

А.Ф. Смирнов, А.В. Трухина

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
МЕХАНИЗМЫ
ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА
У ЖИВОТНЫХ



Нестор-История
Санкт-Петербург
2016

УДК 575.18
ББК 28.04
С506

Издание осуществлено при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
по проекту № 16-14-00134
Не подлежит продаже



Смирнов А. Ф., Трухина А. В.

С506 Молекулярно-генетические механизмы детерминации пола у животных. —
СПб. : Нестор-История, 2016. — 168 с.

ISBN 978-5-4469-1003-8

Книга содержит фактический материал о формировании у животных такого морфологически и физиологически сложного признака организма, как пол. В ней рассмотрены общие представления о поле и принципы его генетической детерминации, а также механизмы определения пола у разных животных, начиная от дрозофилы и заканчивая млекопитающими. Кроме того, в монографии дана характеристика главных полоопределяющих генов у разных объектов, изложены принципы компенсации дозы генов и представлена «комплементарная» система детерминации пола. Также рассмотрены представления о гаметном поле, его связи с соматическим полом и данные о механизмах вхождения гоноцитов в мейоз. Приведены случаи отклонения от классической системы детерминации пола и способы получения особей нужного пола у домашних животных. Произведено сравнение известных полоопределяющих генов и механизмов детерминации пола.

Научный труд представляет интерес для широкого круга специалистов — студентов биологических специальностей вузов, аспирантов и научных сотрудников, работающих в области генетики, биологии развития и зоологии.

УДК 575.18
ББК 28.04

ISBN 978-5-4469-1003-8



9 785446 910038

© А. Ф. Смирнов, А. В. Трухина, 2016
© Издательство «Нестор-История», 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	5
Общее представление о поле	8
Глава 1. Особенности определения пола у насекомых	12
1.1. Механизмы определения пола у дрозофилы	12
1.2. Компенсация дозы гена у дрозофилы	18
1.3. Механизмы определения пола у домашней мухи (<i>Musca domestica</i>) ...	23
1.4. Механизмы определения пола у перепончатокрылых (<i>Hymenoptera</i>) и чешуекрылых (<i>Lepidoptera</i>)	24
Глава 2. Механизмы определения пола у круглых червей (нематоды)	29
Глава 3. Механизмы детерминации пола у низших позвоночных	36
3.1. Особенности определения пола у рыб	36
3.2. Пол у амфибий	40
3.3. Пол у рептилий. Определение пола при воздействии температуры ..	44
Глава 4. Механизмы определения пола у птиц	51
4.1. Половые хромосомы у птиц	51
4.2. Развитие гонад у птиц	54
4.3. Гормоны и половая дифференцировка у птиц	56
4.4. Полоопределяющие гены у птиц	58
4.5. Изменение пола у птиц	64
4.6. Компенсация дозы генов и определение пола у птиц	65
Глава 5. Пол у утконоса — <i>platypus Ornithorhynchus anatinus</i>	70
Глава 6. Механизмы определения пола у млекопитающих	73
6.1. Принципы детерминации пола у млекопитающих	73
6.2. Семенникопределяющие гены	75
6.3. Схемы детерминации пола	84
Глава 7. Половые хромосомы, пол и их эволюция	94
7.1. Y-хромосома и определение пола	94
7.2. Эволюция половых хромосом	102
7.3. Индикация эволюционных изменений пола. Митохондриальная ДНК	105
7.4. Y-хромосома и эволюция	105
7.5. X-хромосома	107
Глава 8. Особенности определения судьбы половых клеток	110
8.1. Половые клетки млекопитающих, дрозофилы, нематоды	110
8.2. Линия половых клеток и миграция первичных гоноцитов у птиц. Первичные половые клетки	119

8.3. Пол генеративных клеток у дрозофилы	122
8.4. Пол генеративных клеток у нематоды	125
Глава 9. Определение пола доимплантационных эмбрионов у домашних животных	126
Глава 10. Отклонения в системах определения пола	130
10.1. Разнообразие систем определения пола. Определение пола без участия гена <i>sty</i> или Y-хромосомы у млекопитающих	130
10.2. Разнообразие полоопределяющих генов у разных объектов	137
Глава 11. Случаи инверсии и неправильного развития пола у домашних животных	144
Литература	146

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- А — аутосома
БДУ — бромдезоксисуридин
КПД — коэффициент полезного действия
м.п.н. — миллион пар нуклеотидов
п.н. — пар нуклеотидов
ПДРФ — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
ППК (PGC — primordial germ cell) — первичные половые клетки
ПЦР — полимеразная цепная реакция
РНК — рибонуклеиновая кислота
РНП — рибонуклеопротеин
СЯЛ (NLS-nuclear localization signals) — сигнал ядерной локализации
т.п.н. — тысяча пар нуклеотидов
ЦНС — центральная нервная система
2n — диплоидный набор хромосом
AFLP — полиморфизм длин амплифицированных фрагментов
AMH (MIS) — антимюллеровский гормон
AR — рецептор андрогена
AR-T — комплекс рецептора андрогена (AR) с тестостероном (T)
ASEs (autosomal signal elements) — сигнальные элементы аутосом, белки-денумераторы
В — дополнительные хромосомы
BSA — бычий сывороточный альбумин
CASI (cell autonomous sex identity) — клеточно-автономный механизм половой идентичности
СpG-сайтов — CpG-островки, часто подверженные метилированию
csd (complementary sex determination) — комплементарная детерминация пола
CSE (chromatin sites entry) — хроматиновые точки вхождения
DCC (dosage compensation complex) — комплекс дозовой компенсации
d_N — несинонимичные замены
DOP-ПЦР — капельная ПЦР

- d_s — синонимичные замены
DSD — нарушение сексуального развития
 E_2 — эстрадиол
ER — эстрогеновый рецептор
ER- E_2 — комплекс эстрогенового рецептора (ER) с эстрадиолом-17 β (E_2)
ESD (enviromental sex determination) — средовое определение пола
FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*
FPT (female promoting temperature) — самкоспецифическая температура
FSH — фолликулстимулирующий гормон
FSHR — рецептор фолликулстимулирующего гормона
G1 — стадия митоза
GLI (glioma associated oncogene) — глиома-ассоциированный онкоген
GSC — стволовые половые клетки
GSD (genetical sex determination) — генетическое определение пола
GSD-TE (GSD plus temperature effects) — система совместной генетической и средовой детерминации пола
H3.3 — гистон H3.3
H4 — гистон H4
HAS (high-affinity site) — сайт высокой аффинности
HMG-бокс — комплекс белков высокой мобильности
HV-домен — пролин-богатый гипервариабельный домен
IR1-2, IR2-2, IR3-2 — инвертированные повторы
LAMP (loop-mediated isothermal amplification) — изотермальная амплификация, опосредованная петлей
LG — группа сцепления
LH — лютеинизирующий гормон
LHRH — рилизинг-гормон лютеинизирующего гормона
LINE1 (long interspersed nuclear element 1) — длинный внутренний ядерный элемент 1
MAT α и MAT β — типы спаривания у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*
MHC — главный локус гистосовместимости
MNM-область — высокометилированная область MNM
ml-csd — мультилокусной csd
MPT (male promoting temperature) — самецспецифическая температура
MRE (MSL recognition elements) — элементы узнавания MSL
n — гаплоидный набор хромосом
P1–P8 — серия палиндромов
P1 — поздний промотор гена *sxl*
PAR — псевдоаутосомный район
PSD — полигенное определение пола
RA (retinoic acid) — ретиноидная кислота

- RS-домен — аргинин/серин-богатый домен
- slCSD — система определения пола множественными аллелями одного локуса
- sl-csd (single locus csd) — однолокусный csd
- SNP (single nucleotide polymorphism) — полиморфизм единичных нуклеотидов
- SSC — сперматогониальные стволовые клетки
- STM (stem cell factor) — фактор стволовых клеток
- STS (sequence-tagged site) — отмеченные блоки нуклеотидов
- SU(VAR)3-7, HP1 — маркеры гетерохроматиновых белков
- T — тестостерон
- TDF — фактор детерминации семенников
- TSD (temperature sex determination) — температурное определение пола
- TSP — температурочувствительный период
- UTR (untranslated region) — нетранслируемый район
- X, Y, Z, W — половые хромосомы
- XSEs (X-signal elements) — сигнальные элементы X-хромосомы, белки-нумераторы
- ZUF — F-фактор, или Z upregulating factor

ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ПОЛЕ

Пол — это совокупность морфологических и физиологических особенностей организма, обеспечивающих половое размножение, сущность которого сводится к оплодотворению, т. е. слиянию мужских и женских половых клеток (гамет) в зиготу, из которой развивается новый организм.

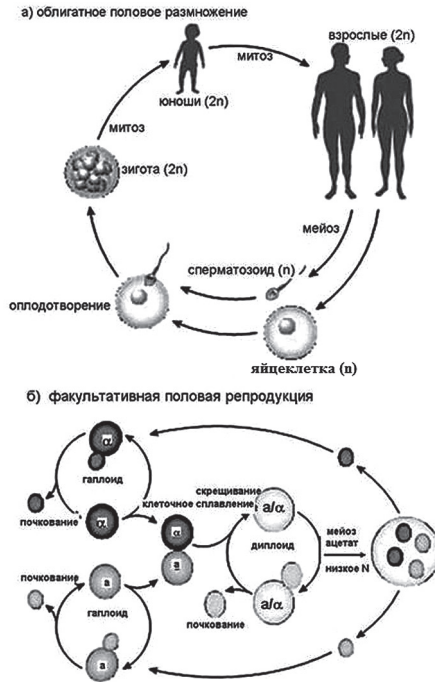
С половым размножением связано множество нерешенных вопросов. Так, до сих пор обсуждаются его преимущества и недостатки по сравнению с бесполом вариантом размножения, а также их эволюционная связь. К основным недостаткам системы бесполого размножения относят меньшую приспособленность к условиям окружающей среды и неспособность элиминировать вредные мутации. В то же время половой способ размножения предоставляет лучшие возможности для приспособления к часто меняющимся условиям окружающей среды, обеспечивает рекомбинацию родительских наборов генов и рассредоточивает в одном геноме вредные мутации, которые в последующих поколениях удаляются. Половое размножение рассматривают в качестве одного из механизмов гомеостаза вида. Благодаря этому механизму многие виды имеют эволюционное преимущество.

Принципы определения пола у животных тесно связаны с такими фундаментальными проблемами генетики, как: 1) биологическая значимость обедненных генами и относительно постоянно компактизированных в клеточном цикле гетерохроматиновых районов хромосом; 2) возможность получения гибридных геномов при отдаленной гибридизации; 3) иммортализация (бессмертие) отдельных клеточных линий и др. Кроме того, наличие гетероморфных половых хромосом у некоторых видов и соответствующего механизма детерминации пола рассматривается как механизм ускорения видообразования. Об этом свидетельствует анализ скорости видообразования у птиц, крокодилов, ящериц, змей и черепах. Безусловно, этот важнейший вопрос требует дальнейшего рассмотрения (Phillips, Edmands 2012; Demuth 2014).

Рис. 1. Основные типы полового размножения. В этот процесс вовлекаются особи противоположного пола или типа спаривания.

а) Облигатное половое размножение (на примере человека). Специализированные клетки ($2n$) в гонадах подвергаются мейозу и формируют гаплоидные (n) гаметы (спермии или яйцеклетки). Сперматозоиды и яйцеклетки сливаются, образуя диплоидную зиготу ($2n$), которая развивается в многоклеточный организм ($2n$). Взрослый организм диплоиден с гаплоидными гаметами.

б) Факультативная половая репродукция (на примере жизненного цикла дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*). Гаплоидные дрожжи размножаются с помощью почкования. Спаривание осуществляется между штаммами противоположного типа спаривания ($MATa$ и $MAT\alpha$) и приводит к формированию диплоидных клеток. Последние могут подвергаться мейозу и образовывать гаплоидные споры. Зрелый организм может быть диплоидным или гаплоидным. Гаметы — гаплоидные клетки. Многие грибы поддерживают гаплоидный жизненный цикл и становятся диплоидными только после оплодотворения (адаптировано по Ni et al. 2011).



Огромное разнообразие вариантов полового размножения и соответствующих им версий определения пола привлекает особое внимание. Их классификация затруднена. В настоящее время различают два типа полового размножения: облигатный (у большинства животных и человека) и факультативный (у грибов) (рис. 1). Обычно говорят о соматическом поле применительно к совокупности клеток многоклеточного организма, исключая половые, и гаметном поле, подразумевая превращение первичных недифференцированных половых клеток в зрелые сперматозоиды или яйцеклетки. Становление соматического и гаметного пола в разной степени взаимосвязано у представителей разнообразных систематических групп. Дифференциация пола (его фенотипическое проявление) включает два последовательных этапа: первичное определение пола и появление вторичных (внешних) половых признаков. Под первичным определением

пола понимают формирование гонады (репродуктивного органа соматической природы) самки или самца (яичника или семенника соответственно). Считают, что принципиальная схема этого процесса консервативна.

Известны определенные сигнальные пути, активирующие ключевые гены детерминации и дифференцировки пола. Эти гены, в свою очередь, включают детерминанты второго уровня, отвечающие за гонадогенез и дифференцировку половых признаков. Некоторые компоненты этой системы являются общими у разных животных, а некоторые различаются. В табл. 1 представлены принципиальные схемы определения пола у разных представителей животного мира и обозначены соответствующие гены.

Нами будут рассмотрены типы генетической детерминации и дифференцировки пола в основном у многоклеточных животных объектов. Определение пола является как генетическим, так и экологическим процессом, при этом пол индивидуума устанавливается альтернативным физиологическим решением. Предполагают существование двух основных механизмов детерминации пола: генетический (GSD — *genetical sex determination*) и экологический (ESD — *environmental sex determination*). Генетически пол определяется в момент зачатия и зависит от генетических различий между самцами и самками, а экологически пол зависит от внешних условий при отсутствии существенных

Таблица 1

Последовательные этапы генетического контроля определения пола у некоторых представителей животного мира (адаптировано по Смирнов, Жимулев 2000)

Механизм контроля	организм				
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>	<i>Mammalia</i>
Контролирующий сигнал	Транскрипция HO-гена	Соотношение X-хромосом и аутосом	Температура внешней среды	Y-хромосома	
Ключевой ген	MAT (a/a)	<i>her</i> (+/-)	<i>sxl</i> (+/-)	TDF	TDF- <i>sry</i>
Гены, контролирующие гонадогенез (полоопределяющие)	—	<i>xol1, sdc1, sdc2, her1, tra2, tra3, fem1, fem2, fem3, tra1</i>	<i>sis-a, sis-b, da, liz, fl(2)d, sxl, tra1, tra2, dsx, ix</i>	Эффекторные молекулы, гормоны	Гормоны
Гены, определяющие половую дифференцировку	+/- *	+/-	+/-	+/-	+/-

*+ и — означают включение и выключение соответствующего гена.

генетических различий и определяется после оплодотворения в ответ на окружающие условия. Для птиц и млекопитающих характерно только GSD, а для крокодилов — TSD (одна из форм ESD). Кроме того, выделяют две разновидности генетической системы определения пола: с гетерогаметными самцами (XY, млекопитающие) и гетерогаметными самками (ZW, птицы). У амфибий встречаются обе генетические системы, а для ящериц, змей, черепах и костистых рыб описаны все возможные варианты определения пола (как генетические, так и экологические).

Половая дифференциация — это процесс, посредством которого недифференцированные гонады развиваются в яичник или семенник. Он же охватывает другие аспекты дифференциации, в том числе развитие половых канальцев в гениталиях и установление полоспецифических различий в головном мозге.

В рамках небольшого издания невозможно рассмотреть все аспекты генетического контроля пола. Мы предполагаем сосредоточиться на животных объектах, поскольку дифференцированные по полу двудомные растения встречаются лишь у 1–5% растительных видов, и остановимся на молекулярно-генетических достижениях последних лет. Начнем рассмотрение данной фундаментальной проблемы с детерминации пола у плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, комнатной мухи *Musca domestica* и ряда представителей отряда Перепончатокрылые (*Hymenoptera*).

Глава 1

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА У НАСЕКОМЫХ

1.1. Механизмы определения пола у дрозофилы

В 1921 году один из основоположников современной генетики Кэлвин Бриджес обнаружил у *D.melanogaster* несколько самок с триплоидным набором хромосом (3X:3A). После скрещивания таких самок с нормальными самцами (2X:2A) в их потомстве наряду с нормальными самками были обнаружены особи с необычным проявлением половых признаков. Все потомство распалось на классы в зависимости от соотношения половых хромосом (X) и аутосом (A):

1. 3X:3A — триплоидные самки.
2. 2X:2A — нормальные самки (соотношение X к A равно 1).
3. (2X:2Y):2A — самки.
4. XY:2A — нормальные самцы с соотношением X:A хромосом 0,5.
5. 2X:3A и (2X+Y):3A — интерсексы (по терминологии К. Бриджеса) с варьирующим соотношением X:A от 0,5 до 1. Это особи со смешанным проявлением мужских и женских признаков. У таких мух либо полностью отсутствовали секторы тела, детерминированные по полу, либо в ходе развития до определенного момента формировались органы, присущие одному полу, а затем органы другого пола.

6. X:3A — сверхсамцы — особи с гипертрофированными признаками самца, однако стерильного (X:A меньше 0,5).

7. 3X:2A — сверхсамки — особи с ненормально развитыми яичниками и другими нарушениями признаков пола (X:A больше 1).

Во всех тех случаях, когда появляются самки, соотношение числа X-хромосом к числу аутосом составляет единицу. Наличие мужской Y-хромосомы не влияет на нормальное развитие самки.

По К. Бриджесу пол у дрозофилы определяется балансом числа половых хромосом и набора аутосом, при этом Y-хромосома не играет в его определении никакой роли (балансовая теория пола). Действительно, в Y-хромосоме располагаются гены 11 факторов фертильности, влияющих на формирование сперматозоидов и не принимающих участия в формировании половых признаков у самца. Кроме того, известно, что особи XO у дрозофилы — самцы.

У дрозофилы открыты многочисленные гены, влияющие на правильную дифференцировку пола. Среди них такие гены, как *sxl* (sex lethal), *da* (daughterless), *sis* (sisterless), *tra* (transformer), *dsx* (double sex). В связи с этим появилась возможность генетической интерпретации балансовой теории пола. Предполагают, что «соотношение» числа X-хромосом и аутосом улавливаются геном *sxl* на ранних стадиях эмбрионального развития. Этот ген, в свою очередь, контролирует одновременно три направления дифференцировки (рис. 1.1-1): 1) реализация дозовой компенсации; 2) формирование половых признаков в соматических клетках; 3) формирование половых признаков в соматических клетках; 3) формирование половых признаков в зародышевых клетках зародышевого пути. По данным швейцарского ученого Р. Нитегера, на начальных этапах формирования пола у эмбрионов дрозофилы действуют продукты генов *sis-a* и *sis-b* (т. н. XSEs — X signal elements, белки-нумераторы), расположенных в X-хромосоме, и гена *da*, расположенного в аутосоме (т. н. ASEs — autosomal signal elements, белки-денумераторы). Продукт гена *da* поступает в яйцеклетку из организма матери. Его количество всегда соответствует двум дозам, т. е. он считывается с генов, локализованных в двух материнских аутосомах. Количество продуктов, считанных с генов *sis-a* и *sis-b*, зависит от того, сколько X-хромосом у особи — одна или две. Поэтому комплекс белков SIS/DA имеет отношение составляющих его компонентов 1:2 у самцов или 2:2 у самок.

Наблюдения за гаплоидными и триплоидными личинками показали, что пол у дрозофилы определяется скорее не соотношением X:A, а числом X-хромосом. У дрозофилы найдены продукты пяти X-хромосомных генов — *sis-a*, *sis-b* (scute), *runt*, *sis-e* (unpaired), *dm* (diminutive) (так называемые нумераторы) — и ряд белковых кофакторов, включая аутосомный продукт гена *deadpan*. Один из генов — очевидно, *da* (daughterless) — кодирует белок, который выполняет функции аутосомного фактора контроля (ASEs) и относится к так называемым денумераторам. Через 3 часа после оплодотворения во время



Рис. 1.1-1. Генетическая интерпретация балансовой теории пола у *D.melanogaster*. Первичный сигнал, зависящий от соотношения числа X-хромосом и аутосом, контролирует все аспекты половой дифференцировки через действие ключевого гена *sxl*. У самок, имеющих отношение X:A равное единице, ген *sxl* активен. У самцов, имеющих соотношение X:A равное 0,5, ген *sxl* не активен. Активность гена *sxl* регулирует развитие процессов, находящихся под его контролем: дозовую компенсацию, развитие половых признаков в соматических и зародышевых клетках (адаптировано по Жимулев 1997).

формирования бластомеры продукты генов *sis-a*, *scute*, *runt* стимулируют активность раннего *sxl*-промотора. Его же полная активация достигается с помощью продукта X-хромосомного гена *unpaired* через *Janus*-киназу. У диплоидных самок (XX:2A) необходимый для включения *sxl*-промотора уровень UNPAIRED достигается к 12-му делению клеток бластомеры, у гаплоидных (XO:2A) — к 14-му, а у триплоидов (XXX:3A эмбрионы) — только в некоторых клетках (в результате образуются частичные гинандроморфы).

Продукты названных выше генов присоединяются к регуляторной области ключевого гена *sxl*. Этот ген содержит 8 участков, кодирующих последовательность аминокислот (экзонов), разделенных некодирующими районами (интронами). У него также есть два участка, стимулирующих транскрипцию РНК с данного гена (промоторы): ранний и поздний. Только в том случае, когда комплексный белок SIS/DA содержит две дозы SIS, он может активировать начало транскрипции с раннего промотора (рис. 1.1-2).

У самок транскрипт гена *sxl* не содержит экзон 3 со стоп-кодоном. На стадии бластомеры в результате трансляции этого транскрипта формируется полноценный белок SXL, активирующий транскрипцию гена *tra*, который, далее взаимодействуя с белком гена *tra2*, регулирует образование специфической РНК для самок *dsx^F* (*doublesex*). Наличие DSX^F у самок способствует вовлечению в данный каскад гена *ix*. Белки генов *dsx^F* и *ix* инактивируют многие гены, специфичные для самцов, и в конечном итоге развивается самка. По этой схеме формируются внешние (соматические) половые признаки самки (рис. 1.1-2, б). У самцов при активировании позднего промотора (P1) гена *sxl* считается третий экзон, в котором расположен стоп-кодон UGA. На нем трансляция останавливается, и белок получается усеченным. При отсутствии нормально функционирующего белка SXL ген *tra* образует короткую нефункциональную молекулу белка (трансляцию блокирует кодон UAG во втором экзоне). У самцов нарушение сплайсинга гена *sxl* приводит к включению в транскрипт специфического экзона, содержащего стоп-кодон, и белок не синтезируется. В отсутствие белка SXL *msl-2*-иРНК не транслируется и происходит дозовая компенсация. Кроме того, в отсутствие нормального белка TRA начинают транскрибироваться самецспецифические гены *dsx* и *fru* (рис. 1.1-2, а). Последняя из них транслируется в транскрипционный фактор типа цинковых пальцев — BTZ, который ответственен за все аспекты, связанные с центральной нервной системой (ЦНС) у самцов.

Белок гена *tra2* присутствует у обоих полов. В отсутствие функционального продукта гена *tra* у самцов не образуется нормальный

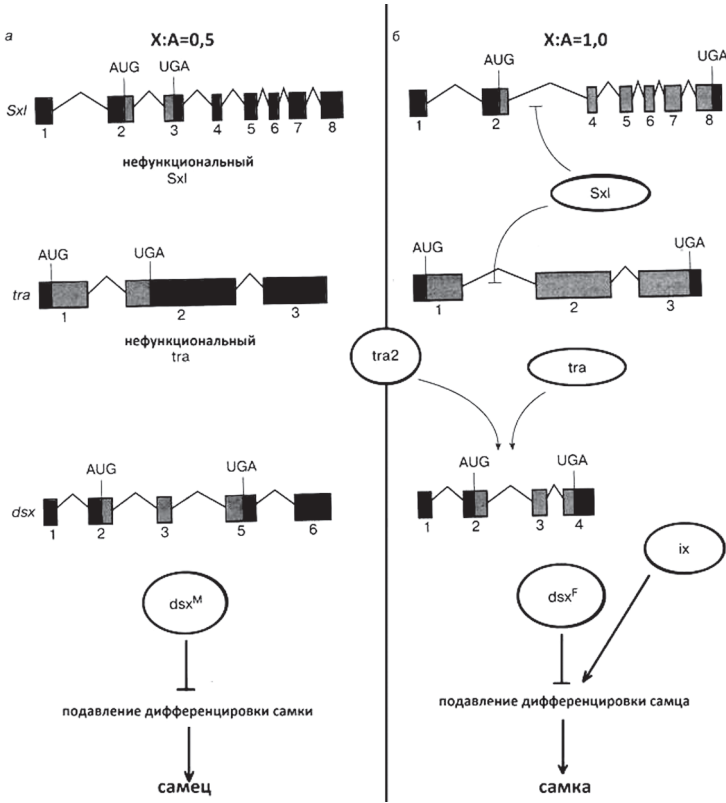


Рис. 1.1-2. Каскад белковых взаимодействий, приводящих к формированию соматических половых признаков самца (а) и самки (б). В каскад вовлечены гены *sxl*, *tra*, *tra2*, *dsx*. Прямоугольники обозначают кодирующие части генов — экзоны. Темные части генов представляют собой участки, кодирующие аминокислоты (адаптировано по Смирнов, Жимулев 2000).

мультиферментный комплекс TRA/TRA2. Более того, при отсутствии нормальных продуктов генов *tra* и *tra2* формируется белок DSX^M . Он репрессирует развитие признаков женского пола. Недавно было показано, что белок Nito (продукт гена *spenito-nito*) контролирует альтернативный сплайсинг *sxl*-мРНК, взаимодействуя с соответствующим SXL-белком и пре-мРНК и таким образом вовлекая SXL в саморегуляцию (Yan, Perrimon 2015).

Дифференциация пола и появление соответствующих ему признаков, в частности поведенческих, у дрозофилы связаны с первичным определением пола. Так, полноценный белок гена *sxl* приводит к активности *tra* и *tra2*, а они, в свою очередь, контролируют появление

регуляторов транскрипции генов *fru* (fruitless), *dsx* (dissatisfaction), *dsx*, *fit* (female specific independent of transformer). Продукт гена *dsf* регулирует дифференциацию пола вне нервной системы и некоторые аспекты полового поведения (courtship — ухаживания), а *fru* влияет на развитие центральной нервной системы, необходимое для ухаживания, развитие мускулов и т. д. Другие важные для пола гены контролируют целый ряд признаков. Так, ген *tsx* (turn on sex-specificity) кодирует одорант-связывающий белок, *sxe1* (sex-specificity enzyme) — фосфолипазу, вовлекаемую в сигналинг, *sxe2* — детерминирует цитохром P450, вовлекаемый в метаболизм стероидов в разных органах. Следует отметить, что у дрозофилы описано всего 46 типов РНК с различным распределением

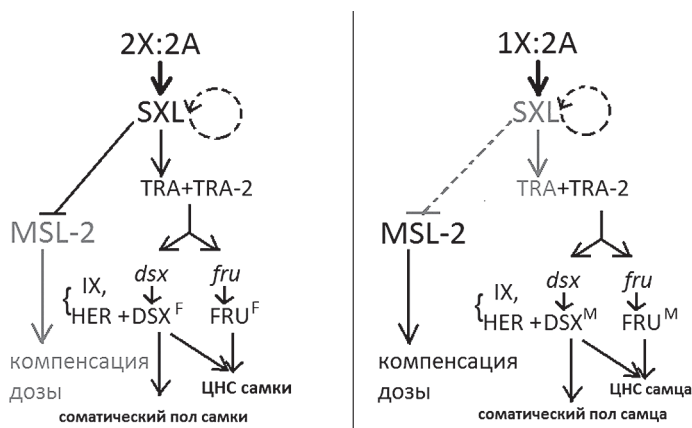


Рис. 1.1-3. Схема белковой иерархии определения пола у дрозофилы. Существуют две ветви такой иерархии. Одна управляет дифференциацией соматического пола, а другая — дозовой компенсацией. Фактор SXL предотвращает дозовую компенсацию у самок, блокируя трансляцию *msl-2*-иРНК, а также регулирует соматическую половую дифференциацию, контролируя сплайсинг пре-иРНК гена *tra* (transformer) и генерируя самкоспецифическую РНК, кодирующую TRA-белок. У самок ген *tra* и конститутивно экспрессирующийся ген *tra2* (transformer-2) функционируют вместе и контролируют все аспекты соматической половой дифференциации. Далее TRA и TRA2 контролируют две параллельные ветви иерархии определения пола. Вслед за генами *tra* и *tra2* в одной из ветвей активируется ген *dsx*, а в другой — ген *fru*, благодаря регуляции сплайсинга *dsx*- и *fru*-пре-иРНК. В результате образуются самкоспецифические *dsx*- и *fru*-иРНК. *fru*-иРНК, специфичная для самки, не транслируется, а *dsx*-иРНК кодирует альтернативные в зависимости от пола белки типа цинковых пальцев (zinc finger proteins), которые имеют идентичные ДНК-связывающие домены, но различные карбоксильные концы. У самок ген *dsx* функционирует вместе с *ix*- (intersex) и *her*- (hermaphrodite) генами. Ветвь *dsx* требуется для всех аспектов соматической половой дифференциации, не затрагивая центральную нервную систему (адаптировано по Robinett et al. 2010).

между полами. Обнаружено также, что активность гена *sxl* у дрозофилы регулируется длинной некодирующей РНК (более 200 нуклеотидов). Эта РНК активирует промотор Sxl_{pr} у самок (Mulvey et al. 2014).

Общая схема детерминации пола у дрозофилы представлена на рис. 1.1-3.

Для дрозофилы характерна «демаскулинизация» X-хромосомы, которая проявляется при переносе некоторых генов, имеющих у самцов, из этой хромосомы в аутосомы. У человека и мыши, наоборот, гены, экспрессирующиеся в сперматогониях, особенно избыточны в X-хромосоме.

Предполагают, что Y-хромосома дрозофилы произошла из специализированной добавочной В-хромосомы, а не из дегенерирующего аутосомного гомолога X-хромосомы (рис. 1.1-4). В ней всего 16 генов, которые вместе составляют около 0,5% всей ДНК Y-хромосомы. Для этой хромосомы характерно почти в 11 раз большее накопление генов, чем их потеря. Это в корне отличается от ситуации у млекопитающих.

В отличие от млекопитающих, у которых половые гормоны сформированной гонады влияют на половую идентичность всего организма, у дрозофилы каждая клетка самостоятельно определяется со своим полом.

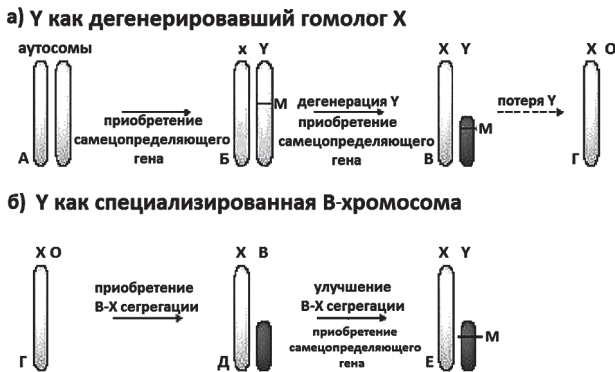


Рис. 1.1-4. Альтернативные гипотезы происхождения Y-хромосомы *Drosophila*.

а) Y-хромосома произошла из X-хромосомы. Изначально одна из аутосом приобретает самецопределяющий ген *M*. Далее вследствие селекции, мутаций и генетического дрейва уменьшается область рекомбинации между X-хромосомой и дегенерирующей Y-хромосомой. Полное исчезновение Y-хромосомы (превращение XY в XO) возможно, но происходит не у всех видов *Drosophila* и млекопитающих.

б) Y-хромосома произошла из В-хромосомы. Процесс начинается у видов с XO-системой, когда типичная В-хромосома приобретает способность спаривания и сегрегации с X-хромосомой и один из самецопределяющих генов. Далее селекция улучшает сегрегацию между В и X (адаптировано по Carvalho 2002).

1.2. Компенсация дозы гена у дрозофилы

У самцов дрозофилы гены X-хромосомы представлены в одной дозе, а у самок в двух, т.е. количество продуктов этих генов у самок должно быть вдвое больше. Однако этого не происходит, так как у этого объекта существуют механизмы компенсации дозы генов. У *D.melanogaster* в отличие от млекопитающих дозовая компенсация достигается за счет двукратного усиления экспрессии генов, располагающихся в единственной X-хромосоме самцов (у млекопитающих она достигается инактивацией одной из двух X-хромосом самок) (рис. 1.2-1).

У самцов дрозофилы активируется единственная X-хромосома. На цитологических препаратах эта хромосома выглядит более рыхло и на 25% тоньше, чем следовало бы ожидать. Ее хроматин более декомпактизирован, обнаруживает высокий синтез РНК, а количество негистоновых белков в нем в 1,5 раза больше. Эти особенности хроматина X-хромосомы являются структурной основой дозовой компенсации. Экспер млекопитающих иментально показано, что интенсивность транскрипции с одной X-хромосомы самца у дрозофилы в два раза выше, чем у самок.

Описан особый механизм, контролирующий образование структуры единственной X-хромосомы самца. В нем участвуют продукты четырех генов: *msl1*, *msl2*, *msl3* и *mle* (MSL-белки, male specific lethal). Все эти белки образуют комплекс и связываются с сотнями участков X-хромосомы самца, обеспечивая диффузность ее структуры. Для функционирования комплекса необходимо присутствие всех этих белков.

MSL-белки, очевидно, взаимодействуют с регуляторными элементами хромосом, влияя таким образом на транскрипцию. Эти белки модифицируют структуру хроматина. Продукты гена *mle* (maleless) имеют гомологию с геликазами, расплетающими двунитевую молекулу ДНК. Ген *msl2* обладает участком связывания с ДНК (ринг-фингер), а *msl3* кодирует хромодоменный белок, специфически связывающийся с хроматином. Предполагают, что белки MSL1 и MSL2 взаимодействуют с 35–40 островными сайтами в X-хромосоме, которые служат для сборки так называемых «compensasomes» (CSE — chromatin sites entry — хроматиновые точки вхождения).

В декомпактизации X-хромосомы принимают участие особые гистоны H4Ac16 (гистон H4 обычно выполняет обратную функцию — компактизацию ДНК в нуклеосомы). Их молекула существенно модифицирована (ацетилован лизин в 16-м положении) и расположена в тех же участках, в которых локализируются MSL-белки. Белки,

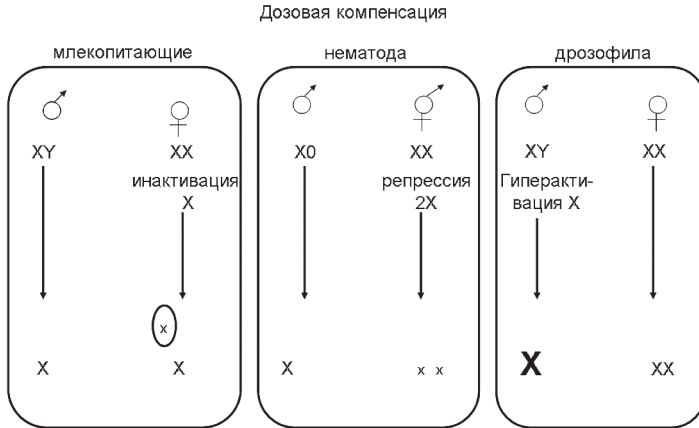


Рис. 1.2-1. Механизмы дозовой компенсации у млекопитающих, нематоды и дрозофилы. Экспрессия X-сцепленных генов уравнивается у самцов и самок: путем инактивации транскрипции с одной из X-хромосом самок (млекопитающие), путем репрессии транскрипции с обеих X-хромосом у гермафродитов (*C.elegans*) и гиперактивацией единственной X-хромосомы у самцов (*D.melanogaster*) (адаптировано по Akhtar 2003).

участвующие в компенсации дозы генов, консервативны. Антитела к ним связываются с X-хромосомами самцов других видов двукрылых.

Дозовая компенсация у дрозофилы контролируется также геном *sxl*. В норме этот ген предотвращает дозовую компенсацию у самок, не позволяя белкам MSL присоединиться к X-хромосоме. В случае мутации гена *sxl* белки MSL появляются в X-хромосоме самок. У самок, у которых отношение числа X-хромосом к числу аутосом составляет 1, ген *sxl* находится во «включенном» состоянии и подавляет трансляцию и РНК гена *msl2*. Специфические районы РНК гена *msl2*, называемые UTR (untranslated region), блокируются белком SXL. Показано, что он подавляет инициацию трансляции и стабильную ассоциацию 40S-рибосомной субъединицы с *msl-2*-иРНК. В итоге продукт гена *msl2* не поступает в ядро. При его отсутствии другие белки MSL не способны ассоциироваться с X-хромосомами, ацетилированные формы гистона H4Ac16 не накапливаются и X-хромосома самки не становится сверхактивной в транскрипции. У самцов с отношением X-хромосом к аутосомам равным 0,5 ген *sxl* «выключен». При отсутствии белка SXL ген *msl2* экспрессируется полностью и полный набор белков ассоциируется с X-хромосомой самца. В результате происходит и ацетилирование гистонов H4, и, как следствие, изменение структуры хроматина с последующей гиперактивацией транскрипции с X-хромосомы.

Можно так резюмировать данные по компенсации у *D.melanogaster*.

1. У мух описан DCC (dosage compensation complex), который состоит по крайней мере из 5 белков и 2 типов РНК. Этот комплекс связывается с сотнями сайтов в X-хромосоме самцов и деконденсирует ее. К белкам этого комплекса относятся и MSL1, 2, 3. Считают, что MSL1 и MSL2 распознают специфичные точки вхождения в ДНК или хроматин и направляют MOF (male-absent of the first) — в X-хромосому. Все эти белки имеют домены для взаимодействия друг с другом (MSL1 взаимодействует с MSL2 и MSL3; MSL2 с MSL1; MSL3 с MSL1 и РНК). N-концевая область MSL1 связывается с сотнями сайтов в X-хромосоме самцов, а взаимодействие MSL — MSL2 осуществляется через его глицин-богатый мотив и лейциновую застежку-«молнию» (leucine zipper-like motif).

2. В процессе компенсации также участвуют ацетилтрансфераза (MYST), специфически ацетилирующая гистон H4 по лизину 16 и активирующая транскрипцию с X-хромосомы, а также белок JIL1, который фосфорилирует гистон H3 по серину 10 и активирует гистоназу и белок MLE, необходимые для взаимодействия с *roX*-РНК. Таким образом, MOF и JIL1 опосредуют модификацию гистонов в X-хромосоме, вызывая двукратное усиление экспрессии ее ДНК.

3. MSL-белки также необходимы для обеспечения жизнеспособности мух, и их отсутствие приводит к летальности самцов (может быть, из-за отсутствия компенсации дозы), но не самок. Предполагают, что коровые белки MSL1 и MSL2 входят в ограниченное число так называемых HAS-сайтов (high-affinity sites). Уже идентифицирован 131 такой сайт. Они распределены по X-хромосоме на расстоянии 60–300 т.п.н. и расположены в основном в некодирующих частях генов. Повторяющаяся последовательность таких HAS-сайтов обогащена гуанин-аденин и цитозин-аденин динуклеотидами. По крайней мере, часть взаимодействий DCC с транскрибируемыми последовательностями (low affinity sites) осуществляется через гистон H3K36me3 и MSL3-белок (Straub et al. 2008). Предполагают, что гистоновая ацетилтрансфераза MYST связывается в основном с промоторами генов в X-хромосоме и аутосомах, причем бимодально, а MSL1 и MSL3 — с 3'-концами генов. Отмечено, что наличие DCC сопровождается появлением маркеров гетерохроматиновых белков — SU(VAR)3-7 и HP1. Известно о существовании в X-хромосоме около 150 GA-обогащенных элементов узнавания белков MSL (MRE-MSL recognition elements).

4. В состав DCC также входят два типа некодирующей РНК, транскрибированных с генов *roX1* и *roX2*. Эти молекулы сильно отличаются друг от друга: длина первой составляет 3,7 т.н.,