ГЛАЗ ДРОЗОФИЛЫ КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ПРИ ОНТОГЕНЕЗЕ И ПАТОГЕНЕЗЕ

©2011 г. В. Л. КАТАНАЕВ^{1,2,*}, М. В. КРЮЧКОВ¹

¹Институт белка РАН, г. Пущино, Московская обл.; ²Département de Pharmacologie et Toxicologie, Université de Lausanne, Лозанна, Швейцария.

I. Введение: структура и функции глаза дрозофилы. II. Этапы развития глаза дрозофилы. III. Сигнальные каскады, регулирующие развитие глаза дрозофилы. IV. Notch-сигнальный каскад. V. Hedgehog-зависимая передача сигнала. VI. Dpp- и ТGFβ-зависимая передача сигнала. VII. Wnt/Wingless: канонический сигнальный каскад. VIII. Неканонический Frizzled/PCP-сигнальный каскад. IX. Рецептор-тирозинкиназный сигнальный каскад. X. Методы изучения развития глаза дрозофилы. XI. Примеры использования глаза дрозофилы как модели для изучения болезней человека. XII. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ: СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ГЛАЗА ДРОЗОФИЛЫ

Глаз плодовой мушки Drosophila melanogaster представляет собой сложную структуру, образованную особыми структурными единицами – омматидиями, роговичная линза которых имеет вид выпуклого шестигранника-фасетки (от французского facette – грань). В состав фасеточного глаза плодовой мушки входит от 700 до 800 омматидиев с поперечным размером около 15 мкм; размер всего сложного глаза составляет 400 мкм [1]. Омматидии имеют свой собственный светопреломляющий (диоптрический), светоизолирующий (экранирующий) и светочувствительный (фоторецепторный) аппараты (рис. 1).

^{*}Адрес для корреспонденции: vladimir.katanaev@unil.ch

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ (грант № 09-04-00315)

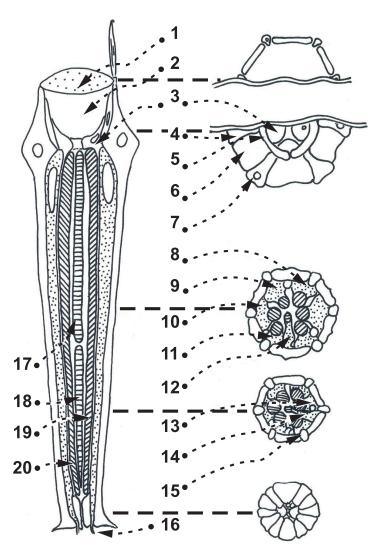


Рис. 1. Строение омматидия в продольном разрезе (слева) и в поперечных разрезах на нескольких уровнях глубины сетчатки (справа).

1 — роговичная линза, 2 — кристаллический конус, 3 — конусная (земперова) клетка, 4 — ретинальная (третичная) пигментная клетка, 5 — корнеагенная (первичная) пигментная клетка, 6 — ирисовая (вторичная) пигментная клетка, 7 — щетинка, 8—12 — R3 —R7 фоторецепторные клетки, соответственно, 13 —R2 фоторецепторная клетка, 14 —R8 фоторецепторная клетка, 15 —R1 фоторецепторная клетка, 16 — аксоны, 17, 18 — рабдомеры клеток R7 и R8, соответственно, 19, 20 — рабдомеры внешних фоторецепторов.

Светопреломляющий аппарат омматидия образован прозрачными роговичной линзой и кристаллическим конусом (рис. 1). При исследованиях роговицы методами атомно-силовой и электронной микроскопии было обнаружено, что фасетки покрыты сетью прозрачных кутикулярных буторков высотой около 30 нм и шириной около 250 нм [2, 3]. Такое нанопокрытие облегчает проникновение лучей с $\lambda = 320-700$ нм из воздуха в более плотную среду глаза [4, 5], а также способствует очищению глаза за счет водоотталкивающей функции (эффект «листа лотоса») [5]. Роговичная линза функционирует совместно с непосредственно примыкающим к ней кристаллическим конусом. Последний представляет собой прозрачное тело, образованное секретом четырех земперовых (конусных) клеток.

Светоизолирующий аппарат омматидия состоит из пигментных клеток, несущих гранулы экранирующего пигмента. За счет пигментных клеток достигается как большая светочувствительность омматидия, так и изоляция рабдомеров (светочувствительных мембран фоторецепторов, см. ниже) от боковой засветки. Каждый омматидий содержит две собственные корнеагенные (первичные) пигментные клетки, а ирисовые (вторичные) и ретинальные (третичные) пигментные клетки входят в состав двух и трех омматидиев, соответственно: вторичные пигментные клетки расположены по граням шестигранного омматидия, а третичные — по его чередующимся вершинам (рис. 1).

Фоторецепторная функция омматидия обеспечивается восемью светочувствительными или ретикулярными клетками (фоторецепторами), каждая из которых несет рабдомер – плотное, исходно апикальное образование плазматической мембраны, ответственное за световосприятие и генерацию нервного импульса. В состав каждого рабдомера входит около 60 тысяч микроворсинок, наполненных зрительным пигментом и имеющих диаметр порядка 50 нм. Рабдомеры внешних фоторецепторов R1-R6 обеспечивают формирование зрительного изображения и проникают на всю толщину сетчатки. В этих рабдомерах содержится белок опсин 1 (Rh1), способный поглощать свет в видимом диапазоне (максимум поглощения -478 нм). Между внешними рабдомерами расположены рабдомеры центральных фоторецепторов R7 и R8, занимая каждый по половине толщины сетчатки (рис. 1). Экспрессия опсинов в этих клетках строго скоординирована. На основе их фотоотражательных свойств выделяют два типа омматидиев: бледный и желтый [6]. Желтые омматидии занимают ~ 65% от общего количества омматидиев и содержат УФ-чувствительные клетки R7 (максимум поглощения – 375 нм) и поглощающие в зеленой области спектра R8-клетки (максимум поглощения — 508 нм). В первых экспресируется опсин 4, во вторых опсин 6. Бледные омматидии содержат УФ-чувствительные клетки R7 (максимум поглощения — 345 нм) и R8, чувствительные в синем диапазоне (максимум поглощения — 437 нм). В R7-клетках бледных омматидиев экспресируется опсин 3, а в клетках R8 опсин 5 [7, 8]. Существует также специализированный класс омматидиев, расположенных вдоль дорсального (верхнего) края глаза (dorsal rim) и чувствительных к поляризованному свету; опсин 3 в них присутствует как в R7-, так и в R8-клетках [9].

Кроме зрительной, глаз насекомого обладает также и осязательной способностью благодаря наличию механочувствительных щетинок, расположенных по чередующимся вершинам шестиугольников омматидиев (рис. 1) и выдающихся на 15–20 мкм над поверхностью глаза.

II. ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ ГЛАЗА ДРОЗОФИЛЫ

Развитие мухи протекает с полным превращением (голометаболический жизненный цикл). Личинка содержит имагинальные диски – группы клеток, из которых на стадии куколки образуются структуры имаго (взрослого организма), в то время как ткани личинки разрушаются. Глаз, вместе с антенной и прилежащим участком кутикулы, формируется из глазоантеннального имагинального диска. Этот диск происходит из участка клеточной бластодермы, состоящего примерно из 20 клеток и расположенного в дорсолатеральной эктодерме. На ранних стадиях глазоантеннальный имагинальный диск выделяется из окружающих тканей экспрессией белков Twin of eyeless (Toy) и Eyeless (Ey), гомологов транскрипционного фактора Рах6, который у млекопитающих также экспрессируется на самых ранних этапах формирования глаза. Эктопическая экспрессия Ey и Рах6 в мухах способна вызвать образование глаза в новом, необычном для этого месте [10, 11].

До третьего личиночного возраста диск просто увеличивается в размерах благодаря пролиферации клеток. Так, к концу первого личиночного возраста в диске имеется около 130 клеток, а в начале третьего — около 10000. Эта последовательность делений получила название «первая митотическая волна» [1]. К третьему личиночному возрасту глазоантенальный имагинальный диск представляет собой монослой активно делящихся клеток цилиндрического эпителия. Примерно за 70 часов до окукливания (при 20°С) начинается последовательная дифференцировка клеток глаза. Сначала перестает делиться группа клеток, находящаяся на заднем (постериальном) крае диска. В этих клетках происходит смена профиля экспрессии

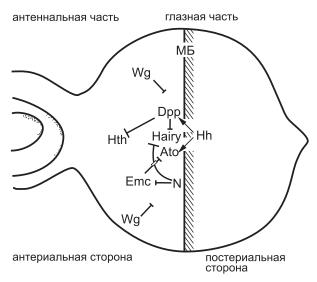


Рис. 2. Морфогенетическая борозда (МБ) в глазоантеннальном диске третьего личиночного возраста и факторы, регулирующие ее продвижение.

Зарождаясь на постериальном полюсе, МБ движется в антериальном направлении. Клетки «сзади» (с постериальной стороны от МБ) находятся на разных стадиях дифференцировки; клетки перед МБ не дифференцированы.

Hedgehog (Hh) синтезируется дифференцирующимися клетками на фронте МБ, стимулируя экспрессию пронейронального фактора Atonal (Ato).

Другой мишенью Hh является Decapentaplegic (Dpp), который диффундирует дальше Hh за пределы MБ в недифференцированную область, где подготавливает клетки к нейрональной дифференцировке через подавление Homothorax (Hth).

Notch (N), активируемый в зоне МБ через стимуляцию экспрессии его лиганда Delta под избыточным контролем Hh- и Dpp-зависимых сигнальных каскадов, также стимулирует нейрональную дифференцировку через подавление репрессоров Hairy и Extra macrochaetae (Emc).

Wingless (Wg), диффундируя со стороны головной капсулы, играет ограничивающую роль, предотвращая инициацию эктопических МБ.

генов, и они начинают передавать сигнал соседним клеткам, который, в свою очередь, приводит к остановке деления и у них. Таким образом, в процесс вовлекаются все новые клетки. Остановка деления сопровождается изменением формы клеток, что является следствием сокращения актинового цитоскелета, и совпадает с переходом клеток в стадию G1 клеточного цикла. Под микроскопом можно наблюдать, как от заднего к переднему (антериальному) краю имагинального диска движется фронт, который получил название морфогенетическая борозда (МБ, morphogenetic furrow) (рис. 2). МБ движется через диск, пока не достигнет его переднего края примерно через 2 дня [1].

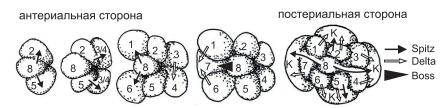


Рис. 3. Последовательность дифференцировки клеток омматидия.

Указаны разные стадии развития омматидиевых прекластеров от самых ранних (слева, вблизи МБ) до зрелых. Зарождающийся первым R8-фоторецептор рекрутирует фоторецепторы R2 и R5, посылая EGFR-активирующий Spitzлиганд (черные стрелки), который затем используется для дифференцировки фоторецепторов R3/R4 и конусных (К) клеток. Фоторецептор R7 получает двойной сигнал: активацию Notch-рецептора Delta-лигандами (светлые стрелки) от клеток R1 и R6, и активацию Sevenless-рецептора лигандом Boss от R8-фоторецептора (закрытый кончик стрелки). Конусные клетки также получают двойной сигнал: Spitz и Delta. Notch-сигнальный каскад также участвует при спецификации R4-фоторецептора в R3/R4-паре изначально эквивалентных клеток-предшественниц (показано в третьем омматидиевом прекластере).

Инициацию МБ подразделяют на рождение и реинкарнацию. Рождение — появление первой группы клеток, перешедших в стадию G1 клеточного цикла. Эти клетки запускают весь каскад продвижения МБ. Вместе с тем, имагинальный диск — округлая структура и, пока МБ не достигнет середины диска, в нее постоянно включаются все новые и новые ряды клеток по бокам. В каждом подобном ряду борозда должна быть вновь инициирована. Этот процесс получил название реинкарнации.

Как описано выше, МБ – это зона остановки клеточного деления. Сразу вслед за ней начинается поэтапная дифференцировка (рис. 3). Сначала в недифференцированной ткани на равных расстояниях друг от друга выделяются отдельные клетки, выбирающие нейрональный путь дифференцировки. Это будущие фоторецепторы R8. Они рекрутируют четыре соседние клетки, которые также становятся фоторецепторами – R2, R3, R4 и R5. Вслед за ними к формирующемуся омматидию присоединяются клетки R1 и R6. Завершается комплектация фоторецепторов клеткой R7 [1]. МБ с течением времени передвигается в пространстве, и за ней (то есть с постериальной стороны от МБ) можно видеть последовательность описанных этапов формирования сложного глаза. Для удобства исследователи обозначили каждый из этапов формирования омматидия позади морфогенетической борозды «рядом». В первом ряду начинают специализироваться R8, а второй ряд содержит R8-клетки, специализи-

ровавшиеся 90 минут назад. Таким образом, в то время как зачаток из пяти клеток-фоторецепторов формируется во втором ряду, в пятом ряду специализируются первый и шестой фоторецепторы, R7 — в седьмом. К концу личиночной стадии формируется около 26 рядов омматидиев. Остальные достраиваются в течение первых 10 часов окукливания [1].

Между третьим и пятым рядами омматидиевых кластеров, когда клетки R8 и R2–R5 специализированы и вместе составляют первичный зародыш омматидия, недифференцированные клетки вокруг фоторецепторов делятся еще раз. Это деление называется второй митотической волной и служит для увеличения количества клеток, доступных для последующих этапов рекрутирования в состав омматидия [1].

На поперечном срезе взрослого омматидия рабдомеры складываются в неправильную трапецию, то есть фигуру, обладающую хиральностью (рис. 1). От антериального к постериальному краю глаза тянется экватор – воображаемая линия, проведенная между зеркальными по отношению друг к другу омматидиями верхней и нижней половинок глаза (рис. 4). Хиральность омматидиев определяется фоторецепторами R3 и R4, зарождается в глазоантеннальном имагинальном диске вскоре после прохождения морфогенетической борозды, когда в зачатке омматидия присутствуют пять клеток, и сопровождается поворотом омматидиевых кластеров на 90 градусов (см. ниже раздел «Frizzled/PCP-сигнальный каскад в регуляции полярности омматидиев дрозофилы» главы VIII).

Дифференцирующийся последним R7 отличен от остальных фоторецепторов тем, что для его правильной специализации необходима одновременная активация двух типов сигнальных каскадов [12] (см. раздел «Notch-каскад в развитии фоторецептора R7» главы IV и главу IX): опосредуемая Delta-лигандами из клеток R1 и R6 с одной стороны, и Boss-лигандом из клетки R8, с другой (рис. 3).

Когда дифференцировка фоторецепторов закончилась, начинается специализация ненейрональных клеток. Сначала оформляются конусные клетки. За ними первичные, вторичные и третичные пигментные клетки. В последнюю очередь в глазе дифференцируются механочувствительные щетинки, по одной на каждые три омматидия.

После завершения клеточного деления ненейрональные клетки получают от фоторецепторов сигнал, контролирующий их выживание через активацию рецептор-тирозинкиназного пути (см. раздел «РТК-сигнальный каскад в рекрутировании фоторецепторов дрозофилы» главы ІХ). Клетки, недополучившие такой сигнал, умирают.

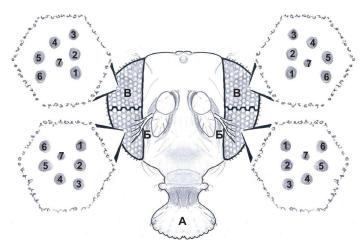


Рис. 4. Хиральность и ориентация омматидиев в глазу дрозофилы.

Показан вид головы дрозофилы «анфас» с ротовым аппаратом (А), антеннами (Б) и глазами (В). Увеличением схематически показаны поперечные срезы (сделанные на уровне R7-фоторецепторов) четырех омматидиев: по одному из каждого полушария каждого глаза. Цифрами указаны рабдомеры фоторецепторов R1-R7. Поперечные срезы омматидиев выявляют хиральность в расположении рабдомеров шести внешних фоторецепторов: фоторецептор R3 «выдвинут» из группы остальных фоторецепторов. Очевидна также универсальность ориентации омматидиев: они всегда повернуты своим R3-фоторецептором в полярном направлении (в стороны головной капсулы). Хиральность и ориентация омматидиев дорсальной половины; по глаза являются зеркальным отражением омматидиев вентральной половины; по глазу проведена воображаемая линия отражения (экватор). Кроме того, хиральность и ориентация омматидиев левого глаза зеркально отражены в правом глазе.

Это первая волна апоптоза, в ходе которой погибает одна клетка на 3–5 омматидиев. Несколько дней спустя, на последних стадиях дифференцировки, проходит вторая волна апоптоза. На этот раз в каждом омматидии умирают 2–3 клетки, и сигнал на выживание исходит от конусных и первичных пигментных клеток. Выжившие клетки становятся вторичными и третичными пигментными клетками, либо делятся, образуя механочувствительные щетинки [1].

Щетинка состоит из четырех клеток, которые формируются тремя делениями из единой клетки—предшественницы. Формирование щетинок глаза изучено недостаточно, однако оно, по-видимому, происходит по тем же правилам, что и формирование механочувствительных щетинок, расположенных на мушиных спинке и крыльях. В основе образования щетинок лежит асимметрия делений клетокпредшественниц. В ходе первого деления клетка-предшественница

дает антериального и постериального потомков, отличающихся по составу (в частности, по наличию или отсутствию белка Numb). Антериальный потомок, унаследовавший белок Numb, еще дважды асимметрично делится с образованием внутренних клеток сенсорной щетинки (нейрона, глиальной клетки и вспомогательной клеткиоболочки нейрона (sheath cell)). Постериальная клетка, не унаследовавшая Numb, единожды делится асимметрично с образованием внешних клеток-компонентов щетинки: волоска (hair) и рукоятки (shaft) [13].

Как будет видно ниже, каждая из стадий развития глаза строго регулируется системами внутриклеточной передачи сигнала. Многолетние исследования развития зрительного органа дрозофилы создали общирный свод знаний о том, какие сигнальные каскады отвечают за какие этапы морфогенеза, и какие морфологические и гистологические нарушения возникают в глазе при тех или иных нарушениях работы сигнальных механизмов. Учитывая высокую степень гомологии и взаимозаменяемость компонентов сигнальных путей насекомых и млекопитающих, все это делает развивающийся глаз дрозофилы идеальной модельной системой для изучения механизмов действия человеческих сигнальных белков. Последующие разделы подробно описывают сигнальные каскады, участвующие в развитие как глаза плодовой мушки, так и различных патологий человека.

III. СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ РАЗВИТИЕ ГЛАЗА ДРОЗОФИЛЫ

Передача сигнала в клетке (внутриклеточная сигнализация, cell signaling) – это часть сложной системы коммуникации, которая управляет основными клеточными процессами и координирует действия клетки. Способность клеток корректно отвечать на изменения окружающей их среды является основой развития, регенерации тканей, иммунитета и системы поддержания гомеостаза в целом. В процессы передачи сигнала вовлечены цепи биохимических реакций внутри клетки, основанные либо на белок-белковых взаимодействиях и пост-трансляционных модификациях, либо на стимуляции или ингибировании производства вторичных мессенджеров — низкомолекулярных внутриклеточных веществ, в свою очередь регулирующих активность белков-передатчиков сигнала. Как правило, количество молекул, принимающих участие в клеточной сигнализации, возрастает по мере перехода на следующие этапы передачи сигнала. Такой процесс называется амплификацией сигнала.

Таким образом, говорят о сигнальном каскаде, начинающемся с относительно слабого стимула и вызывающего значительный ответ. Следует добавить, что в сигнальных каскадах присутствуют как положительные, так и отрицательные обратные связи, а также имеет место значительное перекрывание различных каскадов друг с другом. В этой связи представление о внутриклеточной передаче сигнала как о простой линейной цепи реакций является упрощением, и в последнее время набирают популярность исследования сигнализации как сети межмолекулярных взаимодействий [14, 15].

Существует очень небольшое количество типов сигнальных веществ, их рецепторов, и соответственно типов сигнальных каскадов, запускаемых ими. Например, выделяют всего лишь пять основных типов сигнальных каскадов, активных в ходе раннего эмбриогенеза [16]: 1) Notch-сигнальный каскад; 2) Hedgehog-зависимый сигнальный каскад; 3) TGFβ-каскады; 4) Wnt/Frizzled-сигнальные каскады; и 5) каскады, инициируемые тирозинкиназными рецепторами. Поскольку эти типы сигнальных путей отвечают за ранние этапы развития многоклеточных животных, у взрослого организма их активность ограничена. Неправильная активация этих сигнальных путей стимулирует раковое перерождение; соответственно, разработка веществ, воздействующих на эти сигнальные пути, представляет собой очевидное и активно используемое направление создания антираковых лекарств [17]. Это делает исследование путей внутриклеточной передачи сигнала, активных в онтогенезе, важной не только с точки зрения фундаментальной биологии развития, но и медицински значимой. Развитие глаза дрозофилы многократно использует все эти сигнальные каскады, предоставляя исследователям крайне многообещающий объект для их изучения.

IV. NОТСН-СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД

Notch, представляющий собой рецептор с одним трансмембранным участком, N-концевым внеклеточным и C-концевым внутриклеточным доменом, инициирует один из наиболее широко используемых природой внутриклеточных сигнальных путей, контролирующих процессы развития многоклеточных животных [18, 19] (рис. 5). Notch играет роль в контроле выбора клеточной судьбы в процессе развития путём усиления молекулярных различий между клетками. N-концевая часть рецептора Notch у дрозофилы состоит из тридцати шести EGF-подобных повторов и трех LNR (lin-12/Notch гереаt)-повторов [20]. EGF-подобные повторы номер 11 и

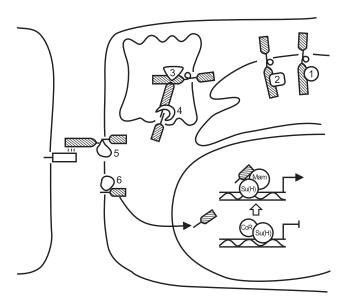


Рис. 5. Notch-зависимый сигнальный каскад: этапы созревания и внутриклеточной передачи сигнала Notch-рецептора.

 $1,\ 2-$ в эндоплазматическом ретикулуме EGF-подобные повторы Notch подвергаются гликозилированию О-гликозилтрансферазой Rumi и фукозилированию О-фукозилтрансферазой; 3- в аппарате Гольджи к фукозе добавляется N-ацетилглюкозамин благодаря активности фермента Fringe; 4- в аппарате Гольджи также происходит первое протеолитическое расщепление (S1) Notch, осуществляемое протеазой Furin по сайту, находящемуся в гетеродимеризационном домене перед трансмембранным участком; 5- связывание с DSL-лигандом (трансмембранным белком соседней клетки) запускает протеолитическое S2-расщепление Notch при помощи металлопротеазы семейства ADAM/TACE/Kuzbanian, удаляющее внеклеточную часть рецептора; $6-\gamma$ -секретаза отщепляет внутриклеточную часть Notch (NICD), которая транслоцируется в ядро. В ядре NICD связывает фактор транскрипции Su(H) и коактиватор Мат, запуская транскрипцию генов-мишеней.

12 ответственны за взаимодействие с лигандами [21]. На внеклеточном участке Notch также выделяют гетеродимеризационный домен. С внутриклеточной стороны Notch содержит RAM-домен, анкирин-подобные повторы, транскрипционный домен, а также PEST-домен, регулирующий стабильность рецептора [22]. В эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) EGF-подобные повторы Notch подвергаются гликозилированию О-гликозилтрансферазой Rumi и фукозилированию О-фукозилтрансферазой, после чего в аппарате Гольджи к фукозе добавляется N-ацетилглюкозамин благодаря

активности фермента Fringe [23]. В аппарате Гольджи также происходит первое протеолитическое расщепление (S1) Notch, осуществляемое протеазой Furin по сайту, находящемуся в гетеродимеризационном домене перед трансмембранным участком. Этим завершается процессирование, и готовый к работе рецептор, две части которого остаются скрепленными нековалентными связями между образовавшимися частями гетеродимеризационного домена, доставляется на плазматическую мембрану [24, 25].

Внутриклеточная сигнализация, запускаемая рецептором Notch, имеет несколько принципиальных особенностей, отличающих ее от остальных типов сигнальных каскадов. Первое такое отличие состоит в том, что лигандами для Notch являются не секретируемые молекулы, а трансмембранные белки семейства DSL (Delta, Serrate, Lag2). Эта особенность подразумевает, что активация Notch-зависимого сигнального пути происходит в результате прямого контакта соседствующих клеток. Связывание с DSL-лигандом запускает протеолитические расщепления Notch-рецептора, называемые S2 и S3. S2-расщепление происходит при помощи металлопротеазы семейства ADAM/TACE/ Kuzbanian и удаляет внеклеточную часть рецептора [26]. Последующее S3-расщепление молекулы Notch происходит в липидном слое мембраны под действием у-секретазы – комплекса белков presenilin, nicastrin, Aph1 и Pen2, который также отвечает за аналогичное расшепление амилоидного белка-предшественника (АРР) и таким образом связан с развитием болезни Альцгеймера [27]. S3расщепление высвобождает цитоплазматический домен активированного рецептора Notch (NICD). В результате транслокации NICD в ядро происходит его взаимодействие с транскрипционным фактором Su(H) [28]. Связывание NICD изменяет свойства Su(H), превращая его из транскрипционного супрессора в активатор, напрямую вытесняя корепрессор (деацетилазу) и связывая коактиваторные белки семейства Мат. Это сопровождается повышением уровня транскрипционной активности и сопряжено с рекрутированием коактиваторной гистоновой ацетилтрансферазы [29]. Наиболее хорошо описанными генами-мишенями этого сигнального каскада являются транскрипционные репрессоры семейства HES/HEY, относящиеся к белкам структурного семейства basic helix-loop-helix. Кроме того, среди генов-мишеней – регуляторы пролиферации Мус и cyclin-D и компоненты других сигнальных каскадов, например EGFR [29].

Вторым принципиальным отличием Notch-зависимого сигнального пути от большинства сигнальных каскадов является очевидное отсутствие амплификации сигнала в ходе его внутриклеточной пере-

дачи. Действительно, одна молекула DSL-лиганда связывается с одной молекулой Notch-рецептора, внутриклеточная часть которого после S2/S3-протеолиза переходит в ядро и входит в стехиометрический комплекс с Su(H) и Mam, что стимулирует транскрипцию геновмишеней. Однако амплификация сигнала «скрыта» в запускаемой транскрипцией положительной обратной связи. Дело в том, что среди генов-мишеней Notch-каскада присутствует сам ген Notch и гены, стимулирующие активность Notch-сигнального пути [29, 30], тогда как транскрипция DSL-лигандов опосредованно подавляется активацией Notch-каскада через снижение экспрессии транскрипционных факторов achaete/scute [31]. Напомним, что DSL-лиганды – это трансмембранные белки, что обеспечивает активацию Notchсигнального пути прямым межклеточным контактом. Если обе контактирующие клетки несут на своей поверхности как DSL-лиганды, так и Notch-рецепторы, то активация Notch-каскада запускается в обеих клетках (транс-активация; здесь уместно заметить, что цис-активации Notch не происходит; более того, имеет место цисингибирование Notch-рецептора находящимися на одной с ним мембране DSL-лигандами [32, 33]). Однако со временем, благодаря наличию обратных связей в виде стимуляции производства Notch и подавлении синтеза лиганда, одна из клеток, изначально имевшая пусть незначительный перевес в количестве Notch-рецепторов на своей поверхности или их активности, начинает «переигрывать» другую в уровне активации своего Notch-каскада. После нескольких раундов активации этого сигнального пути и регулируемой им транскрипции из двух клеток, изначально похожих, одна остается со значительным уровнем экспрессии Notch-рецептора и низким – DSL-лигандов, и в итоге значительным уровнем активации Notch-каскада и экспрессии его генов-мишеней. В то же время Notch-каскад второй клетки выключается – как из-за низкого уровня экспрессии рецептора и других компонентов Notch-сигнального пути, так и из-за высокого уровня экспрессии лигандов, приводящего к цис-ингибированию имеющихся небольших количеств рецептора. Этот феномен получил название «латеральное ингибирование» и многократно используется в ходе развития многоклеточных животных, например для выделения из пула изначально равноценных эпителиальных клеток нескольких нейрональных предшественников (см. ниже) [34].

УЧАСТИЕ NOTCH-ЗАВИСИМОГО СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА В РАЗВИТИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЙ

Notch-зависимый сигнальный путь участвует в многочисленных программах развития как дрозофилы, что будет описано в следующих разделах на примере ее глаза, так и человека. Мутации в генах, кодирующих компоненты этого сигнального каскада, лежат в основе ряда наследственных либо соматических заболеваний человека. Мы обсудим несколько примеров.

Острая лимфобластическая лейкемия Т-клеток (T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) представляет собой одну из самых распространенных форм лейкемии, особенно у детей. Роль избыточной активации Notch-каскада в развитии этой формы рака была исходно выявлена в ходе анализа хромосомной транслокации (7;9)(q34;q34.3) у группы пациентов, страдающих T-ALL. Данная транслокация, как оказалось, приводит к формированию усеченного гена Notch1, экспрессия которого вызывает конститутивную, лиганд-независимую активацию Notch-каскада [35]. Последующие работы выявили частые точечные мутации в гене Notch1, особенно в участках, кодирующих его гетеродимеризационный домен и PEST-домен, контролирующий деградацию NICD [36]. Активирующие мутации в гетеродимеризационном домене Notch1 стимулируют лиганд-независимое S2-расщепление рецептора, которое сопровождается S3-расщеплением и активацией Notch, тогда как мутации в PEST-домене повышают стабильность освобожденной в результате S3-расщепления внутриклеточной части Notch (NICD) [22, 37]. В целом, активирующие мутации в гене Notch1 встречаются в более чем половине всех случаев T-ALL; примерно в 10-20% случаев наблюдаются одновременные мутации в гетеродимеризационном и PEST-доменах, что говорит в пользу синергизма этих двух путей мутационной активации Notch [22].

Церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarct and leukoencephalopathy, CADASIL-синдром) — это доминантное наследственное заболевание, характеризующееся повторяющимися ишемическими инсультами, мигренью и деменцией [38]. CADASIL-синдром проявляется в среднем в возрасте 45 лет, и по некоторым оценкам встречается с частотой 1 случай на 50 тысяч человек [38]. Генетические исследования выявили, что за это заболевание ответственны мутации в гене Notch3 [39, 40], вызывающие добавление или потерю цистеиновых остатков в одном из 34 ЕGF-повторов внеклеточного домена Notch3 [41]. Предполагается, что это нарушает нормальное образование дисульфидных связей в EGF-повторах (в норме 3 связи на повтор) и функционирование рецептора; однако до сих пор не установлено, усиливается или уменьшается активность Notch3 в результате этих мутаций [42]. Известно, что при CADASIL-синдроме внеклеточные участки Notch3 скапливаются на поверхности клеток гладкой мускулатуры артериол, по-видимому благодаря спонтанной мультимеризации мутантных форм рецептора за счет образования неправильных межмолекулярных дисульфидных связей [43, 44]. Такие скопления вызывают отмирание клеток гладкой мускулатуры артериол и как следствие — потерю артерий мозга, питающих подкорковые нейроны, и смерти последних; как правило, заболевание сопровождается летальным исходом в течении 15—20 лет после проявления первых симптомов [42].

Синдром Алажилля – аутосомно доминантное, мультисистемное заболевание, характеризующееся дефектами развития печени, сердца, скелета и глаз, проявляющееся в раннем детском возрасте с частотой примерно 1 случай на 100 тысяч младенцев. Смертность при синдроме Алажилля составляет 15–20% и в половине случаев происходит в результате порока сердца (у новорожденных), а в половине - отказа печени из-за недоразвитости желчных протоков (на более поздних этапах); лечения от этой болезни не существует [45]. В большинстве случаев (около 90%) причиной болезни являются loss-of-function-мутации в гене JAG1, кодирующем лиганд для Notch-рецепторов [46, 47], и в некоторых случаях (6%) – мутации в гене Notch2 [48]. Доминантность синдрома Алажилля связана с гаплонедостаточностью Notch-зависимого сигнального каскада: простое снижение количества активных лигандов из-за мутаций в одном из двух аллелей гена JAG1 (или рецепторов из-за мутаций в одном из двух аллелей reнa Notch2) приводит к недостаточной активности Notch-каскада и дефектам развития. Стоит напомнить, что гомозиготные мутации в генах JAG1, Notch2, и других компонентов Notch-каскада летальны на стадиях раннего эмбриогенеза.

Недостаточная либо, наоборот, избыточная активность Notchзависимых сигнальных каскадов лежит в основе многих других патологий человека. Можно упомянуть рак поджелудочной железы, кожи и шейки матки, спондилокостальный дизостоз и врождённый двустворчатый клапан аорты [42, 49, 50]. Данные примеры подчеркивают медицинскую важность изучения механизмов работы этого типа внутриклеточной сигнализации. Глаз дрозофилы представляет собой крайне удобный объект для таких исследований, и последующие разделы описывают роль Notch-каскада в регуляции различных этапов развития этого органа.

NOTCH-КАСКАД НА РАННИХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ ГЛАЗА

Правильное развитие глаза дрозофилы зависит от четкого разделения дорсальной и вентральной (нижней) сторон органа и формирования экватора между ними. Эти процессы обеспечиваются активацией Notch-каскада на границе между дорсальной и вентральной половинами растущего глаза. На ранних этапах развития имагинального глазоантенального диска DSL-лиганд Delta экспрессируется преимущественно дорсально, а лиганд Serrate – вентрально. Кроме того, N-ацетилглюкозаминтрансфераза Fringe также экспрессируется вентрально. Fringe модифицирует Notch таким образом, что делает его нечувствительным к активации Serrate-лигандом, но стимулирует его активацию лигандом Delta. В результате Notch преимущественно активируется на границе между вентральным и дорсальным компартментами, обособляя эту границу как специфическую зону межклеточных взаимодействий и активации сигнальных каскадов. Это необходимо как для роста глаза, так и для образования экватора, как зоны зеркального отражения хиральности и ориентации омматидиев [51-53]. Нарушение активности Notch в пограничной зоне приводит к дефектам в хиральности омматидиев, в то время как полная потеря его активности приводит к потере глаза [51]. Напротив, избыточная активация Notch вызывает перерастание глазной ткани [51].

Участие Notch-каскада в росте глазоантеннального диска определяется его ролью в инициации морфогенетической борозды (МБ) на постериальном полюсе раннего диска. Активация Notch на дорсовентральной границе (совпадающей у раннего диска с постериальным полюсом) приводит к экспрессии транскрипционного фактора Eyg, который в свою очередь стимулирует производство Unpaired – лиганда, активирующего Jak/STAT сигнальный каскад и инициацию МБ [54].

NOTCH-КАСКАД ОТВЕЧАЕТ ЗА СПЕЦИФИКАЦИЮ R8-КЛЕТОК

В процессе продвижения МБ активация Notch-каскада стимулирует переход клеток в фазу G1 и экспрессию пронейрональных факторов atonal и daughterless [55]. Это достигается благодаря подавлению Notch-каскадом синтеза транкрипционных репрессоров hairy и extra macrochaetae [56]. Синтез пронейрональных факторов большой группой клеток в пределах МБ отмечает их готовность к нейрональной дифференцировке, и потеря активности Notch на этом этапе приводит к отсутствию индукции R8-фоторецепторов и нейрональной дифференцировки в целом [56, 57]. Однако после прохождения МБ экспрессия atonal постепенно сужается до

кластеров, а затем и до отдельных клеток, которые и станут R8 фоторецепторами. Потеря экспрессии atonal многими клетками из кластера компетентных к нейрональной дифференцировке клеток обеспечивается реализацией Notch-зависимого механизма латерального ингибирования, а снижение активности Notch на данной стадии, напротив, приводит к множественной избыточной дифференцировке R8-клеток [55, 58]. Переход клеток от активации экспрессии atonal к его подавлению в ответ на стимуляцию Notchкаскадом связан с изменением принципа регуляции экспрессии этого гена. Если на стадии прохождения МБ транскрипция atonal onpeделяется белками, связывающимися с 3'-энхансером, то на более поздних этапах определяющим является 5'-энхансер, отвечающий в частности за связывание самого белка atonal и таким образом за автоактивацию его транскрипции [55, 59]. И если Notch-каскад способен опосредованно стимулировать экспрессию под контролем 3'-энхансера, то 5'-энхансер, напротив, подавляется активностью этого сигнального пути [55]. Здесь интересно подчеркнуть важность автоактивации пронейронального гена atonal. В других примерах латерального ингибирования активностью Notch-каскада могут подавляться другие пронейрональные гены, например achaete/scute [31, 60], но способность таких Notch-подавляемых генов к автоактивации, по-видимому, является непременным условием для функционирования принципа латерального ингибирования. Результатом активности Notch на этом этапе развития глаза является спецификация равномерно расположенных клеток R8-фоторецепторов, каждый из которых далее рекрутирует из массы недифференцированных клеток своих будущих партнеров по омматидию.

NOTCH-КАСКАД В РАЗВИТИИ ФОТОРЕЦЕПТОРА R7

Дифференцировка фоторецепторов R1–R6 происходит при воздействии на них EGF, выделяемого R8-фоторецептором для наращивания фоторецепторного кластера зарождающегося омматидия (см. раздел «РТК-сигнальный каскад в рекрутировании фоторецепторов дрозофилы» главы IX). В отличие от этих фоторецепторов, R7 для своей спецификации требует двойной активации: Ras-зависимого сигнального каскада и Notch-каскада. В отсутствие последнего, клетка-предшественник R7 выбирает клеточную судьбу R1–R6 [12, 61]. Активация Notch-каскада в клетке-предшественнице R7 достигается экспрессией клетками R1 и R6 лиганда Delta [12]. Любопытно, что эти клетки также экспрессируют Notch-рецептор, в то время как R7 также экспрессирует Delta-лиганд. Более того,

показано, что направленная активация Notch-каскада в клетках R1-R6 превращает их в R7 [12, 61]. Каким же образом взаимодействующие клетки-предшественники R1, R6 и R7 определяют, какую из двух клеточных судеб (R1/R6 или R7) выбрать, если этот выбор зависит от Notch-каскада, который может быть активирован во всех трех клетках? Ответом является латеральное ингибирование и специфическое пространственное расположение этих трех взаимодействующих клеток (см. рис. 3). В омматидиевом прекластере клетка R7 находится в физическом контакте с R1 и R6, в то время как эти последние не контактируют друг с другом. Таким образом, клетка R7 получает примерно в два раза больше Delta-сигнала (от R1 и R6), чем R1 или R6 (каждая получает Delta-сигнал только от R7). В результате Notchкаскад изначально активирован сильнее в клетке-предшественнице R7, что, за счет латерального ингибирования, приводит к ситуации, когда он активен только в R7 и неактивен в R1/R6. Как и в описанных выше случаях, важную роль в Notch-зависимой спецификации клеток R1/R6 и R7 играет цис-ингибирование лигандом Delta [62].

NOTCH-КАСКАД В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ЩЕТИНОК ГЛАЗА

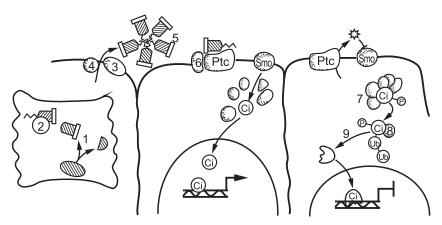
Рассмотрим еще один механизм действия Notch-зависимой дифференцировки, происходящей при развитии механочувствительных щетинок глаза. Каждая щетинка содержит 4–5 клеток, являющихся потомками единичной клетки-предшественницы (см. выше). Клетка-предшественница делится асимметрично в антериальнопостериальном направлении. Асимметрия этого деления проявляется, в частности, в сосредоточении белков-регуляторов Notch-каскада Numb и Neuralized на антериальном полюсе делящейся клетки и в эксклюзивном унаследовании этих белков антериальной дочерней клеткой [63-65]. Numb подавляет активность Notch-каскада в антериальной клетке [64], в то время как Neutralized увеличивает способность Delta-лиганда антериальной клетки активировать Notch в ее постериальной соседке [65]. В итоге Notch-каскад активируется только в постериальной клетке, которая отвечает за развитие внешних клеток-компонентов шетинки: волоска и рукоятки. Антериальная клетка, в свою очередь, производит внутренние клетки (нейрон, клетка оболочки нейрона и глиальная клетка; последняя часто отмирает на более поздних этапах [66]).

V. HEDGEHOG-ЗАВИСИМАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА

Hedgehog (Hh) — секретируемый белок, впервые описанный у дрозофилы, где hh был выявлен как один из генов сегментной полярности [67]. Мутации в этом гене приводят к дефектам в раннем эмбриогенезе с образованием «газона» отростков-зубчиков (denticles) на брюшной части эмбриона, откуда и название этого белка («hedgehog» переводится как «ёж»).

Нһ синтезируется в ЭР в виде предшественника с молекулярной массой 45 кДа, а завершается его процессинг в аппарате Гольджи. Нһ приобретает характеристики секреторной молекулы в результате внутримолекулярного автопротеолиза и липидной модификации белка-предшественника. Автопротеолиз катализируется С-концевым доменом белка по механизму, напоминающему белковый сплайсинг интеинов: цистеиновый остаток в консервативном участке Gly'CysPhe в зоне расщепления играет роль нуклеофила при гидролизе пептидной связи. За счет стерол-связывающего мотива С-концевого домена белком-предшественником рекрутируется холестерин, который служит электронным донором этой реакции. В результате образуется биологически активный Hh-N пептид массой 19 кДа, эстерифицированный на С-конце остатком холестерина [68—70] (рис. 6).

Биологически активный Hh несет еще одну липидную модификацию: пальмитоилирование по N-концу, катализируемое ацилтрансферазой Skinny Hedgehog [71]. Такое двойное липидирование необходимо для правильной секреции и активности Нh, но вносит определенные ограничения как в процесс высвобождения этого липопротеина во внеклеточное пространство, так и его диффузию между клетками. Для секреции необходим стерол-чувствительный 12-трансмембранный белок Dispatched [72]. Во внеклеточном пространстве мономерные формы Hh, из-за своих гидрофобных свойств, остаются связанными с внешней стороной мембраны и внеклеточным матриксом [73]. Однако Нh обязан диффундировать на далекие расстояния, чтобы играть роль морфогена (секретируемого белка, синтезирующегося определенным участком развивающейся ткани и диффундирующего с образованием градиента концентрации, так что клеточные ответы на полученный сигнал зависят от локальной концентрации морфогена [74]). Предполагается, что это достигается упаковкой Нh в специальные частицы, маскирующие его липидные части и обладающие повышенной диффузионной способностью. Такими частицами могут быть, например, мультимеризованные агрегаты Hh [75] либо липопротеиновые частицы [76]. Показано, что важную роль в упаковке Нh в такие частицы играет мажорный белок



Puc.6. Hedgehog-зависимый сигнальный каскад.

Hedgehog-синтезирующая клетка (слева): 1,2 – В аппарате Гольджи белокпредшественник подвергается автопротеолизу с добавлением остатка холестерина на С-конец и пальмитоилируется по N-концу ацилтрансферазой Skinny Hedgehog. 3 – Высвобождение липидированного Hedgehog требует активности стерол-чувствительного трансмембранного белка Dispatched. 4, 5 – Для диффузии Hedgehog на дальние расстояние требуется белок липидных плотиков геggie/flotillin (4), обеспечивающий упаковывания Hedgehog в липопротеиновые частицы (5).

На принимающей клетке (в центре) Hedgehog связывается рецептором Patched (Ptc) и корецепторами Ihog и Boi (6), что высвобождает активность GPCR Smoothened (Smo), обеспечивающего стабилизацию фактора транскрипции Сi, который переносится в ядро и запускает транскрипцию генов-мишеней.

В клетке, не получившей Hedgehog (справа), Рtc действует как транспортер низкомолекулярного ингибитора Smo. В отсутствие активности Smo в цитоплазме образуется комплекс белков Costal2, Fused, PKA, CK1, GSK β (7), фосфорилирущий Ci, что приводит к его узнаванию убиквитин-лигазой Slimb (8) и протеасомному отщеплению C-конца Ci (9). Остающийся CiR-фрагмент входит в ядро, где играет роль репрессора транскрипции.

липидных плотиков reggie/flotillin [77]. Сегрегация Нh в липидные плотики наблюдается в Hh-секретирующих клетках и зависит от холестериновой модификации этого морфогена [78].

Вне зависимости от молекулярной формы, в которой Нh доставляется до клетки-получателя сигнала, на ее поверхности он связывается с 12-трансмембранным белком Patched (Ptc); это взаимодействие стимулируется корецепторами Ihog и Boi [79–81]. Этот рецептор конститутивно подавляет активность другого трансмембранного белка Smoothened (Smo) [82]. Предполагается, что Ptc, будучи гомологом ряда белков-транспортеров, транспортирует низкомолекулярный

ингибитор Smo [83]. Связывание Hh с Ptc подавляет эту транспортную активность, позволяя Smo передать сигнал цитозольным компонентам этого каскада (рис. 6). Smo по своей топологии и биохимической активности является рецептором, сопряженным с G-белками (GPCR) [82, 84] и родственен рецепторам семейства Frizzled (см. ниже). Однако роль G-белков в передаче сигнала от Smo остается неясной.

Ключевую роль в Hh-зависимом сигнальном каскаде играет цитозольный комплекс белков, организованный связывающим микротрубочки моторным белком Costal2 [85, 86] (рис. 6). В этот комплекс также входят киназы Fused, PKA, CK1 и GSK3β, а также транскрипционный фактор Cibitus interruptus (Ci) [87]. Функция цитозольного комплекса состоит в последовательном фосфорилировании Ci, что приводит к его узнаванию F-box-содержащим белком Slimb, являющимся убиквитин-лигазой. Последующее убиквитинилирование С-конца Ci приводит к его отщеплению протеасомой. Остающийся фрагмент Ci (CiR) освобождается и входит в ядро, где играет роль репрессора транскрипции [87, 88]. Активный Smo реорганизует цитозольный комплекс, предотвращая фосфорилирование и расщепление Ci. В результате полноразмерный Ci (CiA) транлоцируется в ядро и служит активатором транскрипции генов-мишеней Hh-зависимого сигнального пути [87].

НЕDGEHOG-ЗАВИСИМАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА И БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА

Как и в случае Notch-зависимого сигнального каскада, мутационная гипоактивация Нh-сигнального пути лежит в основе ряда наследственных заболеваний – дефектов развития человека, тогда как мутационная гиперактивация этого каскада ответственна за наследственную предрасположенность к раку либо к спонтанным формам онкообразований [89, 90]. Так, гетерозиготная мутация в гене Sonic Hedgehog (Shh, гомолог Hh у человека) вызывает голопрозенцефалию - порок развития мозга и лица разной степени проявления, от летальной циклопии до более мягких дефектов развития лица [91, 92]. Голопрозенцефалия встречается с частотой 4–8 случаев на 100 тысяч новорожденных. Любопытно, что в редких случаях этот порок вызывается гетерозиготной мутацией в гене Рtc, которая, как предполагается, является gain-of-function-мутацией и, таким образом, также приводит к снижению уровня Нh-зависимой передачи сигнала [93]. Кроме того, у примерно 5% больных синдромом Смита-Лемли-Опитца (Smith-Laemli-Opitz syndrome, SLOS) также наблюдается голопрозенцефалия. Другие симптомы SLOS – микроцефалия, задержка роста, умственная отсталость и др. SLOS – аутосомное рецессивное заболевание, вызываемое мутацией в гене 7-дегидрохолестеролредуктазы — фермента, ответственного за один из этапов биосинтеза холестерина. Предполагается, что данная мутация также приводит к снижению эффективности Hh-зависимого сигнального каскада [89, 90]. Здесь уместно заметить, что врожденная голопрозенцефалия и циклопия наблюдается у ягнят, чьи матери во время беременности ели листья чемерицы (Veratrum) [94]. В 1960-х годах из чемерицы было выделено активное вещество, ответственное за эти дефекты — циклопамин, физически связывающийся с Smo и блокирующий его активность [95, 96]. Таким образом, как мутационное, так и фармакологическое снижение активности Hh-зависимого сигнального каскада на поздних стадиях развития эмбриона ведет к голопрозенцефалии.

Среди других заболеваний, вызываемый мутационным снижением активности Hh-зависимого сигнального пути, можно назвать цефалополисиндактилию Грейга, синдром Палистера-Холла, постаксиальную полидактилию 3-го типа и синдром VACTERL. Все эти пороки вызваны мутациями (наследственными либо спорадическими) в генах Gli3 и Gli2 (гомологи дрозофильного фактора транскрипции Ci) [89, 90].

Наследственные либо спорадические мутации, увеличивающие активность Нh-сигнального пути, способствуют раковому перерождению клеток. Около 40% больных синдромом Горлина несут инактивирующую мутацию в гене Рtc (напомним, что гомозиготная инактивация этого гена летальна в раннем эмбриогенезе). Поскольку Рtc является ингибитором Smo и всего внутриклеточного каскада, снижение его количества способствует лиганд-независимой активации этого сигнального пути. Больные синдромом Горлина имеют ряд дефектов развития скелета, таких, как полидактилия, избыточный рост, слитие ребер, а также высокую частоту раннего возникновения раковых опухолей, таких как базалиома и медуллобластома [89, 90, 97]. Кроме того, большая часть всех спорадических случаев медуллобластомы и практически все случаи базалиомы связаны с мутациями гена Рtc [98, 99]. Другие формы рака, как рак простаты, молочной железы, поджелудочной железы, печени и др., также часто связаны с соматическими мутациями, приводящими к избыточной активации Нһ-зависимого сигнального каскада – через снижение активности Ptc, перепроизводство Shh, или мутации в других генах этого сигнального пути [98, 99].

УЧАСТИЕ HEDGEHOG-КАСКАДА В РАННЕМ РАЗВИТИИ ГЛАЗА И ПРОДВИЖЕНИИ МБ

Нһ играет важную роль как в инициации морфогенетической борозды (МБ), так и в ее продвижении [100] (рис. 2). Нь синтезируется клетками на постериальном полюсе глазо-антеннального диска, и его диффузия в антериальном направлении способствует зарождению МБ в этом месте [101]. Более того, эктопическая экспрессия Н в раннем диске вызывает образование дополнительных МБ [101]. Продвижение МБ в антериальном направлении обеспечивается запуском производства Нh клетками, дифференцирующимися в фоторецепторы [102, 103]. Одним из генов-мишеней Нh в процессе продвижения МБ является другой секретируемый белок Dpp (см. ниже), также регулирующий продвижение МБ [102]. Другой ген, экспрессия которого стимулируется Hh – atonal, запускающий нейрональную дифференцировку, регуляция которого Notch-каскадом описана в предыдущем разделе [104]. Важно отметить, что отвечать на Нһ-сигнал компетентны только недифференцированные клетки, расположенные антериально от МБ, так как в ткани, через которую МБ уже прошла, деградирует ключевой в передаче Нh-сигнала фактор транскрипции Сі благодаря действию комплекса белков, включающего Cullin3, что делает ее невосприимчивой к Hh [100, 105]. Таким образом достигается самообновляемое производство Нh-морфогена на пике продвигающейся в антериальном направлении МБ.

VI. DPP- И ТGFβ-ЗАВИСИМАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА

Лиганд Decapentaplegic (Dpp) – член TGFβ (transforming growth factor β)-надсемейства белковых сигнальных молекул и дрозофильный аналог лигандов BMP2 (bone morphogenic protein 2) и BMP4 позвоночных. Все лиганды суперсемейства TGFβ действуют в виде димеров [106] через рецепторные серин/треониновые киназы с одним трансмембранным доменом и цитоплазматическим протеинкиназным доменом (рис. 7). Эти рецепторы функционируют в виде гетеротетрамера, образующегося при связывании лиганда и состоящего из двух копий рецептора первого типа и двух копий рецептора второго типа [107, 108]. У дрозофилы рецептором первого типа для Dpp является Thick veins [109, 110], а второго типа — Punt [111, 112]. Конститутивно активная киназа-рецептор 2-го типа фосфорилирует рецептор 1-го типа, активируя его. Это, в свою очередь, приводит к фосфорилированию цитоплазматического R-Smad-белка: Mothers against Dpp (Mad) у дрозофилы [113], что делает его компетентным

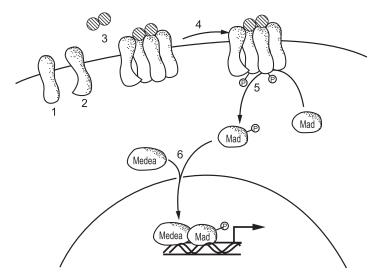


Рис. 7. Dpp-зависимый сигнальный каскад.

Связывание димерного Dpp-лиганда (3) с рецепторами Thick veins (1) и Punt (2) вызывает их гетеротетрамеризацию. Конститутивно активная киназная активность Punt приводит к фосфорилированию и активации Thick veins (4), которая отвечает за фосфорилирование R-Smad-белка Mothers against Dpp (Mad, 5). Фосфорилированный Mad образует комплекс с ко-Smad-белком Medea (6), транслогируется в ядро и запускает транскрипцию генов-мишеней.

в связывании ко-Smad-белка (Medea у дрозофилы [114–116]). Гетеромерный Smad-комплекс транслоцируется в ядро, где регулирует транскрипцию генов-мишеней.

СВЯЗЬ DPP/SMAD-ЗАВИСИМОЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Мутации в компонентах Smad-сигнального пути лежат в основе целого ряда врожденных пороков [117]. Так, гетерозиготный генотип по мутации в ТGFβ-рецепторе 2 (TGFBR2) отвечает за 10% всех случаев синдрома Марфана – системного заболевания соединительной ткани, проявляющегося в детском возрасте и сопровождающегося непропорциональным ростом, арахнодактилией, вывихом хрусталика и осложнениями сердечнососудистой системы: пролапсом митрального клапана и расслоением аорты [117, 118]. При синдроме Марфана описаны также мутации в гене TGFBR1. В 80% случаев эта врожденное заболевание происходит из-за мутаций в гене, кодирующем фибриллин – основной компонент внеклеточного

матрикса. Предполагается, что опосредованно эта мутация приводит к повышению активности TGFB/Smad-сигнального каскада. Синдром Марфана клинически частично перекрывается с синдромом Лойеса-Дитца, который также вызывается гаплонедостаточностью в гене TGFBR1. Любопытно, что и в случае мутаций в генах TGFβ-рецепторов при синдроме Марфана и Лойеса-Дитца гистологический анализ показывает увеличение фосфорилированной формы Smad, что свидетельствует о парадоксальной гиперактивации TGF_β/ Smad-сигнального каскада в этих тканях. Более того, на мышиной модели синдрома Марфана было продемонстрировано, что частичное выздоровление может быть достигнуто искусственным снижением ТСБВ [119]. Итак, врожденные пороки Марфана и Лойеса-Дитца, очевидно, связаны с избыточным уровнем активации TGFβ/Smad-сигнального каскада [117, 118]. Среди других врожденных пороков, связанных с мутациями (как правило - гаплонедостаточностью) в генах компонентов этого сигнального пути, можно назвать врожденную геморрагическую телеангиоэктазию, расслаивающую аневризму грудной аорты типа А, болезнь Камурати-Энгельманна и др. [117].

ТGFβ/Smad-сигнальный путь играет двойную роль в развитии онкологических заболеваний [120]. С одной стороны, на ранних этапах ракового перерождения этот тип внутриклеточной передачи сигнала обладает опухолесупрессорной функцией, и мутационное снижение активности этого каскада описано в ряде карцином [120]. Например, инактивирующие мутации и делеции в гене Smad4 встречаются в половине всех случаев рака поджелудочной железы [121]. ТGFβ даже испытывался как адьювант при антираковой химотерапии на преклинических моделях [122]. Опухолесупрессорное действие ТGFβ/Smad-сигнального пути обеспечивается его способностью ограничивать клеточную пролиферацию через запуск экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ, таких как INK4B и WAF1 [123, 124], а также за счет подавления экспрессии с-Мус [125]. Кроме того, TGFβ способен стимулировать апоптоз по еще не до конца изученному механизму [120, 126].

Но с другой стороны, на более поздних этапах развития рака ТGFβ способствует метастазированию, например, в случаях рака молочной железы, толстой кишки и простаты [120, 127]. Одним из путей влияния ТGFβ на метастазирование является его способность стимулировать эпителиально-мезенхимальный переход [128]. Таким образом, как снижение, так и увеличение активности TGFβ/Smad-сигнального пути способно приводить к патологиям при развитии организма и раковым перерождениям.

УЧАСТИЕ DPP/SMAD-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ В РАННЕМ РАЗВИТИИ ГЛАЗА

Как сказано выше, dpp является одним из генов-мишеней Hh при зарождении и продвижении МБ [102] (рис. 2). Как и в случае развития крыла дрозофилы [129], Нh, будучи плохо диффундирующим морфогеном, индуцирует экспрессию высокодиффузионного морфогена **Орр**, который играет значительную роль в морфогенезе глаза [100]. Dpp/Smad-сигнальный путь подавляет экспрессию фактора транскрипции Homothorax (Hth) с антериальной стороны МБ [130]. Это позволяет клеткам войти в пронейрональное состояние и делает их – к моменту приближения к ним МБ – компетентными к ответу на пришедший Нһ-сигнал. Кроме того, Dpp подавляет экспрессию другого транкрипционного фактора hairy в участке ткани непосредственно перед МБ [131], что в свою очередь необходимо для снятия транскрипционной репрессии atonal – ключевого регулятора нейрональной дифференцировки клеток (см. выше). При продвижении МБ морфогены Нh и Dpp играют частично избыточную роль [102, 131, 132] – например в регуляции экспрессии Notch-лиганда Delta [56].

VII. WNT/WINGLESS: КАНОНИЧЕСКИЙ СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД

Wnt-лиганды – семейство секретируемых липогликопротеинов, играющих ключевые роли в ходе развития организмов от губок до человека [133]. Геном человека кодирует 19 членов этого семейства, а дрозофилы – семь (см. http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow. html). Название Wnt отражает историю открытия этих белков: первый Wnt у дрозофилы (Wingless, Wg) был клонирован как один из генов сегментной полярности [134] почти одновременно с гомологичным ему геном млекопитающих как ген-участок интеграции мышиного вируса молочной железы int-1 [135]. В ходе эмбриогенеза, Wntбелки играют роль морфогенов: они синтезируются определенным участком развивающейся ткани и диффундируют, образуя градиент концентрации, который «считывается» остальными клетками; клеточные ответы на полученный сигнал зависят от локальной концентрации морфогена [74]. Поэтому нет ничего удивительного в множественной регуляции процесса секреции и диффузии Wnt-лигандов [136, 137]. Wnt-синтезирующие клетки осуществляют ряд пост-трансляционных модификаций Wnt-белка, прежде чем выпустить его во внеклеточное пространство (рис. 8). В ЭР Wnt под действием олигосахарилтрансферазного комплекса подвергается

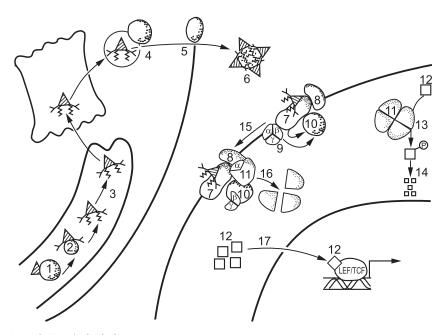


Рис. 8. Wnt/Frizzled: канонический сигнальный каскад.

В Wnt-синтезирующей клетке (слева) Wnt-лиганд подвергается нескольким пост-трансляционным модификациям в эндоплазматическом ретикулуме: N-гли-козилированию олигосахарилтрансферазным комплексом (1), пальмитоилированию О-ацилтрансферазой Рогсиріпе (2) и дополнительной модификацией палмитолеиловой кислотой (3). В транспортировке Wnt от аппарата Гольджи к плазматической мебране ключевую роль играет белок Wntless (4). Wnt-лиганды способны упаковываться в липопротеиновые частицы (6); важную роль в этом процессе играет компонент липидных плотиков reggie-flotillin (5).

В отвечающая на Wnt-сигнал клетке (справа) Wnt связывается с GPCR Frizzled (7) и 1-трансмембранным рецептором LRP5/6 (8). Ключевыми внутриклеточными передатчиками сигнала являются гетеротримерные G-белки (9) и Dishevelled (10). В отсутствии их активности Axin (11) организует комплекс белков, связывающий β -катенин (12), что приводит к его фосфорилированию (13) и протеасомной деградации (14). Под воздействием $G\alpha$ -субъединицы гетеротримерного G-белка, Dishevelled и LRP5/6, Axin переносится на мембрану (15) и вытесняется из деструкционного комплекса (16). В результате β -катенин накапливается и переносится в ядро (17), где активирует транскрипцию с участием LEF/TCF.

N-гликозилированию по нескольким сайтам (аспарагины 108 и 414 у дрозофильного Wg) [138]. Функция *N*-гликозилирования может заключаться в регуляции апикальной секреции Wnt-белка эпителиальными клетками [136, 137]. Биологически активный Wnt также несет липидные модификации: пальмитоилирование по консервативному цистеиновому остатку, лежащему в первой трети белка (цистеин 93 в Wg) осуществляется также в ЭР *О*-ацетилтрансферазой Рогсиріпе [139, 140]. Мутация в гене рогс приводит к накоплению Wnt в ЭР и полностью предотвращает секрецию морфогена [140, 141]. Дополнительная модификация палмитолеиловой кислотой происходит по консервативному сериновому остатку (серин 209 в Wnt3a), однако неясно, отвечает ли за нее Рогс или иная ацилтрансфераза [142].

В процессе секреции Wnt-лигандов важную роль играет специализированный трансмембранный белок Wntless/Evi/Sprinter [143—145]. В его отсутствии клетки нематод, дрозофил и млекопитающих неспособны выделять Wnt-лиганды во внеклеточную среду. Wntless доставляет Wnt-белки от аппарата Гольджи к плазматической мембране. Для непрекращающегося выделения все новых молекул Wnt, созревающих в ЭР и аппарате Гольджи, требуется возврат белка Wntless обратно в Гольджи. В таком рециркулировании Wntless важную роль играет так-называемый ретромерный комплекс белков – в его отсутствии Wntless скапливается на плазматической мембране, и секреция Wnt блокируется [146—149].

Наличие упомянутых липидных модификаций делает Wnt-лиганды, как и описанный выше Hh-морфоген, гидрофобными и в мономерной форме плохо диффундирующими сквозь ткань из-за высокого сродства к внешней стороне мембраны и внеклеточному матриксу [139, 150]. Таким образом, для Wnt, как и для Hh, встает проблема доставки на дальние расстояния, что необходимо для их функционирования в качестве морфогенов, и для Wnt также показана способность к упаковке и распространению в липопротеиновых частицах [76]. Более того, в Wnt-производящих клетках нами была выявлена особая роль белка reggie-flotillin в направлении Wnt-секреции по пути, позволяющему такую упаковку для дальней доставки [77]. Как мы покажем ниже, параллели между Wnt- и Hh-зависимыми сигнальными программами не исчерпываются особенностями секреции и диффузии этих морфогенов.

Wnt-лиганды связываются на поверхности клеток с ко-рецепторами двух типов: 1-трансмембранным LRP5/6 (Arrow у дрозофилы) и 7-трансмембранным Frizzled (Fz) (рис. 8). Fz родственен рецептору

Smo, передающему сигнал в Hh-зависимом пути, и, как и Smo, является рецептором, сопряженным с G-белками (G protein-coupled receptor, GPCR) [151–153]. Это самое многочисленное семейство рецепторов животных в качестве непосредственных цитоплазматических передатчиков сигнала использует гетеротримерные G-белки, состоящие из ГДФ/ГТФ-связывающей Gα-субъединицы и Gβγ-гетеродимера [154]. В неактивном состоянии Gα связана с ГДФ и Gβγ. Активированный GPCR действует как GEF (guanine nucleotide exchange factor, фактор обмена гуаниновых нуклеотидов) и катализирует замену ГДФ на ГТФ. Это приводит к диссоциации гетеротримерного комплекса на Gα-ΓΤΦ и СВу, каждый из которых способен активировать последующие белки-эффекторы [155]. Fz-рецепторы главным образом связывают и активируют гетеротримерные G-белки типа Gi/о как в дрозофиле, так и в клетках млекопитающих [153, 156, 157]. Другим важным передатчиком сигнала от Fz является цитоплазматический белок Dishevelled (Dsh) [158]. Dsh связывается с С-концом Fz [159], в то время как гетеротримерные G-белки, как правило, взаимодействуют с внутриклеточными петлями GPCR [160]. Остается невыясненным, возможно ли одновременное взаимодействие Fz-рецептора с обоими типами внутриклеточных передатчиков. Следует отметить, однако, что в ряде генетических экспериментов Dsh ведет себя как белок, действующий «ниже» гетеротримерных G-белков в передаче сигнала от Fz [156, 161]. Возможное объяснение этому феномену было дано в исследованиях, продемонстрировавших физическое взаимодействие Dsh с Gβγ [162–164]. Gβγ, высвобождаемые наряду с Gαсубъединицей из исходно тримерного G-белка GEF-активностью Fz-рецептора, остаются связанными с плазматической мембраной благодаря своим липидным модификациям [165] и рекрутируют Dsh из цитоплазмы, позволяя ему взаимодействовать с Fz [163].

Промежуточным итогом действия этих внутриклеточных передатчиков сигнала является перестройка так-называемого деструкционного комплекса белков, куда входят Axin, APC, казеин-киназа (casein kinase, CK) и киназа глюкоген синтазы (glucogen synthase kinase 3β, GSK3β) [166]. Функция этого комплекса состоит в связывании и последовательном фосфорилировании цитоплазматического β-катенина, что приводит к его убиквитинилированию и последующей протеасомной деградации [167] (рис. 8) — здесь уместно отметить еще одно сходство с Hh-зависимым сигнальным каскадом, вплоть до участия одной из киназ (GSK3β) как в Hh-зависимом комплексе, расщепляющем Сi, так и в Wnt-зависимом комплексе, деградирующем β-катенин.

Ключевую роль в запускаемой Wnt перестройке деструкционного комплекса играет связывание с белком Ахіп, организующим этот комплекс, рецептора LRP5/6 и внутриклеточных передатчиков сигнала Dsh и Gα-субъединицы гетеротримерного белка Go, что вытесняет остальные компоненты комплекса. Ахіп – белок с несколькими оформленными доменами и рядом неупорядоченных участков, предоставляющий платформу для связывания множественных партнеров [168, 169]. Так, Gao способен физически взаимодействовать с RGS-доменом Axin [163], вероятно, препятствуя связыванию такого компонента деструкционного комплекса как АРС [170]. С другой стороны, Dsh связывается с лежащим на противоположном конце DIX-доменом Axin [171]. Благодаря совместному действию Dsh и Gao, Axin переносится на мембрану [163, 172], где, наконец, также начинает взаимодействовать с цитоплазматическим участком LRP5/6 [173]. Данное взаимодействие стимулируется фосфорилированием LRP5/6 казеин-киназой и GSK3β [174, 175]. В результате этих скоординированных действий Ахіп-зависимый деструкционный комплекс перестраивается и становится неспособным связывать и фосфорилировать β-катенин. В результате последний постепенно накапливается в цитоплазме, диффундирует в ядро и, с помощью ряда транскрипционных ко-факторов, прежде всего LEF/TCF, запускает транскрипцию генов-мишеней Wnt-зависимого сигнального пути [176].

В работе Wnt-каскада важную роль играет эндоцитоз. В отличие от большинства GPCR, интернализация которых приводит к прекращению внутриклеточной передачи сигнала, интернализация Fz-рецепторов только усиливает сигнал [177]. Важную роль в этом процессе амплификации сигнала играет малая ГТФаза Rab5 – центральный регулятор ранних этапов эндоцитоза [177, 178]. Этот G-белок рекрутируется из цитоплазмы на плазматическую мембрану, где локализованы его GEF-регуляторы, Gα-субъединицей гетеротримерного белка Go [178]. Оказавшись в близости Fz-рецепторов, Rab5 стимулирует их интернализацию в ранние эндосомы. По еще не вполне понятному механизму Fz-рецепторы (или скорее Wnt-Fz-LRP5/6-комплексы) оказывают более значительное влияние на перестройку Ахіп-зависимого деструкционного комплекса, находясь в этом компартменте. Возможно, что в передаче сигнала от плазматической мембраны и из ранних эндосом по-разному участвуют разные компоненты Wnt-зависимой передачи сигнала [153, 178]. Этот механизм может использоваться клеткой для различных ответов на разные концентрации Wnt-лигандов, либо на различные способы их упаковки и презентации [153].

WNT-ЗАВИСИМЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ И ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Поскольку Wnt-зависимый сигнальный путь играет важную роль в развитии организма, неудивительно, что мутации в генах, кодирующих компоненты этого каскада, лежат в основе ряда наследственных заболеваний-пороков развития [179]. Так, мутации в гене LRP5 ответственны за дефекты в развитии скелетной массы у человека: активирующие мутации приводят к избыточной скелетной массе, а инактивирующие – к снижению костной массы и остеопорозу [180– 1821. Доминантные мутации в гене Fz4 отвечают за развитие экссудативной семейной витреоретинопатии - сосудистого заболевания сетчатки, сопровождающегося периферическими помутнениями стекловидного тела и экссудатами в толще сетчатки [183]. Причина доминантности этой мутации состоит в том, что образующийся в результате мутации урезанный Fz4, олигомеризуясь с нормальным рецептором, задерживает его в ЭР [184]. Описан также ряд других наследственных заболеваний, связанных с неправильной работой Wnt-каскада [179].

У взрослого организма Wnt-каскад, в основном, выключен. Однако, как гипоактивация, так и избыточная активация этого сигнального пути, например, в результате соматических мутаций приводит к патологиям. Избыточная активация Wnt-пути в ряде тканей способствует раковому перерождению [185]. Около 50% всех случаев рака молочной железы связаны с аберрантной активацией Wnt-каскада, в частности, в результате перепроизводства Wnt-лигандов либо потери производства природных Wnt-антагонистов, таких, как Dickkopf и sFRP (secreted frizzled-related proteins) [186]. Мутации в генах APC и Axin лежат в основе рака толстой кишки: более 90% всех случаев этого заболевания связаны именно с такими мутациями [187]. Другие ткани также не застрахованы от возникновения злокачественных опухолей в результате соматической гиперактивации этого каскада: мутации в его компонентах описаны во многих случаях рака желудка, яичников, простаты и др. [187].

С другой стороны, пролиферативная функция Wnt-зависимого сигнального пути определяет важную роль активации этого каскада при регенерации различных тканей после повреждений, и недостаточная активация Wnt-сигнальной передачи, как предполагается, препятствует полноценному восстановлению тканей млекопитающих [188]. На направленной стимуляции этого каскада основаны подходы к стимуляции регенерации, в частности — срастания костей после переломов [189]. Однако и избыточная Wnt-зависимая пролиферация может вызывать патологии (отличные от онкообразования, описан-

ного выше). Например, чрезмерная Wnt-зависимая пролиферация гладкомышечных клеток сосудов может приводить к утолщению стенки артерий и закупорке сосуда; повышенная активность этого каскада также отвечает за гипертрофию сердца [190].

Наконец, Wnt-сигнальный путь имеет важное значение при нейрональном ремоделировании [191], и недоактивация Wnt-каскада в нейронах связана с развитием нейродегеративных заболеваний, например болезни Альцгеймера [192]. В частности, показано, что β-амилоидный пептид способен физически связывать Fz рецептор и препятствовать активации Wnt-зависимой передачи сигнала [193]. Кроме того, на культуре нейрональных клеток показано, что направленная активация Wnt-пути имеет нейропротекторное влияние при обработке нейронов β-амилоидами [194, 195].

Таким образом, для нормального функционирования тканей важен верный баланс между недостаточным и избыточным уровнем активности Wnt-зависимого сигнального пути [196]. Исследование молекулярных механизмов работы этого каскада позволяет идентифицировать новые компоненты, которые могут служить мишенями для направленной активации или деактивации под воздействием низкомолекулярных лекарств [197]. Wnt-каскад играет важную роль в развитии глаза дрозофилы, представляющего собой идеальный объект для исследования этого сигнального механизма.

WNT/WINGLESS-ЗАВИСИМАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА В РАННЕМ РАЗВИТИИ ГЛАЗА ДРОЗОФИЛЫ

В развитии глазоантеннального диска Wg выполняет несколько функций, таких как предоставление позиционной информации для морфогенеза диска, стимуляция дифференцировки тканей головы и др. [198]. В первом личиночном возрасте Wg проявляется в дорсальной части глазоантеннального диска [199], где способствует экспрессии гомеодоменовых генов Iroquois-комплекса, в частности mirror [200]. Эти гены подавляют дорсальную экспрессию Fringe – гликозилтрансферазы Notch-рецептора [51–53]. Как описано в разделе «Notch-каскад на ранних этапах развития глаза» главы IV, эксклюзивная экспрессия Fringe в вентральной части диска играет важную роль в спецификации экватора и выборе точки инициации морфогенетической борозды (МБ).

Во втором личиночном возрасте Wg присутствует во всей толще диска, тогда как в третьем личиночном возрасте зона экспрессии Wg ограничена боковыми краями глазной части диска [201, 202]. Wg-зависимая передача сигнала способствует образованию головной

капсулы за счет клеток глаза: направленная активация Wg-каскада приводит к преобразованию тканей глаза в кутикулу головы, тогда как мутационное подавление этого сигнального пути приводит к увеличению глаза [203, 204]. Убывающий к экватору градиент Wgлиганда предотвращает неправильную инициацию МБ (рис.2) [205, 206]. Контроль Wg-каскада за дифференцировкой клеток диска в головную капсулу в противовес тканям глаза определяется регуляцией образования МБ: снижение активности Wg трансформирует ткань капсулы в дополнительную глазную ткань за счет инициации эктопических МБ. И напротив, мутационная активация Wg-каскада подавляет инициацию нормальной МБ, блокируя дифференцировку глаза; клетки глазного диска в этом случае образуют избыточную кутикулярную ткань головы [203–206].

РОЛЬ WINGLESS-КАСКАДА В ФОРМИРОВАНИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ СТРУКТУР ГЛАЗА

Нормальные омматидии глаза дрозофилы отделены от кутикулы головной капсулы рядом специфических структур. Так, на самой границе с головной капсулой глаз окружен «пигментной оправой» (pigment rim, PR) – узкой полоской ткани, состоящей исключительно из пигментных клеток, изолирующих глаз от внешней засветки [9]. Кроме того, на дорсальной стороне глаза за пигментной оправой следует такназываемая «дорсальная оправа» (dorsal rim, DR) – ряд особых омматидиев, специализированных на детекции поляризованного света за счет особенно крупных центральных рабдомеров клеток R7 и R8, обе из которых экспрессируют УФ-чувствительный опсин-3 (см. раздел «Введение: структура и функции глаза дрозофилы»); омматидии DR также имеют необычную нейрональную проекцию в оптический ганглий [9, 207]. В формировании как PR, так и DR ключевую роль играет Wg, секретируемый головной капсулой [9, 208]. PR образуются на стадии куколки в результате апоптоза не-пигментных клеток омматидиев, выстилающих головную капсулу [209]. Вообще Wg способен вызывать апоптоз дифференцированных клеток глаза [9, 209–211], и один из самых ранних идентифицированных аллелей wg, glazed, приводит к уменьшению размера глаза из-за гибели непигментных клеток глаза за счет эктопической экспрессии Wg [212]. Кроме того, эктопический Wg вызывает «зеркальный» фенотип глаза благодаря потере антиотражательного нанопокрытия роговицы [2]. Образование DR происходит при более низких, чем PR, концентрациях Wg, диффундирующего из головной капсулы, стимулирующих синтез транскрипционного фактора Hth [9, 208].

ДИФФУЗИЯ WINGLESS УСТАНАВЛИВАЕТ ГРАДИЕНТ «ФАКТОРА Х»

В дополнении к описанной выше функции Wg в ранней установке дорсально-вентральной спецификации глазного диска (см. выше раздел «Wnt/Wingless-зависимая передача сигнала в раннем развитии глаза дрозофилы»), Wg играет важную роль в более позднем формировании экватора и хиральности омматидиев. Диффундируя вглубь глаза из головной капсулы с дорсальной и вентральной сторон, Wg образует понижающийся градиент концентрации, с минимумом в зоне экватора. Формирование клона клеток, эктопически синтезирующих Wg внутри глаза, способно реполяризовать омматидии неавтономным образом: омматидии, расположенные полярно (со стороны головной капсулы) от Wg-продуцирующих клеток, меняют свою хиральность и ориентацию зеркальным образом и образуют эктопический экватор на границе с нормально-ориентированными омматидиями [213, 214]. Эффективность такой неавтономной реполяризации тем сильнее, чем дальше от головной капсулы расположен клон. Сходным образом образование клона клеток, не способных передавать сигнал от Wg, например, из-за потери таких компонентов Wg-каскада, как Arrow, Dsh или β-катенин, реполяризует омматидии – но с экваториальной стороны клона, и тем сильнее, чем ближе к полюсам (головной капсуле) располагаются клоны [214]. На основе этих данных была сформулирована гипотеза о том, что градиент концентрации Wg от полюса к экватору формирует встречный градиент «фактора X» – секретируемого или трансмембранного вещества (веществ), определяющего, в свою очередь, активацию Fz-зависимого «неканонического» сигнального каскада, определяющего плоскостную полярность омматидиев [214, 215]. Этот сигнальный каскад описан в следующей главе.

VIII. НЕКАНОНИЧЕСКИЙ FRIZZLED/PCP-СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД

В дополнение к вышеописанному каноническому, β-катенин-зависимому сигнальному каскаду, запускаемому Fz-рецепторами в ответ на связывание с Wnt-лигандами и регулирующему транскрипцию, Fz-рецепторы способны активировать неканонические сигнальные каскады [216]. Самый изученный из них — каскад, регулирующий плоскостную полярность (planar cell polarity, PCP). Fz/PCP-сигнальный каскад обеспечивает «горизонтальную» поляризацию клеток эпителия в плоскости ткани, перпендикулярно «вертикальной» апикально-базолатеральной поляризации эпителиальных клеток.

Это обеспечивается соответствующей поляризацией цитоскелета и не зависит от изменения транскрипционного профиля клеток [217]. Морфологически РСР проявляется, например, в образовании клетками крыла насекомого актиновых выростов-волосков, каждый из которых растет в дистальном направлении. У млекопитающих РСР проявляется, в частности, в поляризации стереоцилий волосковых клеток органа Корти во внутреннем ухе. Клетки, образующие РСР, отвечают поляризацией своего цитоскелета на внеклеточную поляризующую информацию. В этом смысле РСР имеет сходство с хемотаксисом лейкоцитов и направленным ростом дрожжевых клеток, стимулируемым феромоном [218, 219]. При всех этих явлениях поляризация цитоскелета инициируется GPCR, в случае РСР – Fz [220].

Однако вопрос о том, какой лиганд активирует Fz/PCP-сигнальный каскад, остается открытым. Если у позвоночных показано участие «неканонических» Wnt-лигандов Wnt5a, Wnt11 и др. в активации PCP [221, 222], то эксперименты на дрозофиле продемонстрировали, что ни Wg, ни другие Wnt-лиганды не являются «фактором X» — таинственным активатором Fz/PCP-сигнального пути [223, 224]. Несколько лет назад стало бурно развиваться изучение роли белков Fat, Dachsous и Four-jointed в регуляции PCP. Эти белки образуют градиенты экспрессии и активности в развивающейся ткани и таким образом подходят на роль «фактора X» [225, 226]. Однако генетические эксперименты на дрозофиле однозначно продемонстрировали, что Fz и Fat/Dachsous организуют независимые сигнальные пути, каждый из которых вносит свой вклад в формирование PCP [227].

Как организована внутриклеточная передача сигнала в Fz/ PCP-сигнальном каскаде? Fz-рецепторы, изначально равномерно распределенные в апикальной плазматической мембране, по мере развития РСР накапливаются на одном ее полюсе (дистальном в случае клеток крыла дрозофилы), определяя будущее место активации актинового цитоскелета (и выроста волоска в клетках крыла) [228]. По-видимому, можно разделить белки, участвующие в установлении PCP, на передатчики Fz-сигнала и его усилители. Моделирование PCP также разделяет Fz/PCP-сигнальный каскад на две фазы: получения транзиентного поляризующего сигнала и последующее установление клеточной поляризации на основе массивной релокализации белковкомпонентов РСР [229]. Непосредственными передатчиками Fz/PCPсигнала, как и в каноническом Wnt-зависимом пути, по-видимому, являются гетеротримерные G-белки и Dsh [156, 230]. Белками, играющими важную роль в последующей релокализации Fz-рецепторов, являются Prickle, Van Gogh, Diego и 7-трансмембранный Flamingo [231–235]. Кроме того, в релокализации Fz участвуют малые Rab-белки, регулирующие везикулярный транспорт, а именно Rab5, описанный выше (см. раздел «Wnt/Wingless: канонический сигнальный каскад»), и Rab11, отвечающий за медленное рециркулирование эндосом на плазматическую мембрану [178]. По-видимому, Rab5-зависимый эндоцитоз необходим для закрепления и транспорта Fz-содержащих эндосом по микротрубочкам в дистальном направлении [178, 236, 237], а Rab11-зависимое рециркулирование — для высвобождения Fz на дистальную мембрану [178]. Наконец, малые G-белки семейства Rho отвечают за запуск программы ответа на клеточную поляризацию: рост актиновых волосков на крыле дрозофилы и поворот омматидиев в ее глазу [238].

FRIZZLED/PCP-СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД И ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

У позвоночных РСР участвует в закрытии нейрональной трубки [239]. Мутации в РСР-компонентах вызывают дефекты в этом процессе позднего эмбриогенеза на модельных животных [217, 239]. У человека мягкие дефекты закрытия нейрональной трубки встречаются у 1–2 новорожденных на 1000, и в некоторых случаях связаны с мутациями в гене Vangl1 (гомолог дрозофильного Van Gogh) [240]. Fz/PCP-сигнальный каскад также участвует в развитии злокачественных опухолей, но, в отличие от канонического β-катенин-зависимого каскада, способного запускать раковое перерождение, Fz/PCP вовлечен в более поздние стадии раковых заболеваний, такие как инвазивность и метастазирование раковых клеток [241]. Например, Wnt5a повышает метастатическую агрессивность при раке желудка и меланоме, напрямую стимулируя миграцию раковых клеток [242, 243] — еще одна параллель между РСР и хемотаксисом [218].

FRIZZLED/PCP-СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД В РЕГУЛЯЦИИ ПОЛЯРНОСТИ ОММАТИДИЕВ ДРОЗОФИЛЫ

Омматидий дрозофилы в поперечном сечении образует асимметричный трапезоид, где рабдомер фоторецептора R3 выступает в сторону от остальных рабдомеров (рис. 1 и 4). Таким образом, омматидии несут хиральность, которая является одинаковой для всех омматидиев дорсальной части глаза и зеркально отражена в омматидиях вентральной половины. Кроме того, все омматидии ориентированы R3-вершинами в сторону полюсов глаза (рис. 4). Хиральность и ориентация омматидиев определяется уровнем активации Fz/PCP-сигнального пути в клетках-предшественниках фоторецепторов R3 и R4. В омматидиевом прекластере эти клетки исходно занимают

симметричные позиции на противоположных сторонах прекластера, так что одна из них расположена ближе к экватору, а вторая – ближе к полюсу глаза [215]. Поскольку концентрация «фактора X», как предполагается, максимальна на экваторе и убывает к полюсу, клетка-предшественник, исходно ближняя к экватору, получает больший сигнал «фактора X» [215]. На следующих этапах развития прекластера клетки-предшественники R3/R4 входят в физический контакт друг с другом и «сравнивают» уровни активации Fz/PCPкаскада. Это сравнение достигается негативным влиянием Dsh на Notch [244]: активированный Fz-сигнальным каскадом Dsh физически связывает цитоплазматический домен Notch и направляет этот рецептор в деградационный компартмент [245]. Как и в крыле дрозофилы, Fz/PCP-сигнальный каскад в клетках R3/R4 также приводит к релокализации компонентов каскада, так что будущая R3-клетка накапливает Fz и Dsh на границе с будущей R4, тогда как вторая локализует их на противоположной стороне, вне зоны контакта с соседкой [246, 247]. Это также способствует избирательному снижению количества Notch-рецептора в будущей R3 на ее границе с R4. И здесь включается многократно описанный выше (раздел 3) процесс латерального ингибирования – усиления различия в уровне активации Notch-каскада между соседствующими клетками [215, 248, 249]. В результате в клетке, имевшей больший уровень активации Fz/ PCP-каскада, полностью подавляется Notch-каскад, она становится R3-фоторецептором и выдвигается из плотного омматидиевого прекластера. Вторая клетка становится R4.

IX. РЕЦЕПТОР-ТИРОЗИНКИНАЗНЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД

Человеческий геном кодирует 58 трансмембранных рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью, распределяющихся по 20 функциональным группам [250], в том числе семейство рецепторов эпидермальных факторов роста (EGFR), семейство инсулиновых рецепторов, семейство рецепторов факторов роста фибробластов (FGFR) и др. В большинстве случаев рецепторные тирозинкиназы (РТК) являются мономерами, димеризующимися при связывании лиганда. Геном дрозофилы кодирует всего пятнадцать РТК. Однако исследования, проведенные на этом модельном организме, сыграли ключевую роль в дешифровке РТК-сигнального каскада. Поэтому мы отойдем от стандартной структуры нашего обзора и опишем этот каскад сразу на примере развития R7-фоторецептора дрозофилы и

роли внутриклеточной передачи сигнала, инициируемой РТК Sevenless в этом процессе (рис. 9).

Первая человеческая РТК – EGFR – была клонирована в 1984 г.; ее амплификация в клетках эпидермоидной карциномы и гомология с онкогеном v-erb-В птичьего вируса эритробластоза немедленно указали на потенциальную роль РТК в онкообразовании (см. ниже) [251]. Sevenless (Sev), первая РТК дрозофилы, была клонирована 1987 г. [252]. Исходно мутация в гене sev была получена в лаборатории Сеймура Бензера в ходе поиска мутантов, дефектных по фототаксису [253]: дикие мушки предпочитали УФ-свет в Т-лабиринте, а мутантны по sev утрачивали это предпочтение. Последующие работы показали, что R7-фоторецептор, несущий УФ-чувствительный опсин, отсутствует в данных мутантах [254], и он заменен на дополнительную конусную клетку [255]. Лигандом Sev оказался трансмембранный белок Bride of Sevenless (Boss), экспрессируемый R8-фоторецептором для активации соседней R7клетки [256]. Последующие эксперименты с целью поиска мутаций, способных фенокопировать либо восстанавливать фенотип sev, заложили архитектуру РТК-сигнального каскада. Так, была показана необходимость киназной активности Sev для формирования R7фоторецепторов, а также ее способность осуществлять аутофосфорилирование [257, 258]. Ключевым внутриклеточным передатчиком сигнала от Sev оказался белок Son of Sevenless (Sos) [259], который был идентифицирован как фактор обмена гуаниновых нуклеотидов для малой ГТФазы Ras1 [260, 261]. Более того, было установлено, что активированная форма Ras1 способна восстанавливать потерю R7 при мутациях sev и boss, а также вызывать формирование множественных R7-клеток [262].

Центральную роль в активации Sos и Ras1 активными (то есть аутофосфорилированными) формами Sev играет SH2/SH3-домен-со-держащий адаптерный белок Downstream of Receptor Kinase (Drk/Grb2), который связывается с Sos, а своим SH2-доменом взаимодействует с фосфорилированной Sev, являясь мостиком между ними [263, 264]. Если факторы обмена гуаниновых нуклеотидов активирует G-белки, то стимулирующие ГТФазу белки (GTPase activating proteins, GAP) выполняют обратную функцию, ускоряя переход G-белков в неактивное ГДФ-связанное состояние. Gap1 был изолирован как негативный регулятор Ras1 и всего Sev-зависимого сигнального каскада [265]. Наконец, начальная киназа MAP (mitogen-activated protein)-киназного комплекса Raf была идентифицирована как важнейший компонент РТК-каскада, активируемый Ras1 и способный при конститутивной

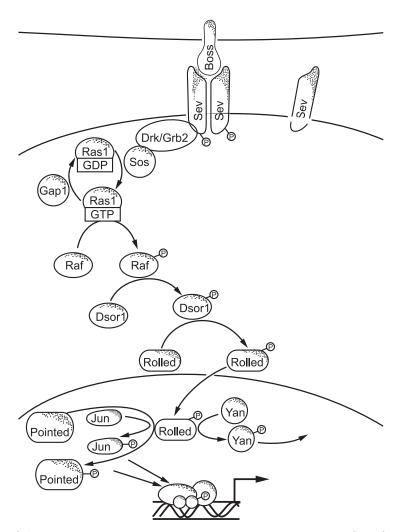


Рис. 9. Рецептор-тирозинкиназный сигнальный каскад на примере Sevenless.

Связывание трансмембранного лиганда Bride of Sevenless (Boss) с рецептор-тирозинкиназой Sevenless (Sev) приводит к димеризации и аутофосфорилированию последней. Фосфорилированная Sev узнается адаптерным белком Drk/Grb2, который рекрутирует из цитоплазмы фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Son of Sevenless (Sos). Sos активирует малый G-белок Ras1 (обратная функция осуществляется Gap1). ГТФ-связанный Ras1 активирует MAP-киназный сигнальный каскад, состоящий из киназ Raf, Dsor1 и Rolled, последовательно фосфорилирующих и активирующих друг друга. Активная форма MAP-киназы Rolled транслоцируется в ядро, где фосфорилирует транскрипционные активаторы Pointed и Jun, а также транскрипционный супрессор Yan.

активации стимулировать образование R7-клеток даже в отсутствие Sev [266]. Следующие киназы MAP-киназного комплекса – MAPKK Dsor1 (Downstream of raf1) [267] и MAPK Rolled [268] также необходимы для спецификации R7. Мишенями MAP-киназы Rolled выступают ядерные белки-активаторы транскрипции Jun [269] и Pointed [270], а также репрессор Yan [270]. Фосфорилирование MAP-киназой запускает транскрипцию ряда генов-мишеней, в том числе гена phyllopod [205], который совместно с другим ядерным белком Sina необходим для дальнейшей спецификации R7-фоторецептора [262, 271]. Кроме описанных здесь компонентов PTK-сигнального пути выявлен ряд дополнительных регуляторов этого каскада [272].

УЧАСТИЕ РТК-СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ В РАЗВИТИИ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Клонирование первой РТК (EGFR) выявило потенциально важную роль этого типа сигнальной передачи в развитии злокачественных опухолей [251]. Огромный массив последующих работ подтвердил эту роль. Существует два принципиальных пути раковой трансформации за счет гиперактивации РТК в клетках человека. Первый – избыточное производство РТК за счет генной амплификации; второй – активирующие мутации в генах РТК [273]. Так, гены рецепторов EGFR и ErbB2 часто амплифицированы в карциномах легких и молочной железы [273, 274]. В частности, в 30% случаев рака молочной железы ген ErbB2 амплифицирован в 2-20 раз, и уровень гиперэкспрессии ErbB2 коррелирует с агрессивностью опухоли и снижением выживаемости пациента [275]. Описаны также активирующие мутации в EGFR в клетках глиобластомы человека [276]. Активирующие мутации в гене РТК Ret лежат в основе наследственных опухолевых синдромов: множественной эндокринной неоплазии 2А и 2Б, а также семейной медуллярной тироидной карциномы [273]. Сообщается о множестве других случаев амплификаций и активирующих мутаций в генах РТК, способствующих развитию рака в различных тканях [273, 274].

Активный центр киназ крайне удобен для разработки малых молекул-ингибиторов, как правило, основанных на аналогах АТФ (такое удобство белков-мишеней называют «druggable»). Благодаря этому фармацевтические компании активно занимаются поиском антираковых лекарств, блокирующих активность тех или иных РТК. Значительное количество антираковых препаратов — ингибиторов РТК, уже выведено на рынок [273, 274, 277]. Вот некоторые примеры:

- Imatinib (Glivec) компании Novartis, ингибирует среди прочих киназ РТК с-КІТ и используется в частности для лечения с-КІТ-позитивных стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта [278];
- Iressa (Gefitinib) компании AstraZeneca ингибирует EGFR и используется в лечении немелкоклеточного рака легких [279];
- Pazopanib (Votrient) компании GlaxoSmithKline, воздействующий среди прочего на PTK VEGFR (рецептор васкулярного эндотелиального фактора роста), используется для лечения продвинутой почечной карциномы [280];
- Lapatinib компании GlaxoSmithKline, воздействующий на EGFR и Erb2, используется для лечения Erb2-гиперэкспрессирующих метастатических форм рака молочной железы [281].

РТК-СИГНАЛЬНЫЙ КАСКАД В РЕКРУТИРОВАНИИ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ ДРОЗОФИЛЫ

Выше мы описали роль передачи сигнала от РТК Sev в формировании фоторецептора R7. В отсутствие этого сигнала R7-предшественник вместо приобретения нейрональной функции становится конусной клеткой [255]. Но РТК-зависимая передача сигнала играет более общую роль в нейрональной дифференцировке в развивающемся глазу. А именно, РТК EGFR и ее секретируемый лиганд Spitz необходимы для последовательного рекрутирования фоторецепторов R1–R6 в омматидиевый прекластер, а затем и остальных клеток омматидия (см. рис. 3) [100]. Удаление EGFR или Spitz приводит к формированию крайне редуцированного глаза, содержащего только R8—фоторецепторы, которые первыми дифференцируются и единственные не нуждаются в активации РТК-каскада для своего появления [282, 283].

R8-клетки первыми начинают синтезировать Spitz, стимулируя ближайшие клетки к нейрональной дифференцировке — эти клетки становятся фоторецепторами R2 и R5. Последние также начинают производить Spitz, что способствует рекрутированию R3 и R4, а затем R1 и R6 (рис. 3). Даже в клетке-предшественнице R7 искусственная активация EGFR может компенсировать отсутствие Sev [282].

Не только фоторецепторы, но и конусные клетки нуждаются для своей дифференцировки в активации Spitz-EGFR каскада [282]. Почему же тогда конусные клетки не становятся фоторецепторами типа R1/6? – Потому, что в отличие от R1/6, конусные клетки также активируют Notch-каскад за счет контакта с Delta-экспрессирующими фоторецепторами (рис. 3) [12]. Но тогда почему конусные клетки не становятся R7-фоторецепторами, которые, как описано выше,

требуют получения и Notch-, и РТК-сигнала (за счет взаимодействия Boss-Sev)? — Потому, что, в отличии от R7-клеток, получающих высокий уровень активации РТК-каскада, активация этого каскада в конусных клетках в результате взаимодействия Spitz с EGFR оказывается значительно слабее [12].

Кроме того, важную роль в клеточной дифференцировке в развивающемся глазу играет Argos – внеклеточный ингибитор EGFR [284], секретируемый клетками в ответ на активацию EGFR-сигнального каскада [285] и обладающий большей диффузионной способностью по сравнении с Spitz [286]. На основе этих данных была предложена гипотеза о синтезе плохо диффундирующего активатора и хорошо диффундирующего ингибитора EGFR, осуществляемого расширяющимися концентрическими кругами вокруг R8, захватывая все новые клетки в растущий омматидиевый кластер [282]. Эта модель дает возможность предположить важность временного компонента в РТКстимулируемой дифференцировке: клетки, рекрутируемые ранее, становятся фоторецепторами, позднее – конусными клетками, а еще позднее – пигментными [282].

Кроме регуляции дифференцировки, активация РТК-сигнального каскада через Spitz-EGFR лиганд-рецепторную пару важна для предотвращения апоптоза в клетках глаза дрозофилы, в том числе и для выживания вторичных и третичных пигментных клеток [283, 287].

Х. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ РАЗВИТИЯ ГЛАЗА ДРОЗОФИЛЫ

Многочисленные данные, описанные в предыдущих разделах, основаны на отработанных гистологических, иммунохимических и микроскопических методах анализа как глазоантеннальных дисков личиночных возрастов, так и срезов глаза взрослой мухи, отшлифованных множеством лабораторий. Однако не эти необходимые методологии делают дрозофилу столь удобным объектом исследований, а уникальные технологии генетических манипуляций. Более ста лет радиационного, химического и основанного на мобилизации Р-элементов мутагенеза в сочетании с компактностью генома дрозофилы создали огромную коллекцию мутантных линий, покрывающих большую часть генов этого насекомого. Само развитие этих методов мутагенеза дало колоссальный толчок дальнейшим исследованиям и привело к прорывным открытиям общебиологического значения (см. например, [67]).

Многие (и зачастую – наиболее интересные) мутации гомозиготно летальны, и подчас на слишком ранних стадиях эмбриогенеза, что

препятствует изучению роли соответствующих генов в развитии глаза. Чтобы обойти эту проблему, исследователями была разработана FLP/ FRT-система получения соматических клонов, гомозиготно мутантных по желаемому гену [288, 289]: в различные места хромосом дрозофилы были интегрированы FRT-последовательности (FLP recombinase recognition target). Исследуемый мутантный аллель (например, аллель гена arrow, цитологически локализованного в положении 50A9-50A11 правого плеча второй хромосомы) рекомбинируют с располагающейся проксимально на хромосоме FRT-последовательностью (например, FRT42D, цитологически локализованного в положении 42D той же хромосомы). Далее, требуется маркерный ген, которым зачастую при изучении глаза выступает white, кодирующий пигмент пигментных клеток и фоторецепторов, интегрированный дистально от FRT (при этом эндогенная копия white на первой хромосоме мутирована). Наконец, требуется ключевой в данном экспериментальном подходе ген дрожжевой флипазы (FLP), интегрированный в геном дрозофилы, например, под контролем промотора белка теплового шока (hs-FLP). В итоге получают ранних личинок, например возраста 24–48 часов после откладывания яйца, гетерозиготных по исследуемой мутации, следующего генотипа: white[-], hs-FLP; FRT42D, arrow [2] /FRT42D, white[+]. Тепловой шок (1 час на 37°С) вызывает экспрессию флипазы, которая стимулирует сайт-специфическую рекомбинацию между двумя FRT-сайтами в делящихся соматических клетках. В результате гетерозиготная материнская клетка производит одну дочернюю клетку, гомозиготно мутантную по arrow [2], и одну, гомозиготно дикого типа по гену arrow. Одновременно с этим первая клетка теряет маркер white[+]. Делясь, эти клетки образуют клоны. Интересующий нас клон, идентифицируемый в цельном глазу и на гистологических срезах по отсутствию пигмента, будет полностью лишен белка Arrow (ко-рецептора Wg), что позволяет изучать его роль и функцию Wnt-зависимого сигнального каскада в развитии глаза [9, 214]. Следует добавить, что эмбрионы, гомозиготно мутантные по arrow [2], дефектны в установлении сегментной полярности и умирают, не производя личинок даже первого личиночного возраста [290]. Кроме hs-FLP, вызывающей экспрессию флипазы повсюду под влиянием теплового шока, можно использовать более ткане-специфические конструкции, например, ey-FLP, экспрессирующей флипазу под контролем регулирующих последовательностей гена eyeless [291].

Огромную роль в развитии генетики дрозофилы сыграла технология трансгенеза – встраивания чужеродных генов в геном насекомого. Этот метод использует последовательности и фермент мобильных

элементов (Р-элементов) для случайной интеграции нужной ДНК в геном [292]. Недавно были разработаны новые методы для направленного встраивания в строго определенные локусы [293–296].

Другая технология, имеющая колоссальное значение в дрозофильной генетике, была создана также на основе привнесения в геном насекомого чужеродных дрожжевых последовательностей. Речь идет о знаменитой Gal4/UAS-системе экспрессии [297]. Исследуемый ген (дрозофильный или человеческий, дикий или мутантный) клонируется в кассету, содержащую последовательность UAS (upstream activation sequence): энхансерный элемент, не узнающийся факторами транскрипции дрозофилы, и эта кассета интегрируется в геном дрозофилы. Скрещивание этой UAS-X линии с линией, экспрессирующий дрожжевой фактор транскрипции Gal4, приводит к экспрессии гена X. Имея большую коллекцию различных Gal4-линий, исследователи могут добиться экспрессии желанного трансгена практически в любой требуемой ткани и на любом желаемом этапе развития. Вот небольшой список таких линий, используемых в исследованиях развития глаза (более полный список см. http://flystocks.bio.indiana. edu/Browse/misc-browse/gal4.htm; http://flybase.org/):

- GMR-Gal4: конструкция содержит пять повторяющихся элементов промотора гена Rh1, взаимодействующих с транскрипционным фактором Glass; вызывает экспрессию в постмитотических клетках глаза [282];
- ey-Gal4: содержит энхансер гена eyeless, экспрессия происходит на ранних стадиях развития глаза до МБ [298];
- sev-Gal4: содержит энхансер гена sevenless, экспрессия наблюдается в дифференцирующихся фоторецепторных клетках, прежде всего R7, а также конусных клетках [299];
- lozenge-Gal4: приводит к экспрессии в клетках «R7-эквивалентной группы»: R7, R1/6 и конусных [300];
 - CG7077-Gal4: экспрессия в пигментных клетках [301];
 - Rh1-Gal4 (ninaE-Gal4): экспрессия в фоторецепторах R1–R6 [302].

Наконец, сочетание технологий Gal4-UAS, высокопроизводительного направленного трансгенеза и PHK-интерференции позволило создать коллекцию линий трансгенных мух, несущих под контролем UAS-энхансера RNAi-конструкции против большей части генов этого организма [303]. Эта коллекция (Vienna Drosophila RNAi Center, VDRC: http://stockcenter.vdrc.at/control/main) представляет собой ресурс колоссальной ценности для исследователей — с момента своего создания VDRC поставил в различные лаборатории мира более шестисот тысяч линий.

XI. ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЛАЗА ДРОЗОФИЛЫ КАК МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА

По данным на 2006 г., от данного заболевания страдало около 20 миллионов человек. Болезнь характеризуется гибелью нейронов в коре головного мозга и субкортикальных областях. В 1991 г. была предложена «амилоидная гипотеза», согласно которой базовой причиной заболевания являются отложения нейротоксического В-амилоидного пептида [304]. Дрозофила представляет значительный интерес в качестве модельного организма для изучения болезни Альцгеймера. Этому способствует большая степень гомологичности и взаимозаменяемости белков человека и дрозофилы. Так, у-секретаза мушек способна правильно протеолитически расщеплять человеческий предшественник β-амилоида (АРР). Для создания полной модели оставалось экспрессировать в дрозофиле (главным образом с использованием линии GMR-Gal4) человеческие APP и β-секретазу, что привело к формированию β-амилоидных бляшек и возрастной нейродегенерации [305]. Эти фенотипы восстанавливались добавлением ингибиторов β-секретазы и у-секретазы в корм, доказывая полезность данной модели как в изучении механизмов патогенеза болезни Альцгеймера, так и в поиске новых средств ее лечения [305].

Существуют и более простые модели болезни Альцгеймера, экспрессирующие непосредственно β-амилоидный пептид. Так, при экспрессии пептида Аβ42 в глазу мушки под контролем GMR-Gal4 наблюдается нарушения строения глаза и нейродегенерация; выраженность фенотипа зависит от уровня экспрессии и возраста [306, 307]. В то время как Аβ42 формирует устойчивые агрегаты в тканях дрозофилы, пептид Аβ40 демонстрирует меньшую стабильность и не вызывает фенотипов [306, 307]. Действенность этих моделей для поиска лекарств показана на примере восстановления Аβ42-фенотипов добавлением в корм ингибитора агрегации β-амилоида конго красного (Congo Red) [307].

БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА

Механизм развития этого заболевания до конца не изучен, но оно характеризуется накоплением агрегатов α -синуклеина и гибелью дофаминовых нейронов в центральной нервной системе человека [308]. Экспрессия человеческого α -синуклеина в нейронах (с помощью elav-Gal4) и глазу (с помощью GMR-Gal4) дрозофилы приводило к

накоплению агрегатов этого белка и усиливающейся с возрастом нейродегенерации [309]. С помощью этой дрозофильной модели болезни Паркинсона впервые удалось продемонстрировать ранее предполагавшуюся связь между фосфорилированием а-синуклеина и его способностью агрегировать и вызывать нейродегенерацию. Действительно, фосфорилирование а-синуклеина по сайту Ser129, наблюдавшееся ранее в тканях мозга больных Паркинсона, коррелировало с его агрегацией в дрозофиле [310]. Более того, нефосфорилируемая мутантная форма а-синуклеина (S129A) не вызывала нейродегенерацию у дрозофилы, тогда как форма S129D, имитирующая постоянное фосфорилирование, обладала повышенной по сравнении с дикой формой а-синуклеина нейротоксичностью [311].

БОЛЕЗНЬ ХАНТИНГТОНА

Это заболевание вызывается умножением кодона САС (кодирующем глутамин) в гене 350-кДа белка huntingtin [312]. Использование GMR-Gal4 для направленной экспрессии N-концевых фрагментов человеческого huntingtin с различным количеством глутаминовых повторов вызывает дегенерацию фоторецепторов, причем возраст, при котором начинается дегенерация, а также ее значительность зависят от длины повторов [313]. Также было показано, что белки dTRP2 (гомолог человеческого TRP2 (tetratricopeptide repeat protein2)) и dHDJ1 (гомолог человеческого HSP40/HDJ1) значительно исправляют фенотип, возможно, благодаря активации АТФазной активности hsp70 [314]. Это предположение подтверждается исследованием с направленной экспрессией hsp70, в результате которой происходило восстановление фенотипа глаза [315]. Большой ряд работ продолжают данное направление изучения белков, генетически взаимодействующих с huntingtin на дрозофильной модели, что проливает свет на механизм развития болезни Хантингтона и дает надежду на последующую разработку лекарств от нее.

ПРОЕКТ HUMANAFLY

Одним из актуальных подходов к изучению онкологических заболеваний является их воспроизведение на модельных организмах, в том числе и на дрозофиле. Сигнальные каскады, контролирующие дифференцировку, пролиферацию клеток и апоптоз сходны у всех многоклеточных животных, а участвующие в них белки гомологичны и зачастую взаимозаменяемы. Из приведных выше примеров со свсей определенностью следует, что нарушение работы сигнальных каскадов в организме человека часто приводит к образованию злокачественных

опухолей. Знания о том, какой ген вызывает эти нарушения, позволят найти пути блокирования его активности, и, следовательно, могут быть использованы для создания лекарств. На этом основан наш проект HumanaFly (Крючков, Аверков, Хаустов, Катанаев, неопубликованные данные). Используя библиотеку плазмид с кДНК, клонированными под контролем UAS-энхансера, приготовленную на основе мРНК из клеток рака молочной железы, мы встраиваем гены человека в геном дрозофилы методом высокопроизводительного направленного трансгенеза. Гиперэкспрессия трансгенов происходит в развивающемся глазу насекомого с использованием линии GMR-Gal4. Из множества полученных трансгенов мы отбираем только те, экспрессия которых приводит к нарушению развития глаза, и операционно называем их потенциальными протоонкогенами или онкосупрессорами. Секвенируя встроенную в геном насекомого последовательность, мы идентифицируем эти гены, а анализ морфологии и гистологии взрослого глаза и глазоантеннального диска дает нам первичное представление о механизмах нарушений развития, вызванных человеческим трансгеном. Последующие генетические эксперименты проверяют механизм патогенеза и позволяют выявить сигнальные каскады и клеточные программы, на которые влияет человеческий трансген в дрозофиле. Эти работы и подтверждение полученных данных на клетках млекопитающих позволят выявить новые протоонкогены и механизмы их влияния на образование злокачественных опухолей. Проект HumanaFly представляет собой первую попыку использования развивающегося глаза дрозофилы для масштабного изучения влияния человеческих белков (потенциально патогенных) на пути внутриклеточной передачи сигнала. Проект еще только выходит на проектную мощность, но нами уже выявлено три потенциальных новых протоонкогена человека, один из которых неожиданным образом влияет на Wnt/Frizzled-сигнальный каскад.

ХІІ. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре рассмотрены пути внутриклеточной передачи сигнала, активные в ходе индивидуального развития животного организма: Notch, Hedgehog, ТСБР, Wnt, PCP и рецептор-тирозинкиназные пути. Как недостаточная работа, так и гиперактивация этих сигнальных путей лежит в основе множества заболеваний человека, прежде всего онкологических. Надежды на появление лекарств против этих болезней связаны с созданием адекватных моделей для изучения сигнальных каскадов, лежащих в их основе. Цель нашего

обзора – представить развивающийся глаз плодовой мушки Drosophila melanogaster как такую модель. Мы попытались подробно описать развитие зрительного органа дрозофилы и сигнальных каскадов, регулирующих различные его этапы, в надежде на применение этой модели молекулярными и медицинскими генетиками, ищущими новые подходы к изучению человеческих болезней. Вышеупомянутые сигнальные пути многократно используются в ходе развития глаза насекомого, и нарушение (подавление либо избыточная активация) любого из них приводит к четким морфологическим последствиям. Высокая степень гомологии и взаимозаменяемость большинства белков-компонентов данных каскадов человека и дрозофилы дают дополнительные аргументы для использования такой модели. Наконец, отточенные генетические и гистологические методы позволяют проводить сложнейшие эксперименты на глазе плодовой мушки, невозможные с другими модельными организмами. Все эти аргументы свидетельствую в пользу активного использования модели развивающегося глаза дрозофилы для изучения механизмов патогенеза и поиска лекарств. И действительно, ряд успешных примеров такого использования в случае нейродегенеративных и раковых заболеваний приведен в нашей статье. Мы надеемся, что последующие исследования разовьют достигнутый успех, и что дрозофила, и после столетнего ее использования для изучения основополагающих законов биологии, будет по-прежнему востребована как объект исследований, теперь еще и медицински ориентированных.

Благодарности.

Мы признательны Михаилу Савицкому и Алексею Ковалю за критическое прочтение манускрипта.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Wolff, T., and Ready, D. F. (1993) Pattern formation in the Drosophila retina. in *The Development, of Drosophila melanogaster* (Bate, M., and Martinez Arias, A. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 1277–1325.
- 2. Kryuchkov, M., Katanaev, V.L., Enin, G.A., Sergeev, A., Timchenko, A.A., and Serdyuk, I.N. (2011) PLoS ONE, 6: e22237.
- 3. Bernhard, C.G., Gemne, G., and Sällström, J. (1970) J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol., 67, 1–25.
- 4. *Miller, W.H., Bernard, G.D., and Allen, J.L.* (1968) Science, **162**, 760–767.
- 5. Palasantzas, G., De Hosson, J.T.M., Michielsen, K.F.L., and Stavenga, D.G. (2005) Optical properties and wettability of nanostructured biomaterials: moth eyes, lotus leaves, and insect wings. in Handbook of nanostructured biomaterials and their applications in nanobiotechnology (Nalwa, H. S. ed.), American Scientific Publishers. pp. 273–301.

- Kirschfeld, K., Feiler, R., and Franceschini, N. (1978) J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol., 125, 275–284.
- 7. Salcedo, E., Huber, A., Henrich, S., Chadwell, L.V., Chou, W.H., Paulsen, R., and Britt, S.G. (1999) J. Neurosci., 19, 10716–10726.
- 8. Papatsenko, D., Sheng, G., and Desplan, C. (1997) Development, **124**, 1665–1673.
- 9. *Tomlinson, A.* (2003) Dev. Cell, **5**, 799–809.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W.J. (1994) Science, 265, 785–789.
- 11. Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W.J. (1995) Science, **267**, 1788–1792.
- 12. *Tomlinson, A., and Struhl, G.* (2001) Mol. Cell, **7**, 487–495.
- 13. *Cayouette, M., and Raff, M.* (2002) Nat. Neurosci., **5**, 1265–1269.
- 14. *Janes, K.A., and Yaffe, M.B.* (2006) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 7, 820–828.
- 15. Kiel, C., Yus, E., and Serrano, L. (2010) Cell, **140**, 33–47.
- 16. *Gerhart, J.* (1999) Teratology, **60**, 226–239.
- 17. *Levitzki, A., and Klein, S.* (2010) Mol. Aspects Med., **31**, 287–329.
- 18. Artavanis-Tsakonas, S., and Muskavitch, M.A. (2010) Curr. Top. Dev. Biol., **92**, 1–29.
- 19. Ehebauer, M., Hayward, P., and Martinez-Arias, A. (2006) Sci. STKE, 2006, cm7.
- 20. Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1985) Cell, 43, 567–581.
- Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991) Cell, 67, 687–699.
- Aster, J.C., Pear, W.S., and Blacklow, S.C. (2008) Annu. Rev. Physiol., 3, 587–613.
- 23. *Stanley, P., and Okajima, T.* (2010) Curr. Top. Dev. Biol., **92**, 131–164.
- 24. Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis—Tsakonas, S. (1997) Cell, **90**, 281–291.

- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., and Israel, A. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8108–8112.
- 26. *Zolkiewska*, *A*. (2008) Cell. Mol. Life Sci., **65**, 2056–2068.
- 27. *Jorissen, E., and De Strooper, B.* (2010) Curr. Top. Dev. Biol., **92**, 201–230.
- 28. Struhl, G., and Adachi, A. (1998) Cell, **93**, 649–660.
- 29. *Bray, S., and Bernard, F.* (2010) Curr. Top. Dev. Biol., **92**, 253–275.
- 30. Krejci, A., Bernard, F., Housden, B. E., Collins, S., and Bray, S.J. (2009) Sci. Signal., 2, ra1.
- 31. Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P. (1996) Development, **122**, 161–171.
- Sprinzak, D., Lakhanpal, A., Lebon, L., Santat, L.A., Fontes, M.E., Anderson, G. A., Garcia-Ojalvo, J., and Elowitz, M.B. (2010) Nature, 465, 86–90.
- 33. Barad, O., Rosin, D., Hornstein, E., and Barkai, N. (2010) Sci. Signal., 3, ra51.
- 34. *Bray, S.* (1998) Semin. Cell Dev. Biol., **9**, 591–597.
- 35. Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., and Sklar, J. (1991) Cell, 66, 649–661.
- 36. Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P.t., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., and Aster, J.C. (2004) Science, 306, 269–271.
- 37. Malecki, M.J., Sanchez-Irizarry, C., Mitchell, J.L., Histen, G., Xu, M.L., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2006) Mol. Cell. Biol., 26, 4642–4651.
- 38. *Tang, S.C., Jeng, J.S., Lee, M.J., and Yip, P.K.* (2009) Acta Neurol. Taiwan, **18**, 81–90.
- 39. Tournier-Lasserve, E., Joutel, A., Melki, J., Weissenbach, J., Lathrop, G.M., Chabriat, H., Mas, J.L., Cabanis, E.A., Baudrimont, M., Maciazek, J., and et al. (1993) Nat. Genet., 3, 256–259.

- 40. Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillion, M., Marechal, E., Maciazek, J., Vayssiere, C., Cruaud, C., Cabanis, E.A., Ruchoux, M.M., Weissenbach, J., Bach, J.F., Bousser, M.G., and Tournier-Lasserve, E. (1996) Nature, 383, 707–710.
- Joutel, A., Vahedi, K., Corpechot, C., Troesch, A., Chabriat, H., Vayssiere, C., Cruaud, C., Maciazek, J., Weissenbach, J., Bousser, M.G., Bach, J.F., and Tournier-Lasserve, E. (1997) Lancet, 350, 1511–1515.
- 42. Harper, J.A., Yuan, J.S., Tan, J.B., Visan, I., and Guidos, C.J. (2003) Clin. Genet., **64**, 461–472.
- Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C., and Tournier-Lasserve, E. (2000) J. Clin. Invest., 105, 597–605.
- 44. Opherk, C., Duering, M., Peters, N., Karpinska, A., Rosner, S., Schneider, E., Bader, B., Giese, A., and Dichgans, M. (2009) Hum. Mol. Genet., 18, 2761–2767.
- Krantz, I.D., Piccoli, D.A., and Spinner, N.B. (1999) Curr. Opin. Pediatr., 11, 558–564.
- Oda, T., Elkahloun, A.G., Pike, B.L., Okajima, K., Krantz, I.D., Genin, A., Piccoli, D.A., Meltzer, P.S., Spinner, N.B., Collins, F.S., and Chandrasekharappa, S.C. (1997) Nat. Genet., 16, 235–242.
- 47. Li, L., Krantz, I.D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A.B., Collins, C.C., Qi, M., Trask, B.J., Kuo, W. L., Cochran, J., Costa, T., Pierpont, M.E., Rand, E.B., Piccoli, D.A., Hood, L., and Spinner, N.B. (1997) Nat. Genet., 16, 243–251.
- 48. McDaniell, R., Warthen, D.M., Sanchez-Lara, P.A., Pai, A., Krantz, I.D., Piccoli, D.A., and Spinner, N.B. (2006) Am. J. Hum. Genet., 79, 169–173.
- 49. Talora, C., Campese, A.F., Bellavia, D., Felli, M.P., Vacca, A., Gulino, A.,

- *and Screpanti, I.* (2008) Biochim. Biophys. Acta, **1782**, 489–497.
- 50. *High, F.A., and Epstein, J.A.* (2008) Nat. Rev. Genet., **9**, 49–61.
- Papayannopoulos, V., Tomlinson, A., Panin, V. M., Rauskolb, C., and Irvine, K. D. (1998) Science, 281, 2031–2034.
- 52. *Dominguez, M., and de Celis, J.F.* (1998) Nature, **396**, 276–278.
- 53. *Cho, K.O., and Choi, K.W.* (1998) Nature, **396**, 272–276.
- Chao, J.L., Tsai, Y.C., Chiu, S.J., and Sun, Y.H. (2004) Development, 131, 3839–3847.
- 55. Frankfort, B.J., and Mardon, G. (2002) Development, **129**, 1295–1306.
- 56. *Baonza*, *A.*, *and Freeman*, *M.* (2001) Development, **128**, 3889–3898.
- 57. *Baker, N.E., and Yu, S.Y.* (1997) Curr. Biol., 7,122–132.
- 58. *Cagan, R.L., and Ready, D.F.* (1989) Genes Dev., **3**, 1099–1112.
- 59. *Sun, Y., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.* (1998) Development, **125**, 3731–3740.
- Van Doren, M., Powell, P.A., Pasternak, D., Singson, A., and Posakony, J.W. (1992) Genes Dev., 6, 2592–2605.
- 61. *Cooper, M.T., and Bray, S.J.* (2000) Curr. Biol., **10**, 1507–1510.
- Miller, A.C., Lyons, E.L., and Herman, T.G. (2009) Curr. Biol., 19, 1378–1383.
- 63. *Rhyu, M.S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.* (1994) Cell, **76**, 477–491.
- 64. Frise, E., Knoblich, J.A., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11925–11932.
- 65. Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003) Dev. Cell, **5**, 139–148.
- 66. *Fichelson, P., and Gho, M.* (2003) Development, **130**, 123–133.
- 67. *Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E.* (1980) Nature, **287**, 795–801.
- Porter, J.A., Ekker, S.C., Park, W.J., von Kessler, D.P., Young, K.E., Chen, C.H., Ma, Y., Woods, A.S., Cotter,

- *R.J., Koonin, E.V., and Beachy, P.A.* (1996) Cell, **86**, 21–34.
- 69. Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A. (1996) Science, **274**, 255–259.
- 70. *Koonin, E.V.* (1995) Trends Biochem. Sci., **20**, 141–142.
- 71. Chamoun, Z., Mann, R.K., Nellen, D., von Kessler, D.P., Bellotto, M., Beachy, P.A., and Basler, K. (2001) Science, 293, 2080–2084.
- 72. Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., and Basler, K. (1999) Cell, **99**, 803–815.
- Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Sun, B.I., and Beachy, P.A. (1994) Science, 266, 1528–1537.
- 74. *Lawrence*, *P.A.* (2001) Nat. Cell Biol., **3**, E151–154.
- 75. Zeng, X., Goetz, J.A., Suber, L.M., Scott, W.J., Jr., Schreiner, C.M., and Robbins, D.J. (2001) Nature, **411**, 716–720.
- 76. *Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., and Eaton, S.* (2005) Nature, **435**, 58–65.
- 77. Katanaev, V.L., Solis, G.P., Hausmann, G., Buestorf, S., Katanayeva, N., Schrock, Y., Stuermer, C.A., and Basler, K. (2008) EMBO J., 27, 509–521.
- 78. Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., and Eaton, S. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 12049–12054.
- 79. *Ingham, P.W., Taylor, A.M., and Naka-no, Y.* (1991) Nature, **353**, 184–187.
- 80. Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M., and Tabin, C.J. (1996) Nature, **384**, 176–179.
- 81. Zheng, X., Mann, R. K., Sever, N., and Beachy, P.A. (2010) Genes Dev., **24**, 57–71.
- 82. Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., and Hooper, J.E. (1996) Cell, **86**, 221–232.
- 83. Taipale, J., Cooper, M.K., Maiti, T., and Beachy, P.A. (2002) Nature, **418**, 892–897.
- Riobo, N. A., Saucy, B., Dilizio, C., and Manning, D.R. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 12607–12612.

- 85. Robbins, D.J., Nybakken, K.E., Ko-bayashi, R., Sisson, J.C., Bishop, J.M., and Therond, P.P. (1997) Cell, **90**, 225–234.
- 86. Sisson, J.C., Ho, K.S., Suyama, K., and Scott, M.P. (1997) Cell, **90**, 235–245.
- Ingham, P.W., Nakano, Y., and Seger, C. (2011) Nat. Rev. Genet., 12, 393–406.
- 88. Jia, J., Zhang, L., Zhang, Q., Tong, C., Wang, B., Hou, F., Amanai, K., and Jiang, J. (2005) Dev. Cell, 9, 819–830.
- 89. *Mullor, J. L., Sanchez, P., and Ruiz i Altaba, A.* (2002) Trends Cell Biol., **12**, 562–569.
- 90. *Bale*, *A.E.* (2002) Annu. Rev. Genom. Hum. Genet., **3**, 47–65.
- 91. Belloni, E., Muenke, M., Roessler, E., Traverso, G., Siegel-Bartelt, J., Frumkin, A., Mitchell, H.F., Donis-Keller, H., Helms, C., Hing, A.V., Heng, H.H., Koop, B., Martindale, D., Rommens, J.M., Tsui, L.C., and Scherer, S.W. (1996) Nat. Genet., 14, 353–356.
- 92. Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S.W., Tsui, L.C., and Muenke, M. (1996) Nat. Genet., **14**, 357–360.
- 93. Ming, J.E., Kaupas, M.E., Roessler, E., Brunner, H.G., Golabi, M., Tekin, M., Stratton, R.F., Sujansky, E., Bale, S.J., and Muenke, M. (2002) Hum. Genet., 110, 297–301.
- 94. Binns, W., James, L.F., Shupe, J.L., and Everett, G. (1963) Am. J. Vet. Res., 24, 1164–1175.
- 95. *Keeler, R.F., and Binns, W.* (1968) Teratology, **1**, 5–10.
- Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., and Beachy, P.A. (2002) Genes Dev., 16, 2743–2748.
- 97. *Epstein, E.H.* (2008) Nat. Rev. Cancer, **8**, 743–754.
- 98. *Xie*, *J.* (2008) Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai), **40**, 670–680.
- Rubin, L.L., and de Sauvage, F.J.
 (2006) Nat. Rev. Drug Discov., 5, 1026–1033.

- 100. Roignant, J.Y., and Treisman, J.E. (2009) Int. J. Dev. Biol., 53, 795–804.
- 101. Heberlein, U., Singh, C.M., Luk, A.Y., and Donohoe, T.J. (1995) Nature, 373, 709-711.
- 102. Heberlein, U., Wolff, T., and Rubin, G.M. (1993) Cell, **75**, 913–926.
- 103. Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P.A. and Moses, K. (1993) Cell, 75, 927-938.
- 104. Dominguez, M., and Hafen, E. (1997) Genes Dev., 11, 3254–3264.
- 105. Ou, C.Y., Lin, Y.F., Chen, Y.J., and Chien, C.T. (2002) Genes Dev., 16, 2403-2414.
- 106. Gray, A.M., and Mason, A.J. (1990) Science, 247, 1328-1330.
- 107. *Massague, J.* (2000) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 1, 169–178.
- 108. Raftery, L.A., and Sutherland, D.J. (1999) Dev. Biol., 210, 251-268.
- 109. Nellen, D., Affolter, M., and Basler,
- K. (1994) Cell, **78**, 225–237. 110. Brummel, T.J., Twombly, V., Marques, G., Wrana, J.L., Newfeld, S.J., Attisano, L., Massague, J., O'Connor, M.B., and Gelbart, W.M. (1994) Cell, 78, 251–261.
- 111. Letsou, A., Arora, K., Wrana, J.L., Simin, K., Twombly, V., Jamal, J., Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F.M., Gelbart, W.M., Massague, J., and et al. (1995) Cell, 80, 899–908.
- 112. Ruberte, E., Marty, T., Nellen, D., Affolter, M., and Basler, K. (1995) Cell, 80, 889–897.
- 113. Sekelsky, J.J., Newfeld, S.J., Raftery, L.A., Chartoff, E.H., and Gelbart, W.M. (1995) Genetics, 139, 1347–1358
- 114. Hudson, J. B., Podos, S.D., Keith, K., Simpson, S.L., and Ferguson, E.L. (1998) Development, 125, 1407-1420.
- 115. Wisotzkey, R.G., Mehra, A., Sutherland, D.J., Dobens, L.L., Liu, X., Dohrmann, C., Attisano, L., and Raftery, L.A. (1998) Development, **125**, 1433–1445.

- 116. Das, P., Maduzia, L.L., Wang, H., Finelli, A.L., Cho, S.H., Smith, M.M., and Padgett, R.W. (1998) Development, 125, 1519-1528.
- 117. Harradine, K.A., and Akhurst, R.J. (2006) Ann. Med., 38, 403-414.
- 118. Lebreiro, A., Martins, E., Cruz, C., Almeida, J., Maciel, M.J., Cardoso, J.C., and Lima, C.A. (2010) Rev. Port. Cardiol., 29, 1021-1036.
- 119. Neptune, E.R., Frischmeyer, P.A., Arking, D.E., Myers, L., Bunton, T.E., Gayraud, B., Ramirez, F., Sakai, L.Y., and Dietz, H.C. (2003) Nat. Genet., 33, 407–411.
- 120. Meulmeester, E., and Ten Dijke, P. (2010) J. Pathol., 223, 205-218.
- 121. Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (1996) Science, **271**, 350–353.
- 122. Sonis, S.T., Van Vugt, A.G., Brien, J.P., Muska, A.D., Bruskin, A.M., Rose, A., and Haley, J.D. (1997) Oral Oncol., 33, 47-54.
- 123. Hannon, G.J., and Beach, D. (1994) Nature, 371, 257-261.
- 124. Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y., and Wang, X.F. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 5545-5549.
- 125. Coffey, R.J., Jr., Bascom, C.C., Sipes, N.J., Graves-Deal, R., Weissman, B.E., and Moses, H.L. (1988) Mol. Cell. Biol., 8, 3088–3093.
- 126. Oberhammer, F.A., Pavelka, M., Sharma, S., Tiefenbacher, R., Purchio, A.F., Bursch, W., and Schulte-Hermann, R. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5408-5412.
- 127. Drabsch, Y., and ten Dijke, P. (2011) J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, **16**, 97–108.
- 128. Parvani, J.G., Taylor, M.A., and Schiemann, W.P. (2011) J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 16, 127-146.
- 129. Tabata, T., and Takei, Y. (2004) Development, 131, 703-712.

- 130. *Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F., and Mann, R.S.* (2002) Genes Dev., **16**, 2415–2427.
- 131. *Greenwood, S., and Struhl, G.* (1999) Development, **126**, 5795–5808.
- 132. *Curtiss, J., and Mlodzik, M.* (2000) Development, **127**, 1325–1336.
- 133. *Logan, C.Y., and Nusse, R.* (2004) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., **20**, 781–810.
- 134. Cabrera, C.V., Alonso, M.C., Johnston, P., Phillips, R.G., and Lawrence, P.A. (1987) Cell, 50, 659–663.
- 135. Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987) Cell, **50**, 649–657.
- 136. Coudreuse, D., and Korswagen, H.C. (2007) Development, 134, 3-12.
- 137. Port, F., and Basler, K. (2010) Traffic, 11, 1265–1271.
- Tanaka, K., Kitagawa, Y., and Kadowaki, T. (2002) J. Biol. Chem., 277, 12816–12823.
- 139. Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., 3rd, and Nusse, R. (2003) Nature, 423, 448–452.
- 140. Kadowaki, T., Wilder, E., Klingensmith, J., Zachary, K., and Perrimon, N. (1996) Genes Dev., 10, 3116–3128.
- 141. van den Heuvel, M., Harryman-Samos, C., Klingensmith, J., Perrimon, N., and Nusse, R. (1993) EMBO J., **12**, 5293–5302.
- 142. Takada, Ř., Šatomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006) Dev. Cell, 11, 791–801.
- 143. Banziger, C., Soldini, D., Schutt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., and Basler, K. (2006) Cell, 125, 509–522.
- 144. *Bartscherer, K., Pelte, N., Ingel-finger, D., and Boutros, M.* (2006) Cell, **125**, 523–533.
- 145. Goodman, R.M., Thombre, S., Firtina, Z., Gray, D., Betts, D., Roebuck, J., Spana, E.P., and Selva,

- E.M. (2006) Development, **133**, 4901–4911.
- 146. Coudreuse, D.Y., Roel, G., Betist, M.C., Destree, O., and Korswagen, H.C. (2006) Science, 312, 921–924.
- 147. Franch-Marro, X., Wendler, F., Guidato, S., Griffith, J., Baena-Lopez, A., Itasaki, N., Maurice, M.M., and Vincent, J.P. (2008) Nat. Cell Biol,. 10, 170–177.
- 148. Port, F., Kuster, M., Herr, P., Furger, E., Banziger, C., Hausmann, G., and Basler, K. (2008) Nat. Cell Biol., 10, 178–185.
- 149. Belenkaya, T.Y., Wu, Y., Tang, X., Zhou, B., Cheng, L., Sharma, Y.V., Yan, D., Selva, E.M., and Lin, X. (2008) Dev. Cell, 14, 120–131.
- Papkoff, J., and Schryver, B. (1990)
 Mol. Cell. Biol., 10, 2723–2730.
- Egger-Adam, D., and Katanaev, V.L. (2008) Front. Biosci., 13, 4740–4755.
- 152. *Katanaev, V.L.* (2010) Biochemistry (Mosc)., **75**, 1428–1434.
- 153. Koval, A., Purvanov, V., Egger-Adam, D., and Katanaev, V.L. (2011) Biochem. Pharmacol., published online, doi:10.1016/j. bcp.2011.06.005.
- 154. Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3, 639–650.
- 155. *Gilman, A. G.* (1987) Annu. Rev. Biochem. **56**, 615–649.
- 156. *Katanaev, V. L., Ponzielli, R., Semeriva, M., and Tomlinson, A.* (2005) Cell, **120**, 111–122.
- 157. *Koval, A., and Katanaev, V. L.* (2011) Biochem. J. **433**, 435–440.
- 158. Gao, C., and Chen, Y.G. (2010) Cell. Signal., 22, 717–727.
- Umbhauer, M., Djiane, A., Goisset,
 C., Penzo-Mendez, A., Riou, J.F.,
 Boucaut, J.C., and Shi, D.L. (2000)
 EMBO J., 19, 4944–4954.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E.
 (2007) Adv. Protein Chem., 74, 67–93.
- Bikkavilli, R.K., Feigin, M.E., and Malbon, C.C. (2008) J. Cell Sci., 121, 234–245.

- 162. Angers, S., Thorpe, C.J., Biechele, T.L., Goldenberg, S.J., Zheng, N., MacCoss, M.J., and Moon, R.T. (2006) Nat. Cell Biol., 8, 348–357.
- 163. Egger-Adam, D., and Katanaev, V.L. (2010) Dev. Dyn., **239**, 168–183.
- 164. Jung, H., Kim, H.J., Lee, S.K., Kim, R., Kopachik, W., Han, J.K., and Jho, E.H. (2009) Exp. Mol. Med., 41, 695–706.
- 165. Wedegaertner, P.B., Wilson, P.T., and Bourne, H.R. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 503–506.
- 166. *Kimelman, D., and Xu, W.* (2006) Oncogene, **25**, 7482–7491.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997) EMBO J., 16, 3797–3804.
- 168. Cortese, M.S., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2008) Prog. Biophys. Mol. Biol., **98**, 85–106.
- 169. Noutsou, M., Duarte, A.M., Anvarian, Z., Didenko, T., Minde, D.P., Kuper, I., de Ridder, I., Oikonomou, C., Friedler, A., Boelens, R., Rudiger, S.G., and Maurice, M.M. (2011) J. Mol. Biol., 405, 773–786.
- 170. Spink, K.E., Polakis, P., and Weis, W.I. (2000) EMBO J., **19**, 2270–2279.
- 171. *Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S., Ikeda, S., Kishida, M., and Kikuchi, A.* (1999) Mol. Cell. Biol., **19**, 4414–4422.
- 172. *Cliffe, A., Hamada, F., and Bienz, M.* (2003) Curr. Biol., **13**, 960–966.
- 173. Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., 3rd, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., and Wu, D. (2001) Mol. Cell, 7, 801–809.
- 174. Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005) Nature, **438**, 867–872.
- 175. Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., and He, X. (2005)
 Nature, **438**, 873–877.
- 176. *Willert, K., and Jones, K.A.* (2006) Genes Dev., **20**, 1394–1404.
- 177. *Seto, E.S., and Bellen, H.J.* (2006) J. Cell Biol., **173**, 95–106.

- 178. *Purvanov, V., Koval, A., and Katanaev, V.L.* (2010) Sci. Signal., **3**, ra65.
- 179. *Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A.* (2004) Nat. Rev. Genet., **5**, 691–701.
- 180. Little, R.D., Carulli, J.P., Del Mastro, R.G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S.P., Swain, P.M., Zhao, S.C., Eustace, B., Lappe, M.M., Spitzer, L., Zweier, S., Braunschweiger, K., Benchekroun, Y., Hu, X., Adair, R., Chee, L., FitzGerald, M.G., Tulig, C., Caruso, A., Tzellas, N., Bawa, A., Franklin, B., McGuire, S., Nogues, X., Gong, G., Allen, K.M., Anisowicz, A., Morales, A.J., Lomedico, P.T., Recker, S.M., Van Eerdewegh, P., Recker, R.R., and Johnson, M.L. (2002) Am. J. Hum. Genet., 70, 11–19.
- 181. Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., and Lifton, R.P. (2002) N. Engl. J. Med., 346, 1513–1521.
- 182. Gong, Y., Slee, R.B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A.M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F.H., Lev, D., Żacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W.N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J.A., Beighton, P., Black, G.C., Boles, R.G., Boon, L.M., Borrone, C., Brunner, H.G., Carle, G.F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M.L., Hall, B., Hennekam, R.C., Hirose, T., Jans, A., Juppner, H., Kim, C.A., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R.S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M. J., Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B.

- *R., and Warman, M.L.* (2001) Cell, **107**, 513–523.
- 183. Robitaille, J., MacDonald, M.L., Kaykas, A., Sheldahl, L.C., Zeisler, J., Dube, M.P., Zhang, L.H., Singaraja, R.R., Guernsey, D.L., Zheng, B., Siebert, L.F., Hoskin-Mott, A., Trese, M.T., Pimstone, S.N., Shastry, B.S., Moon, R.T., Hayden, M.R., Goldberg, Y.P., and Samuels, M.E. (2002) Nat. Genet., 32, 326–330.
- 184. *Kaykas, A., Yang-Snyder, J., Heroux, M., Shah, K.V., Bouvier, M., and Moon, R.T.* (2004) Nat. Cell Biol., **6**, 52–58.
- 185. *Polakis*, *P.* (2007) Curr. Opin. Genet. Dev., **17**, 45–51.
- 186. Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G., and Kolar, Z. (2006) Pathobiology, **73**, 213–223.
- 187. *Giles, R.H., van Es, J.H., and Clevers, H.* (2003) Biochim. Biophys. Acta, **1653**, 1–24.
- 188. Zhao, J., Kim, K.A., and Abo, A. (2009) Trends Biotechnol., 27, 131–136.
- 189. Minear, S., Leucht, P., Jiang, J., Liu, B., Zeng, A., Fuerer, C., Nusse, R., and Helms, J.A. (2010) Sci. Transl. Med., 2, 29ra30.
- 190. van de Schans, V.A., Smits, J.F., and Blankesteijn, W.M. (2008) Eur. J. Pharmacol., **585**, 338–345.
- 191. *Budnik, V., and Salinas, P.C.* (2011) Curr. Opin. Neurobiol., **21**, 151–159.
- 192. De Ferrari, G.V., and Moon, R.T. (2006) Oncogene, **25**, 7545–7553.
- 193. Magdesian, M.H., Carvalho, M.M., Mendes, F.A., Saraiva, L.M., Juliano, M.A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J., and Ferreira, S.T. (2008) J. Biol. Chem., **283**, 9359–9368.
- 194. Alvarez, A.R., Godoy, J.A., Mullendorff, K., Olivares, G.H., Bronfman, M., and Inestrosa, N.C. (2004) Exp. Cell Res., 297, 186–196.
- 195. Cerpa, W., Toledo, E.M., Varela-Nallar, L., and Inestrosa, N.C. (2009) Drug News Perspect., 22, 579–591.

- 196. Angers, S., and Moon, R.T. (2009) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 10, 468–477.
- 197. Barker, N., and Clevers, H. (2006) Nat. Rev. Drug Discov., **5**, 997–1014.
- 198. Legent, K., and Treisman, J.E. (2008) Methods Mol. Biol., **469**, 141–161.
- 199. Cho, K.O., Chern, J., Izaddoost, S., and Choi, K.W. (2000) Cell, **103**, 331–342.
- 200. *Heberlein, U., Borod, E.R., and Chanut, F.A.* (1998) Development, **125**, 567–577.
- 201. *Royet, J., and Finkelstein, R.* (1997) Development, **124**, 4793–4800.
- 202. *Baker, N.E.* (1988) Development, **102**, 489–497.
- 203. *Royet, J., and Finkelstein, R.* (1996) Development, **122**, 1849–1858.
- 204. *Baonza, A., and Freeman, M.* (2002) Development, **129**, 5313–5322.
- 205. Treier, M., Bohmann, D., and Mlodzik, M. (1995) Cell, **83**, 753–760.
- 206. *Treisman, J.E., and Rubin, G.M.* (1995) Development, **121**, 3519–3527.
- 207. *Fortini, M.E., and Rubin, G.M.* (1991) Cell Tissue Res., **265**, 185–191.
- 208. Wernet, M.F., Labhart, T., Baumann, F., Mazzoni, E.O., Pichaud, F., and Desplan, C. (2003) Cell, 115, 267–279.
- 209. *Lin, H.V., Rogulja, A., and Cadigan, K.M.* (2004) Development, **131**, 2409–2418.
- 210. Cordero, J., Jassim, O., Bao, S., and Cagan, R. (2004) Mech. Dev., **121**, 1523–1530.
- 211. *Lim, H.Y., and Tomlinson, A.* (2006) Development, **133**, 3529–3537.
- 212. Brunner, E., Brunner, D., Fu, W., Hafen, E., and Basler, K. (1999) Dev. Biol., 206, 178–188.
- 213. *Tomlinson, A., Strapps, W.R., and Heemskerk, J.* (1997) Development, **124**, 4515–4521.
- 214. *Wehrli, M., and Tomlinson, A.* (1998) Development, **125**, 1421–1432.
- 215. *Tomlinson, A., and Struhl, G.* (1999) Development, **126**, 5725–5738.

- 216. Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003) Dev. Cell, 5, 367–377.
- 217. *Simons, M., and Mlodzik, M.* (2008) Annu. Rev. Genet., **42**, 517–540.
- 218. *Katanaev, V.L., and Tomlinson, A.* (2006) Cell Cycle, **5**, 2464–2472.
- 219. *Katanaev, V.L.* (2001) Biochemistry (Mosc.), **66**, 351–368.
- 220. Vinson, C.R., Conover, S., and Adler, P.N. (1989) Nature, **338**, 263–264.
- 221. Moon, R.T., Campbell, R.M., Christian, J.L., McGrew, L.L., Shih, J., and Fraser, S. (1993) Development, 119, 97–111.
- 222. Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., and Wilson, S.W. (2000) Nature, 405, 76–81.
- Struhl, G., Barbash, D.A., and Lawrence, P.A. (1997) Development, 124, 2155–2165.
- 224. Lawrence, P.A., Casal, J., and Struhl, G. (2002) Development, **129**, 2749–2760.
- 225. *Yang, C.H., Axelrod, J.D., and Simon, M.A.* (2002) Cell, **108**, 675–688.
- 226. Ma, D., Yang, C.H., McNeill, H., Simon, M.A., and Axelrod, J.D. (2003) Nature, 421, 543–547.
- 227. Casal, J., Lawrence, P.A., and Struhl, G. (2006) Development, **133**, 4561–4572.
- 228. Strutt, D.I. (2001) Mol. Cell, 7, 367–375.
- 229. Le Garrec, J.F., Lopez, P., and Kerszberg, M. (2006) Dev. Dyn., 235, 235–246.
- 230. *Krasnow, R.E., Wong, L.L., and Adler, P.N.* (1995) Development, **121**, 4095–4102.
- Gubb, D., and Garcia-Bellido, A. (1982) J. Embryol. Exp. Morphol., 68, 37–57.
- 232. *Wolff, T., and Rubin, G.M.* (1998) Development, **125**, 1149–1159.
- Taylor, J., Abramova, N., Charlton, J., and Adler, P. N. (1998) Genetics, 150, 199–210.

- 234. Feiguin, F., Hannus, M., Mlodzik, M., and Eaton, S. (2001) Dev. Cell, 1, 93–101.
- 235. Lu, B., Usui, T., Uemura, T., Jan, L., and Jan, Y.N. (1999) Curr. Biol., 9, 1247–1250.
- 236. Shimada, Y., Yonemura, S., Ohkura, H., Strutt, D., and Uemura, T. (2006) Dev. Cell, 10, 209–222.
- 237. *Nielsen, E., Severin, F., Backer, J.M., Hyman, A.A., and Zerial, M.* (1999) Nat. Cell Biol., **1**, 376–382.
- 238. Winter, C.G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A., Karess, R., Axelrod, J.D., and Luo, L. (2001) Cell, **105**, 81–91.
- 239. Copp, A.J., and Greene, N.D. (2010) J. Pathol., **220**, 217–230.
- 240. Kibar, Z., Torban, E., McDearmid, J.R., Reynolds, A., Berghout, J., Mathieu, M., Kirillova, I., De Marco, P., Merello, E., Hayes, J.M., Wallingford, J.B., Drapeau, P., Capra, V., and Gros, P. (2007) N. Engl. J. Med., 356, 1432–1437.
- 241. *Wang*, Y. (2009) Mol. Cancer Ther., **8**, 2103–2109.
- 242. Weeraratna, A.T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M., and Trent, J.M. (2002) Cancer Cell, 1, 279–288.
- 243. Kurayoshi, M., Oue, N., Yamamoto, H., Kishida, M., Inoue, A., Asahara, T., Yasui, W., and Kikuchi, A. (2006) Cancer Res., 66, 10439–10448.
- 244. Axelrod, J.D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Perrimon, N. (1996) Science, **271**, 1826–1832.
- 245. Munoz-Descalzo, S., Sanders, P.G., Montagne, C., Johnson, R.I., Balayo, T., and Arias, A.M. (2010) Fly (Austin), 4, 182–193.
- 246. Strutt, D., Johnson, R., Cooper, K., and Bray, S. (2002) Curr. Biol., 12, 813–824.
- 247. Das, G., Reynolds-Kenneally, J., and Mlodzik, M. (2002) Dev. Cell, **2**, 655–666.
- 248. *Fanto, M., and Mlodzik, M.* (1999) Nature, **397**, 523–526.
- 249. *Cooper, M.T., and Bray, S.J.* (1999) Nature, **397**, 526–530.

- 250. Robinson, D.R., Wu, Y.M., and Lin, S.F. (2000) Oncogene, 19, 5548–5557.
- 251. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J., and et al. (1984) Nature, 309, 418–425.
- Hafen, E., Basler, K., Edstroem, J.E., and Rubin, G.M. (1987) Science, 236, 55–63.
- 253. *Benzer, S.* (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **58**, 1112–1119.
- 254. *Harris, W., A., Stark, W.S., and Walker, J.A.* (1976) J. Physiol., **256**, 415–439.
- 255. Tomlinson, A., and Ready, D.F. (1986) Science, **231**, 400–402.
- 256. *Reinke, R., and Zipursky, S.L.* (1988) Cell, **55**, 321–330.
- 257. Basler, K., and Hafen, E. (1988) Cell, **54**, 299–311.
- Simon, M.A., Bowtell, D.D., and Rubin, G.M. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8333–8337.
- 259. Rogge, R.D., Karlovich, C.A., and Banerjee, U. (1991) Cell, **64**, 39–48.
- 260. Simon, M.A., Bowtell, D.D., Dodson, G.S., Laverty, T.R., and Rubin, G.M. (1991) Cell, **67**, 701–716.
- 261. Bonfini, L., Karlovich, C.A., Dasgupta, C., and Banerjee, U. (1992) Science, **255**, 603–606.
- 262. Fortini, M.E., Simon, M.A., and Rubin, G.M. (1992) Nature, **355**, 559–561.
- 263. Simon, M.A., Dodson, G.S., and Rubin, G.M. (1993) Cell, **73**, 169–177.
- 264. Olivier, J.P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993) Cell, 73, 179–191.
- Gaul, U., Mardon, G., and Rubin, G.M. (1992) Cell, 68, 1007–1019.
- Dickson, B., Sprenger, F., Morrison,
 D., and Hafen, E. (1992) Nature,
 360, 600–603.
- Lu, X., Melnick, M.B., Hsu, J.C., and Perrimon, N. (1994) EMBO J., 13, 2592–2599.

- Brunner, D., Oellers, N., Szabad, J., Biggs, W.H., 3rd, Zipursky, S.L., and Hafen, E. (1994) Cell, 76, 875–888.
- 269. Bohmann, D., Ellis, M.C., Staszewski, L.M., and Mlodzik, M. (1994) Cell, **78**, 973–986.
- 270. Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H., and Klambt, C. (1994) Nature, **370**, 386–389.
- 271. *Kauffmann, R.C., Li, S., Gallagher, P.A., Zhang, J., and Carthew, R.W.* (1996) Genes Dev., **10**, 2167–2178.
- 272. *Raabe, T.* (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1496**, 151–163.
- 273. *Blume-Jensen, P., and Hunter, T.* (2001) Nature, **411**, 355–365.
- Gschwind, A., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2004) Nat. Rev. Cancer, 4, 361–370.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987) Science, 235, 177–182.
- 276. Humphrey, P.A., Wong, A.J., Vogelstein, B., Zalutsky, M.R., Fuller, G.N., Archer, G.E., Friedman, H.S., Kwatra, M.M., Bigner, S.H., and Bigner, D.D. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4207–4211.
- 277. *Noble, M.E., Endicott, J.A., and Johnson, L.N.* (2004) Science, **303**, 1800–1805.
- 278. Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., and Matter, A. (2002) Nat. Rev. Drug Discov., 1, 493–502.
- 279. *Reck, M., and Gatzemeier, U.* (2005) Respir. Med., **99**, 298–307.
- 280. Bukowski, R.M., Yasothan, U., and Kirkpatrick, P. (2010) Nat. Rev. Drug Discov., 9, 17–18.
- 281. Moy, B., Kirkpatrick, P., Kar, S., and Goss, P. (2007) Nat. Rev. Drug Discov., **6**, 431–432.
- 282. Freeman, M. (1996) Cell, 87, 651–660.
- Dominguez, M., Wasserman, J.D., and Freeman, M. (1998) Curr. Biol., 8, 1039–1048.

- 284. Schweitzer, R., Howes, R., Smith, R., Shilo, B.Z., and Freeman, M. (1995) Nature, **376**, 699–702.
- 285. *Golembo, M., Schweitzer, R., Freeman, M., and Shilo, B.Z.* (1996) Development, **122**, 223–230.
- 286. Freeman, M. (1994) Mech. Dev., 48, 25–33.
- 287. *Miller, D.T., and Cagan, R.L.* (1998) Development, **125**, 2327–2335.
- 288. *Golic, K.G., and Lindquist, S.* (1989) Cell, **59**, 499–509.
- 289. *Xu, T., and Rubin, G.M.* (1993) Development, **117**, 1223–1237.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., and DiNardo, S. (2000) Nature, 407, 527–530.
- Newsome, T.P., Asling, B., and Dickson, B.J. (2000) Development, 127, 851–860.
- 292. *Rubin, G. M., and Spradling, A. C.* (1982) Science **218**, 348–353.
- 293. *Groth, A.C., Fish, M., Nusse, R., and Calos, M.P.* (2004) Genetics, **166**, 1775–1782.
- 294. Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 3312–3317.
- Oberstein, A., Pare, A., Kaplan, L., and Small, S. (2005) Nat. Methods, 2, 583–585.
- 296. Horn, C., and Handler, A.M. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 12483–12488.
- 297. *Brand*, *A.H.*, *and Perrimon*, *N.* (1993) Development, **118**, 401–415.
- 298. Bonini, N.M., Bui, Q.T., Gray-Board, G.L., and Warrick, J. M. (1997) Development, **124**, 4819-4826.
- Basler, K., Yen, D., Tomlinson, A., and Hafen, E. (1990) Genes Dev., 4, 728–739.
- 300. *Crew, J.R., Batterham, P., and Pollock, J.A.* (1997) Dev. Genes Evol., **206**, 481–493.
- 301. *Wang, T., Jiao, Y., and Montell, C.* (2007) J. Cell Biol., **177**, 305–316.

- 302. Yoshihara, Y., Mizuno, T., Nakahira, M., Kawasaki, M., Watanabe, Y., Kagamiyama, H., Jishage, K.I., Ueda, O., Suzuki, H., Tabuchi, K., Sawamoto, K., Okano, H., Noda, T., and Mori, K. (1999) Neuron, 22, 33–41.
- 303. Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., and Dickson, B.J. (2007) Nature, 448, 151–156.
- 304. Roberson, E.D., and Mucke, L. (2006) Science, **314**, 781–784.
- 305. Greeve, I., Kretzschmar, D., Tschape, J.A., Beyn, A., Brellinger, C., Schweizer, M., Nitsch, R.M., and Reifegerste, R. (2004) J. Neurosci., 24, 3899–3906.
- Finelli, A., Kelkar, A., Song, H.J.,
 Yang, H., and Konsolaki, M. (2004)
 Mol. Cell. Neurosci., 26, 365–375.
- 307. Crowther, D.C., Kinghorn, K.J., Miranda, E., Page, R., Curry, J.A., Duthie, F.A., Gubb, D.C., and Lomas, D.A. (2005) Neuroscience, 132, 123–135.
- 308. *Dawson, T.M., and Dawson, V.L.* (2003) Science, **302**, 819–822.
- 309. Feany, M.B., and Bender, W.W. (2000) Nature, **404**, 394–398.
- 310. Takahashi, M., Kanuka, H., Fujiwara, H., Koyama, A., Hasegawa, M., Miura, M., and Iwatsubo, T. (2003) Neurosci. Lett., **336**, 155–158.
- 311. *Chen, L., and Feany, M.B.* (2005) Nat. Neurosci., **8**, 657–663.
- 312. *Bates, G.P.* (2005) Nat. Rev. Genet., **6**, 766–773.
- 313. Jackson, G.R., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P.W., MacDonald, M.E., and Zipursky, S.L. (1998) Neuron, 21, 633–642.
- 314. *Kazemi-Esfarjani*, *P.*, and *Benzer*, *S*. (2000) Science, **287**, 1837–1840.
- 315. *Warrick, J.M., Chan, H.Y., Gray-Board, G.L., Chai, Y., Paulson, H.L., and Bonini, N.M.* (1999) Nat. Genet., **23**, 425–428.