* на котором оканчивается *Nh*-каскад передачи сигналов. Интересно то, что белок *Ci* в неактивированном состоянии (в отсутствии работы *Nh*-каскада) является транскрипционным фактором, подавляющим транскрипцию целой группы (кассеты) генов. В активированном же состоянии белок *Ci* (активаторная форма) изменяет свое поведение на противоположное - вместо того чтобы подавлять транскрипцию генов он ее активирует (см слайд 30). Активаторная форма белка *Ci* активирует, в том числе, транскрипцию гена *dpp* - ген *dpp*, как вы помните, (слайд 19) кодирует морфоген способный к диффузии во внеклеточном пространстве. Градиент белка *Dpp* является организатором морфогенеза крыла (антериопостериорным организатором - слайды 39, 41). Важно, что в клетках воспринимающих своими рецепторами белок *Dpp* (см. слайд 31) в зависимости от его концентрации происходит экспрессия определенных генов. Как вы помните, (слайд 31) *Dpp*-каскад сигналов способен к самоингибированию при высокой концентрации белка *Dpp* во внеклеточном пространстве за счет наработки белка *Dad* - это способствует распространению ответа клеток на морфоген *Dpp* от пирефии его распространения к центру. Итак, *Dpp*- и *Nh*- каскады передачи сигналов тесно взаимосвязаны и обуславливают формирование крыла по антерио-постериорному направлению (слайды 39, 40, 41), причем беглый осмотр мутантов по этим каскадам наглядно подтверждает этот вывод.

Что же с дорсо-вентральным направлением формирования крыла? А там свирепствуют те же закономерности - интеграция сигнальных каскадов, градиентов морфогенов и инструктивных взаимодействий. На слайде 42 вы можете увидеть развертку во времени процесса развития крыла проходящего в его дорсо-вентральном направлении. Здесь вместо *en* селекторным геном, обуславливающим формирование дорсальной части крыла, является ген *ap*. Он также как и *en* запускает сигнальный каскад - Notch-каскад по границе между дорсальной и вентральной частью крыла. Notch-каскад (слайд 33), в свою очередь, активирует ген *wg*. Ген *wg*, как вы помните (слайд 19), также как и ген *dpp* кодирует белок-морфоген способный к диффузии во внеклеточном пространстве. Белок *Wg* запускает *Wg*-каскад реакций (слайд 32) приводящий к росту крыла в определенном направлении, за счет чего ткань, из которой формируется крыло, вытягивается (слайд 42). Как формируются жилки на крыле? Процесс формирования жилок каскаден - на первых этапах определяется препаттерн жилок на крыле - место, где могут сформироваться жилки - на этом этапе важную роль играют морфогены *Wg* и *Dpp*. Затем на главную роль выступают процессы, утончающие жилки (в которых, важную роль играет Notch-каскад). И завершают формирование жилок процессы, инициирующиеся EGFR-каскадом.

6. В чем консервативность процессов развития: повторение в развитии консервативных механизмов детерминации клеток - замечательный пример консервативного механизма детерминации клеток - латеральное ингибирование

Из вышеприведенных примеров немудрено сделать вывод о так называемой "общей теме развития" (интересующиеся могут обратиться к приложению 4) - повсеместном участии ключевых каскадов передачи сигналов в процессе развития. Как же насчет консервативности механизмов детерминации клеток? Процесс латерального ингибирования является наиболее ярким примером этому. В процессе латерального ингибирования, функция которого заключается в ограничении количества клеток детерминированных определенным образом, главную роль играет уже знакомый нам Notch-каскад. На слайде 43 показана серия этапов выбора единой клетки, образующей впоследствии сенсорную щетинку. Заметьте тонкую деталь - наложение паттернов экспрессии генов *Achaete*, *Scute* и *Emc* само по себе не объясняет почему влияние белков *Achaete* и *Scute* ощущается **только в клетках с самым наименьшим уровнем экспрессии гена *Emc***. На следующем слайде (44) ситуация проясняется - дело в том, что в норме ген *Notch* кодирующий рецептор, и гены *Delta*, *Serrate* кодирующие трансмембранные белки - лиганды Notch экспрессируются в каждой из клеток. Белок Notch репрессирует дифференцировку по нейральному пути (маркирующуюся экспрессией генов *Achaete* и *Scute*). Следовательно, каждая клетка кластера способна ингибировать нейральную дифференцировку и быть ингибируемой. Дело в том, что случайные изменения соотношения концентраций этих двух белков в соседних клетках, могут усиливаться по контуру с положительной обратной связью (верхний рисунок слайда 44). В итоге клетки с высокой активностью *Delta* окружаются клетками с высокой активностью Notch. Важно то, что этот процесс повторяется сотни раз в развитии организма.

Интеграция высокого уровня генных сетей развития на примере генных сетей развития нервной системы насекомых и позвоночных и механизмов детерминации тканей сегментов тела насекомых и позвоночных

Рассмотренные нами выше генные сети процессов развития на уровне межклеточных взаимодействий локальны (интересно, почему нельзя так назвать процессы установления осей тела?) - они не обеспечивают формирование организма в целом - они важны только при формировании какой-либо его части. Далее мы рассмотрим глобальные генные сети - интегрирующие развитие всего организма. Как обычно, пойдем от более конкретных примеров.

1. Миграция клеток и аксонов в развитии нервной системы позвоночных и насекомых

На слайде 45 показан нейрон, мигрирующий в определенное направление. В этом процессе ключевой структурой детерминирующей рост аксона и передвижение нейрона является конус роста. Именно конусом роста среда "опробывается" на наличие аттрактантов роста и репеллентов и на наличие тропинок, по которым возможно передвижение (слайд 47). Важно, что процессы миграции клеток чрезвычайно распространены в эмбриогенезе всех видов высших животных (а, например, у хордовых они вообще играют чуть ли не главную роль в развитии). Для конуса роста/миграции каждой клетки можно строить простые генные сети реагирования на окружающую ситуацию - ответ на окружающую среду может быть двояким - либо рост/миграция либо его/ее отсутствие (слайд 46). Такие генные сети, уже построены для множества нейронов дрозофилы - благо их не так много как у человека - и формализованы в так называемые

карты нейробластов - слайд 50. На первый взгляд процесс миграции клеток очень локальный однако, эти локальные процессы прямым образом детерминируются глобальными - разделением тела по передне-задней и спино-брюшной оси на фрагменты экспрессирующие определенные группы генов (слайды 48, 49). Разделение тела на фрагменты происходит в результате работы генных сетей имеющих гомеобокс-содержащие гены - гомеозисные гены (слайд 51) (заметьте, селекторные гены, упомянутые ранее, *en* и *ap* имеют гомеобокс-кодирующие последовательности).

2. Роль Нох-генов в иннервации у позвоночных

Интересно то, что механизмы, интегрирующие процессы развития всего организма могут быть также зависимы от процессов миграции – например, мигрирующие клетки нервного гребня позвоночных индуцируют паттерн экспрессии гомеобокс-содержащих генов в эктодерме сходный с паттерном экспрессии гомеобокс-содержащих генов в нервной трубке (слайд 49). Таким образом, одни части тела могут на некоторый период развития быть организатором развития всего тела, и, следовательно, генные сети их развития будут в нашей терминологии глобальными генными сетями развития организма.

3. Нох-гены - центральные регуляторы генных сетей интеграторов морфогенеза: две основные функции Нох-генов

Гомеобокс-содержащие гены кодируют транскрипционные факторы. Они, как правило, имеют высокую степень как структурной, так и функциональной гомологии у организмов, принадлежащих к определенному таксономическому классу и организованы в кластер. Наиболее популярны исследования НОМ/Нох-генов - группы гомеобокс-содержащих генов, продукты которых участвуют в морфофункциональной спецификации сегментов тела. Причина этого в том, что, как правило, домены активности определенных Нох-генов в эмбрионе и, даже иногда, время активации их экспрессии (например, у позвоночных) коррелирует с порядком их расположения в кластере (слайды 52). Еще один немаловажный фактор - это наличие Нох-кластера у всех высших животных (интересующимся эволюционными аспектами Нох-кластера необходимо обратиться к приложению 5).

Большинство генов, экспрессию которых регулируют Нох-белки, являются генами, кодирующими компоненты путей передачи сигнала и транскрипционные факторы. Также известно, что целевые гены действия Нох-белков экспрессируются строго ткане- и органоспецифично - их экспрессия контролируется комбинацией регуляторных молекул (собственно Нох-белками, тканеспецифичными белками и эффекторными белками сигнальных путей) связывающихся с различными модулями их энхансеров. Ярким примером этого может служить генная сеть спецификации висцеральной мезодермы 7-го и 8-го парасегментов эмбриона *Drosophila* Нох-белками *Ubx* и *abd-A* (слайд 53 - правый рисунок) и строение энхансеров генов *wg* и *dpp*. Обратные связи этой генной сети обеспечивают устойчивость системы - минимизацию случайных флуктуаций уровня экспрессии целевых генов во время развития.

Следовательно, необходимо различать как минимум 2 различные функции Нох-генов - морфофункциональную спецификацию целых сегментов тела и локальную дифференцировку отдельных клеток, тканей и органов внутри сегмента (интересующимся функциональными аспектами Нох-генов необходимо обратиться к приложению 6). Роль Нох-генов в морфофункциональной спецификации целых сегментов тела обнаруживается в, радикальных, гомеозисных изменениях морфологии сегментов при мутациях в этих генах (слайд 51, 53 - левый рисунок). Явление гомеозиса в данном случае обусловлено

репрессией Нох-белками антериорных (по положению в кластере) Нох-генов экспрессии постериорных и проявляется как преобразование антериорного сегмента в постериорный. Спецификация Нох-генами сегментов тела эпигенетически наследуема. Важнейшую роль в эпигенетически наследуемых изменениях опять так и играют семейства белков Polycomb, Polyhomeotic и Trithorax (вспомните аппарат клеточной памяти). Белки этих семейств, напоминая, ответственны за ремоделинг хроматина в потомках единожды специфицированной клетки, например, за установление петель положительных обратных связей регуляции экспрессии Нох-генов. Следовательно, ремоделинг хроматина поддерживает постоянную разнокачественность клеток разных частей тела (сегментов или групп сегментов) многоклеточного организма при идентичном наборе генов содержащемся в них. Напротив функция локальной дифференцировки отдельных клеток и тканей внутри сегмента не требует длительного поддержания экспрессии Нох-генов в ряду клеточных поколений, и не зависит от ремоделинга хроматина. Например, в случае образования слюнных желез *Drosophila* вскоре после активации экспрессии целевых генов белком *Scr* экспрессия гена *Scr* в тканях слюнной железы утрачивается (слайд 53 - правый рисунок).

Есть ли общность в структурно-функциональных особенностях генных сетей развития животных и растений

Сравнивая развитие плодовой мушки и (слайд 54) – *Arabidopsis thaliana* можно заметить, что развитие организма дрозофилы и цветка у арабидопсиса начинается с определения осей тела (радиальной и адаксиально-абаксиальной у цветка арабидопсиса и антерио-постериорной и дорсо-вентральной у дрозофилы). Затем идет установление и дифференцировка метамеров (определение и спецификация мутовок цветка арабидопсиса, и установление и дифференцировка сегментов дрозофилы). Наконец, наступает этап формирования функциональных органов (органы цветка арабидопсиса и органы имаго дрозофилы).

Однако цветок - это всего лишь один из органов организма растения! Дело в том, что сосудистые растения и высшие животные (Bilateria) различаются по типу индивидуального развития. Итеративный тип развития растений характеризуется относительно поздней и относительно слабой утратой клеточной тотипотентности (способности к воспроизведению из одной клетки сомы всего организма) и циклическим воспроизводством отдельных органов в течение жизни. Для животных же характерен принципиально иной - линейный тип развития, в ходе которого план тела практически со всеми его органами формируется только один раз в ходе четкой линейной во времени смены этапов развития. При таком типе развитии клетки рано теряют тотипотентность. Таким образом, процесс развития высших животных сопоставим не столько с развитием высших растений в целом, сколько с развитием их отдельных органов.

ABC модель развития цветка и Нох-гены и топология графа генной сети развития цветка

Наиболее глубоко изучена генная сеть развития цветка *Arabidopsis thaliana* характеризующаяся, так же как и генные сети развития животных блочностью и иерархичностью (слайд 55). Формирование определенных органов цветка детерминировано концентрическими кругами паттернов экспрессии определенных групп MADS-генов в меристеме цветка: А (семейство AP1-подобных белков), В (семейство

AP3/PI-подобных белков) и С (семейство AG-подобных белков) (слайды 56-60). Интересно, что только лишь у семенных растений группы MADS-генов А, В и С отвечают за формирование цветка (интересующимся эволюционными аспектами MADS-генов можно обратиться к приложению 7).

Развитие цветка определяется сложной генной сетью контролирующей формирование меристемы соцветия, образование на ней меристемы цветка, дифференцировку зачатков органов цветка и их спецификацию в органы (слайд 61). Подсеть А контролирует вегетативное состояние меристемы побега. Основными компонентами этой сети являются гены TFL1 и AP1, при этом продукт гена TFL подавляет активность гена AP1. Активность гена AP1 необходима для индукции цветения. Поэтому подавление гена AP1 обеспечивает устойчивое вегетативное состояние меристемы побега. Подсеть В обеспечивает индукцию цветения. Интегратором всех сигналов, индуцирующих цветение (удлинением светового дня, температура, питательные вещества, гормоны и т.п.), является ген LFY. Этот ген образует контур положительной обратной связи с геном AP1, за счет чего уровень LFY и AP1 быстро растет, ингибируя активность гена TFL1, подавляющего активность LFY и AP1 в вегетативной меристеме. Таким образом, ген TFL1 является триггером и может находиться в двух устойчивых состояниях. При его подавлении обеспечивается необратимость перехода к цветению. В свою очередь, продукт гена LFY запускает пять других подсетей, контролирующих формирование органов цветка: С - чашелистиков, D - лепестков, E - тычинок, F - плодолистиков.

Выводы - основные идеи лекции

Генные сети эмбриогенеза и онтогенеза являются генными сетями-интеграторами морфогенетических процессов и характеризуются блочностью, иерархичностью и разнесенностью во времени и в пространстве, что обеспечивает гетерогенизацию процессов развития и обуславливает формирование множества морфотипов как клеток и тканей, так и организмов на принципиально единой молекулярной основе.

Вместо заключения. Обращаясь к эволюции морфогенеза.

Еще в 1974 году, Вилсон и соавторы сформулировали представление о различных причинах морфологической эволюции многоклеточных организмов - эволюции регуляторных и кодирующих последовательностей генома, доказав возможность морфологической эволюции обусловленной изменением в некодирующих областях генома. Работы Вилсона и соавторов были очень просты и впечатляющи для того времени, например, различие аминокислотных последовательностей белков гибридизирующихся видов лягушек оказалось гораздо выше, чем различие аминокислотных последовательностей белков гибридизирующихся видов млекопитающих. Сегодня уже общеизвестно, что виной различия топологий эволюционных деревьев построенных по различным участкам генома является несовпадение скоростей эволюции различных частей генома. Проведенные совсем недавно исследования с помощью микроаррэй-технологий исследования по вариативности паттернов экспрессии генов у группы видов *Drosophila melanogaster* прямо свидетельствуют о том, что по большей мере видовые различия обусловлены именно различиями в регуляции экспрессии генов. Причем эти же данные подтверждают значительное преобладание режима нейтральной эволюции регуляторных последовательностей обуславливающих экспрессию простых ферментов по сравнению с

транскрипционными факторами и переносчиками сигналов (всех интересующихся просим к приложению 8). Следовательно, эволюция морфогенеза, по-видимому, базируется на гетерогенизации процессов развития - гентеротопизации и гетерохронизации паттернов экспрессии. Как это отражается на графах генных сетей развития? Хотя это уже совсем другая история - на будущую лекцию. Спасибо за внимание.

Приложения

Приложение 1 – статья “Генетические механизмы кодирования биологической сложности”.

Приложение 2 – статья “Генетические механизмы морфологической эволюции”.

Приложение 3 – информация представленная на сайте FlyMove в разделе “Axis specification and gradients” <<http://flymove.uni-muenster.de/Processes/AxisSpec/AxisSpecpage.html?http&&flymove.uni-muenster.de/Processes/AxisSpec/AxisSpecTxt.html>>

Приложение 4 – статья “The evolution of signalling pathways in animal development”

Приложение 5 – статьи “Evolution: Hox genes and the cellared wine principle”, “Hox clusters and bilaterian phylogeny”

Приложение 6 – статья “Beyond homeosis - Hox function in morphogenesis and organogenesis”

Приложение 7 – статья “A short history of Mads-box genes in plants”.

Приложение 8 – статья “Evolution of gene expression in the *Drosophila melanogaster* subgroup”