

НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В ЯЙЦЕВЫХ КАМЕРАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* У МУТАНТОВ ПО ГЕНУ *TRITHORAX-LIKE*

А.А. Огиенко, О.В. Лаухина, Г.В. Васильев, Э.М. Баричева

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия; e-mail: barich@bionet.nsc.ru

Проведено исследование влияния мутаций по гену *Trithorax-like (Trl)* *Drosophila melanogaster* на функционирование фолликулярных клеток во время развития яйцевой камеры. У *Trl*-мутантов в яйцевых камерах начиная с 9 стадии развития наблюдаются нарушения миграции фолликулярных клеток – бордюрных и центрипетальных. Выявлены также нарушения в формировании дорзальных выростов хориона, что свидетельствует о нарушении процесса миграции клеток, дающих начало этим структурам.

Введение

Ген *Trithorax-like (Trl)* *Drosophila melanogaster* кодирует многофункциональный белок GAGA, который участвует во многих клеточных процессах. Ранее было показано, что слабые гипоморфные мутации (*Trl^{en82}*, *Trl^{362(ex)}*), незначительно снижающие экспрессию данного гена в яичниках, приводят к снижению фертильности самок, тогда как мутации, вызывающие сильное уменьшение или нарушение экспрессии гена *Trl* (*Trl³⁶²*, *Trl^{13C}*), приводят к полной стерильности самок. Ранее нами было показано, что значительное уменьшение количества белка GAGA приводит к серьезным нарушениям в функционировании клеток яйцевых камер, имеющих происхождение из стволовых половых клеток. Если в норме яйцевая камера дрозофилы содержит 1 ооцит и 15 питающих клеток, то у мутантов *Trl* были обнаружены нарушения как в количестве ооцитов, так и в числе питающих клеток (Огиенко и др., 2006). Кроме того, в питающих клетках *Trl* мутантов были обнаружены нарушения в формировании актинового цитоскелета. В частности, у них было обнаружено нарушение в формировании цитоплазматических актиновых филаментов, которые удерживают большие полиплоидные ядра в центре питающих клеток, не позволяя им смещаться во время фазы быстрого транспорта

и физически забивать кольцевые каналы, блокируя транспорт питающих веществ в ооцит (Огиенко и др., 2006, 2008). В данной работе представлены результаты, свидетельствующие о влиянии белка GAGA на функционирование соматических клеток в ходе развития яйцевых камер дрозофилы.

В норме яйцевая камера дрозофилы, находящаяся на 6–7-й стадии развития, окружена со всех сторон фолликулярными клетками (ФК), число которых, по оценкам разных авторов, колеблется от 650 до 1000. Окружение цисты фолликулярными клетками происходит еще в гермарию на границе 2А и 2В районов, где располагаются две стволовые клетки-предшественницы фолликулярных клеток (Margolis, Spradling, 1995). Стадии развития яйцевых камер даны в соответствии с классификацией Р. Кинга (King, 1970). До 6-й стадии развития яйцевой камеры эпителиальные ФК достаточно однородны по размеру и форме, однако впоследствии они претерпевают значительные морфологические изменения в зависимости от их дальнейшей судьбы. Во время 7–8-й стадии большинство ФК начинают мигрировать назад, в сторону растущего ооцита, приобретая при этом цилиндрическую форму (Spradling, 1993; Horne-Badovinac, Bilder, 2005). В течение 9-й стадии развития яйцевой камеры 6–8 ФК (2 полярные и прилежащие к ним ФК) отсо-

единяются от клеток однослойного эпителия в передней части камеры и начинают мигрировать между питающими клетками по направлению к ооциту. Эти клетки получили название бордюрных клеток (Montell *et al.*, 1992). К началу 10-й стадии большинство эпителиальных ФК имеют цилиндрическую форму и покрывают ооцит, занимающий половину яйцевой камеры, тогда как только 50 ФК остаются на питающих клетках, они уплощаются и формируют тонкий однослойный эпителий. К началу 10-й стадии заканчивается миграция бордюрных клеток, в это время они достигают переднего края ооцита. В дальнейшем эти клетки участвуют в формировании микропиле, которое необходимо для прохождения спермы (Montell *et al.*, 1992; Montell, 2003). На 10В стадии клетки цилиндрического эпителия, расположенные на границе между ооцитом и питающими клетками (центрипетальные клетки), уплощаются и начинают мигрировать между питающими клетками и ооцитом. Миграция центрипетальных клеток заканчивается, когда они достигают бордюрных клеток, в результате передняя часть ооцита полностью покрывается фолликулярным эпителием (Horne-Badovinac, Bilder, 2005). Две группы ФК (каждая содержит примерно 150 клеток), расположенные на переднем конце ооцита, координированно мигрируют на стадии 10В, давая начало дорзальным выростам хориона (Spradling, 1993). На 13-й стадии клетки, формирующие дорзальные выросты хориона, прекращают свое движение, но при этом продолжают секрецию белков хориона, что приводит к утолщению выростов (Berg, 2005). Дорзальные выросты хориона удерживают эмбрион на поверхности корма, тем самым обеспечивая его дыхание (Spradling, 1993). К концу развития яйцевой камеры ФК подвергаются апоптозу (Chao, Nagoshi, 1999).

В данной работе приведены данные, свидетельствующие о том, что даже незначительное снижение экспрессии гена *Trl* в яичниках ведет к серьезным нарушениям в функционировании соматических клеток на последних стадиях развития яйцевых камер дрозофилы. У *Trl*-мутантов наблюдается нарушение в функционировании разных типов соматических клеток: центрипетальных, бордюрных и клеток, дающих начало дорзальным выростам хориона. Нарушение в

движении этих типов клеток вызывает серьезные нарушения в формировании яйцевых камер дрозофил и как следствие приводит к снижению фертильности *Trl*-мутантов.

Материалы и методы

Линии *D. melanogaster*, используемые в работе. Мутация *Trl³⁶²* получена в лаборатории эволюционной биологии клетки ЦЦИГ СО РАН (Огиенко и др., 2006); мутация *Trl^{en82}* получена в лаборатории молекулярной биологии (Институт фундаментальных исследований, г. Бомбей, Индия) (Огиенко и др., 2008); мутация *Trl^{362(ex)}* получена в лаборатории путем точной эксцизии *P*-элемента в линии, несущей мутацию *Trl³⁶²* (Огиенко, 2007), линия *Trl^{R85}* (Df(3L)TrlR85/TM3, Sb1 Ser у+) – нуль-аллель гена, любезно предоставлена Ф. Каршем (Женевский Университет, Швейцария) (Farkas *et al.*, 1994), Oregon R – дикий тип, из фонда лаборатории эволюционной биологии клетки.

Окрашивание с помощью DAPI. Окрашивание DAPI проводили в растворе 50 %-го глицерина, разведенного в 1×PBS и содержащего DAPI в концентрации 1 мкг/мл.

Детекция β-галактозидазы в яичниках дрозофилы. Яичники 2–3-дневных самок дрозофилы извлекали в растворе Эфрусси-Бидла (128 мМ NaCl, 3,2 мМ CaCl₂, 2,7 мМ KCl) и фиксировали 20 минут при комнатной температуре в растворе 0,75 %-го глутаральдегида (Fluka), приготовленном на 0,1 М Na-кокадилатном буфере. Двухкратную отмывку проводили в растворе 1×PBS [pH 7,4] (1,7 мМ KH₂PO₄, 5,2 мМ Na₂HPO₄, 150 мМ NaCl) и окрашивали в течение 2–16 часов в красящем растворе (10 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7,2), 3,1 мМ K₄[Fe(CN)₆], 3,1 мМ K₃[Fe(CN)₆], 150 мМ NaCl, 1,0 мМ MgCl₂, 0,2 % X-Gal, 0,3 % Trithon X-100). Для остановки реакции окрашивания органы промыли водой и переносили в 30 %-й глицерин.

Окрашивание яичников дрозофилы с помощью фаллоидина. Для окрашивания яйцевых камер яичники 2–3-дневных самок изолировали в растворе PBS (1,7 мМ KH₂PO₄, 5,2 мМ NaH₂PO₄, 150 мМ NaCl). Фиксацию и окрашивание яйцевых камер фаллоидином

проводили по Гуилду с соавторами (Guild *et al.*, 1997). В работе использовали Alexa 488-конъюгированный фаллоидин (Molecular Probes, США).

Микроскопический анализ. Микроскопический анализ проводился в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН на микроскопе Axioscope 2 plus (Zeiss).

Результаты и обсуждение

В настоящей работе проведен анализ функционирования фолликулярных клеток в яйцевых камерах дрозофил, несущих мутации по гену *Trithorax-like (Trl)* – *Trl^{β62}*, *Trl^{β62(ex)}* и *Trl^{en82}*. Эти гипоморфные мутации связаны с изменением 5'-области гена *Trl*, что отражается на характере экспрессии данного гена и как следствие на репродуктивных функциях мутантов (Огиенко и

др., 2006, 2008). Ранее нами было показано, что у *Trl*-мутантов наблюдаются нарушения в структуре и функционировании клеток, происходящих из стволовых половых клеток. Мы показали, что мутации по гену *Trl* вызывают также нарушения в функционировании соматических клеток в яйцевых камерах мутантов.

Во-первых, у *Trl*-мутантов обнаружены нарушения в миграции бордюрных клеток. В норме (рис. 1, б) к 10-й стадии бордюрные клетки достигают переднего края ооцита и в дальнейшем продолжают свое движение дорзально уже по его поверхности (Montell *et al.*, 1992; Montell, 2003). В большинстве яйцевых камер *Trl*-мутантов бордюрные клетки не успевают к 10-й стадии достичь ооцита, а задерживаются в передней части камеры, между питающими клетками (рис. 1, в–ж).

Во-вторых, у *Trl* мутантов нарушено движение центрипетальных клеток. В норме (рис. 2, а, г, ж)

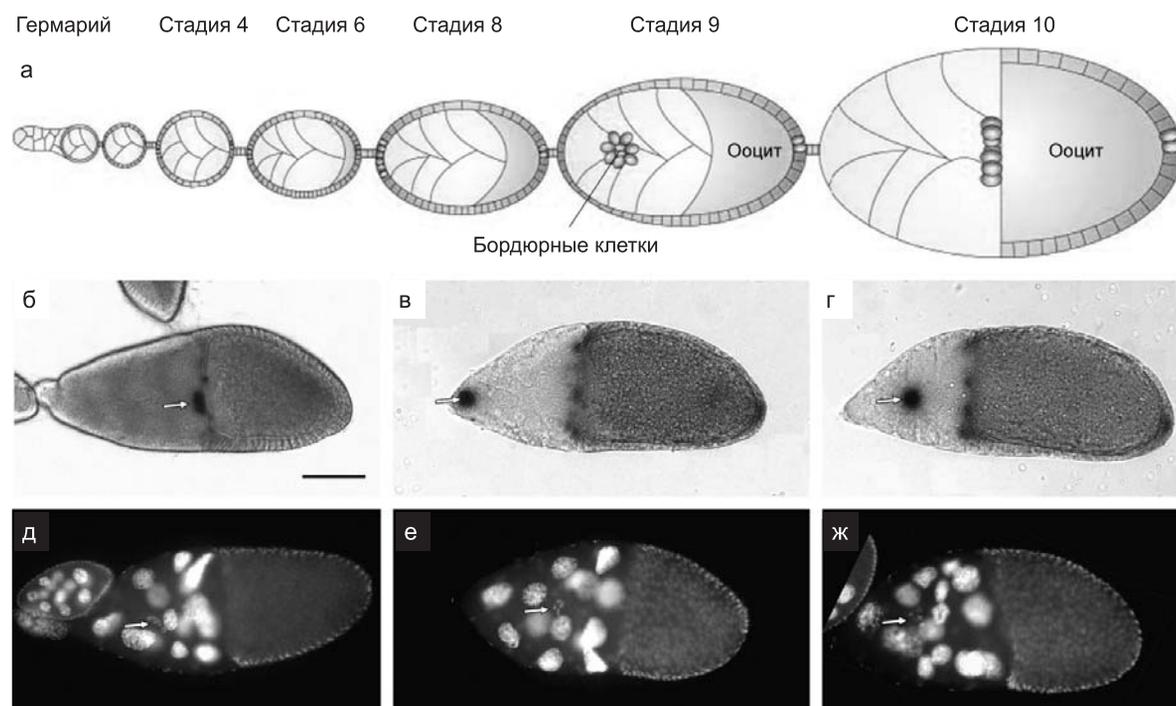


Рис. 1. Нарушение миграции бордюрных клеток у *Trl*-мутантов на поздних стадиях развития яйцевой камеры.

а – схематическое изображение овариолы. Показана миграция бордюрных клеток в норме (с модификациями, из: Montell, 2003); б – яйцевая камера 10-й стадии (норма). Бордюрные клетки лежат на поверхности ооцита (стрелка); в, г – яйцевые камеры *Trl^{β62(ex)}* мутантов на 11-й стадии развития; д, е – яйцевая камера *Trl^{β62}*-мутанта на 10-й стадии; ж – яйцевая камера *Trl^{en82}*-мутанта на 10-й стадии. Миграция бордюрных клеток нарушена, они не достигли поверхности ооцита и располагаются между питающими клетками (стрелки); б–г – яйцевые камеры, окрашенные с помощью X-Gal; д–ж – яйцевые камеры, окрашенные с помощью DAPI. Стрелками указаны бордюрные клетки. Масштаб 100 мкм.

на 10В стадии клетки цилиндрического эпителия, расположенные на границе между ооцитом и питающими клетками (центрипетальные клетки), уплощаются и начинают мигрировать внутрь яйцевой камеры, продвигаясь между питающими клетками и ооцитом. Миграция центрипетальных клеток заканчивается, когда они достигают бордюрных клеток, в результате передняя часть ооцита также полностью покрывается фолликулярным эпителием (Horne-Badovinac, Bilder, 2005). У всех анализируемых *Trl*-мутантов было обнаружено нарушение в движении центрипетальных клеток (рис. 2). Результатом этого является то, что фолликулярные клетки на последних стадиях развития яйцевой камеры располагаются зачастую только на заднем конце камеры, не покрывая передней поверхности ооцита (рис. 2, д, е, з, и), а ооцит

внедряется в область, занимаемую питающими клетками (рис. 2, б, д). В результате во многих яйцевых камерах мутантов наблюдаются ооциты неправильной формы (рис. 2, б, в, д, е).

В-третьих, у *Trl*-мутантов нарушено формирование дорзальных выростов хориона. У мутантов (рис. 3, б, в) они неправильной формы и значительно короче, чем в норме (рис. 3, а).

Следует отметить, что характерной особенностью *Trl*-мутантов является наличие яйцевых камер с нарушенным числом питающих клеток, расположенных последовательно друг за другом в овариоле, причем сумма питающих клеток в двух последовательно расположенных яйцевых камерах с нарушенным числом трофоцитов равна или кратна 15 (рис. 4). Нами было установлено, что ооциты во всех яйцевых камерах с нарушениями числа питающих клеток обладают

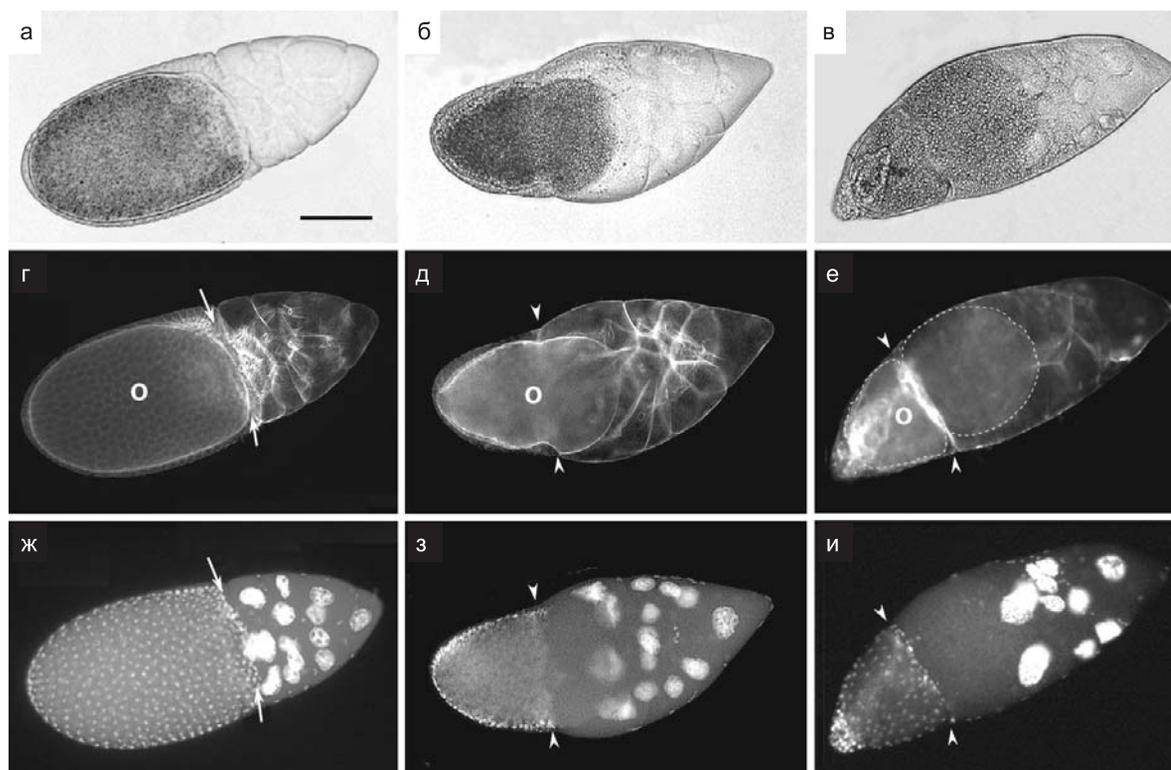


Рис. 2. Нарушение миграции фолликулярных клеток у мутантов *Trl^{en82}* и *Trl^{362(ex)}* на поздних стадиях развития яйцевой камеры.

а, г, ж – яйцевая камера дикого типа на стадии 10В; б, д, з – яйцевая камера мутанта *Trl^{en82/Trl^{R85}}*; в, е, и – яйцевая камера мутанта *Trl^{362(ex)/Trl^{R85}}*; г, д, е – яйцевые камеры, окрашенные Alexa-конъюгированным фаллоидином (О – ооцит); г – в норме центрипетальные клетки (указаны стрелками) глубоко проникают внутрь камеры между ооцитом и питающими клетками; д, е – у мутантов нарушена миграция центрипетальных клеток; е – ооцит (выделен пунктиром) внедряется в область питающих клеток; ж, з, и – яйцевые камеры, окрашенные DAPI; з, и – фолликулярные клетки не покрывают поверхности всего ооцита. Треугольниками указана граница, где кончается миграция фолликулярных клеток. Масштаб 100 мкм.

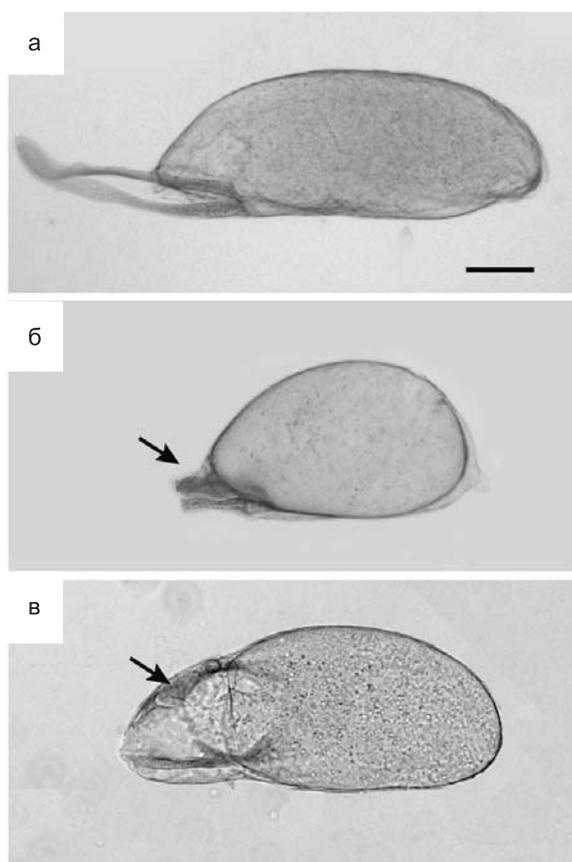


Рис. 3. Морфология яиц самок дикого типа и *Trl*-мутантов.

а – яйцо самки дикого типа; б – яйцо самки *Trl^{en82/Trl^{R85}}*; в – яйцо самки *Trl^{362(ex)/Trl^{R85}}*. Размер яйца у *Trl*-мутантов сильно уменьшен, укорочены дорзальные выросты хориона (указаны стрелкой). Масштаб 100 мкм.

четырьмя кольцевыми каналцами (Огиенко и др., 2006). Следовательно, стволовая половая клетка, дающая начало ооциту и трофоцитам, проходит, как и положено, четыре цикла деления. Таким образом, изменение в числе питающих клеток у *Trl*-мутантов может быть объяснено не изменением в числе делений, претерпеваемых стволовой половой клеткой, а, скорее, нарушением процесса обволакивания цисты фолликулярными клетками на ранних стадиях оогенеза, т. е. в гермарию. Таким образом, у *Trl*-мутантов нарушено функционирование соматических клеток не только в яйцевых камерах, находящихся на поздних стадиях развития, но, по-видимому, и в камерах на ранних стадиях оогенеза.

Мы полагаем, что наиболее вероятной причиной вышеперечисленных дефектов в функ-

ционировании соматических клеток яйцевых камер у *Trl*-мутантов являются снижение в них экспрессии гена *Trl* и как следствие этого уменьшение количества белка GAGA. Снижение количества белка GAGA в соматических клетках яйцевых камер *Trl*-мутантов может вызывать нарушение экспрессии его генов-мишеней, продукты которых необходимы для обеспечения нормальной миграции разных типов фолликулярных клеток. Известно, что миграция разных типов клеток у разных организмов в значительной степени зависит от структуры актинового цитоскелета, в частности от формирования актиновых филаментов, требующихся для миграции этих клеток (Mogilner, Oster, 1996; Machesky, Way, 1998; Ghosh *et al.*, 2004). Поэтому мы полагаем, что наиболее вероятной причиной нарушения миграции соматических клеток у *Trl* мутантов может быть нарушение экспрессии генов, продукты которых имеют значение для формирования актинового цитоскелета в мигрирующих клетках яйцевых камер. Поскольку ранее было показано, что в питающих клетках яичников мутантов нарушено формирование актинового цитоскелета (Огиенко и др., 2006), нельзя исключить, что и миграция соматических клеток у *Trl*-мутантов нарушается вследствие этой же причины.

В результате изменения уровня экспрессии гена *Trl* в соматических клетках у мутантов может нарушаться экспрессия и других генов-мишеней белка GAGA, необходимых для обеспечения миграции фолликулярных клеток. Показано связывание белка GAGA с последовательностями ряда генов в культуре клеток (van Steensel *et al.*, 2003). Выявлены гены, которые активно экспрессируются в популяциях мигрирующих соматических клеток (бордюрные и центрипетальные) и, возможно, контролируют процесс их миграции (Wang *et al.*, 2006). Сопоставление данных, представленных в этих двух работах, позволило выделить пять генов, которые активно экспрессируются в мигрирующих соматических клетках яйцевых камер дрозофилы, и экспрессия которых, возможно, зависит от белка GAGA. Это гены: *Gliotactin (Gli)*, *Ras oncogene at 85D (Ras85D)*, *crinkled (ck)*, *midline fasciclin (mfas)* и *domeless (dome)*. Нельзя исключить, что именно нарушение в

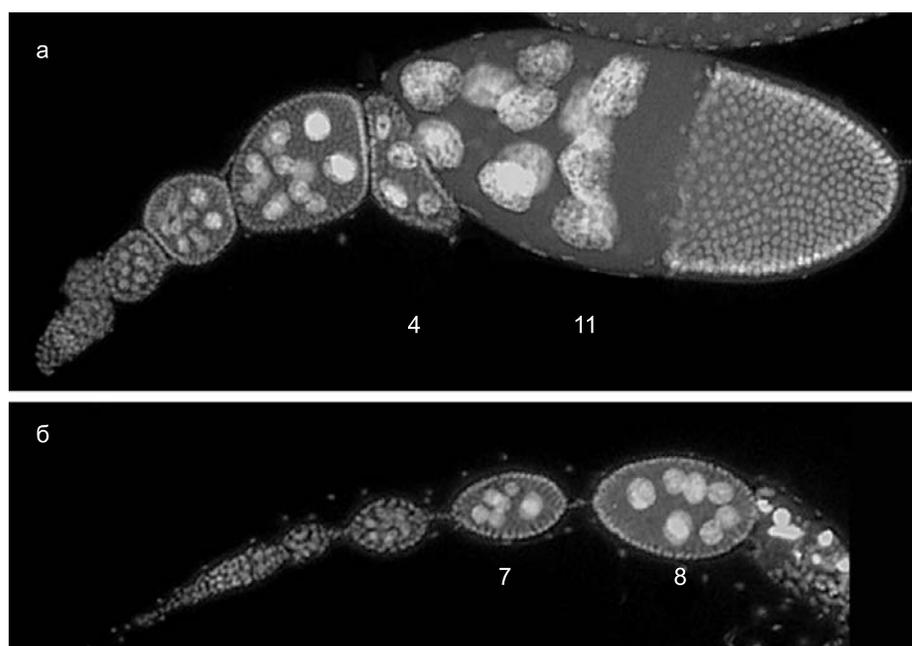


Рис. 4. Морфология яичников мутантов *Trl³⁶²* и *Trl^{362(ex)}*, выявленная при окрашивании с помощью DAPI.

а – в овариоле видны две последовательно расположенные камеры, в которых число питающих клеток составляет 4 и 11; б – видны две камеры с числом питающих клеток 7 и 8.

экспрессии этих генов у *Trl*-мутантов и является причиной выявленных миграционных дефектов соматических клеток.

Нельзя также исключить, что причиной нарушения в функционировании соматических клеток у *Trl*-мутантов может быть нарушение взаимодействия половых и соматических клеток. Так, анализ мутантов по гену *toucan* показал, что, несмотря на то что экспрессия гена *toucan* детектируется только в половых клетках, нарушения у мутантов выявляются в функционировании соматических клеток. Предполагается, что для функционирования соматических клеток необходимы сигналы, поступающие из половых клеток (Grammont *et al.*, 1997). Поскольку для мутантов *Trl³⁶²* было зафиксировано снижение белка GAGA в половых клетках (Огиенко и др., 2006), то нельзя исключить, что у *Trl*-мутантов снижение экспрессии гена в половых клетках может вызывать нарушение передачи определенных сигналов, необходимых для нормального функционирования соматических клеток. Однако мы полагаем, что эта причина является наименее вероятной, поскольку даже у *Trl^{362(ex)}*-мутантов выявляются очевидные нарушения в функционировании соматических клеток,

хотя для них не было показано снижение белка GAGA в половых клетках (Огиенко, 2007).

Для выявления причин нарушения миграции соматических клеток у *Trl*-мутантов необходимо проведение дополнительных экспериментов как на генетическом уровне, так и на уровне анализа экспрессии этих генов в разных типах клеток яйцевых камер дрозофил. Это требует разделения соматических и половых клеток с последующим анализом экспрессии гена только в соматических клетках.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Работа поддержана грантом РФФИ 06-04-49000.

Литература

- Огиенко А.А. Молекулярно-генетическая характеристика мутаций гена *Trithorax-like* и их влияние на оогенез *Drosophila melanogaster*: дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2007.
- Огиенко А.А., Карагодин Д.А., Павлова Н.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика гипоморфной мутации гена *Trithorax-like* – *Trl^{en82}*

- и анализ ее влияния на оогенез *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2008. Т. 39. № 2. С. 134–142.
- Огиенко А.А., Карагодин Д.А., Федорова С.А. и др. Анализ новой гипоморфной мутации гена *Trithorax-like*, влияющей на оогенез *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 3. С. 157–166.
- Berg C.A. The *Drosophila* shell game: patterning genes and morphological change // Trends Genet. 2005. V. 21. № 6. P. 346–355.
- Chao S., Nagoshi R.N. Induction of apoptosis in the germline and follicle layer of *Drosophila* egg chambers // Mech. Dev. 1999. V. 88. № 2. P. 159–172.
- Farkas G., Gausz J., Galloni M. *et al.* The *Trithorax-like* gene encodes the *Drosophila* GAGA factor // Nature. 1994. V. 371. P. 806–808.
- Ghosh M., Song X., Mouneimne G. *et al.* Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility // Science. 2004. V. 304. P. 743–746.
- Grammont M., Dastugue B., Couderc J.L. The *Drosophila toucan (toc)* gene is required in germline cells for the somatic cell patterning during oogenesis // Development. 1997. V. 124. P. 4917–4926.
- Horne-Badovinac S., Bilder D. Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber // Dev. Dyn. 2005. V. 232. № 3. P. 559–574.
- King R.C. Ovarian Development in *Drosophila melanogaster*. N.Y.: Academic Press, 1970.
- Machesky L.M., Way M. Actin branches out // Nature. 1998. V. 394. P. 125–126.
- Margolis J., Spradling A. Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary // Development. 1995. V. 121. № 11. P. 3797–3807.
- Mogilner A., Oster G. Cell motility driven by actin polymerization // Biophysical J. 1996. V. 71. P. 3030–3045.
- Montell D.J. Border-cell migration: the race is on // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. V. 4. № 1. P. 13–24.
- Montell D.J., Rorth P., Spradling A.C. *Slow border cells*, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP // Cell. 1992. V. 71. № 1. P. 51–62.
- Spradling A.C. Developmental genetics of oogenesis // The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. P. 1–70.
- van Steensel B., Delrow J., Bussemaker H.J. Genomewide analysis of *Drosophila* GAGA factor target genes reveals context-dependent DNA binding // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 2580–2585.
- Wang X., Bo J., Bridges T. *et al.* Analysis of cell migration using whole-genome expression profiling of migratory cells in the *Drosophila* ovary // Developmental Cell. 2006. V. 10. P. 483–495.

DISTURBANCE OF SOMATIC CELLS FUNCTIONING IN THE EGG CHAMBER OF *TRITHORAX-LIKE* MUTANTS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A.A. Ogienko, O.V. Laukhina, G.V. Vasiliev, E.M. Baricheva

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia; e-mail: barich@bionet.nsc.ru

Summary

We have investigated the role of *Drosophila melanogaster* *Trithorax-like* (*Trl*) gene in follicular cells functioning during the egg chamber development. Starting at stage 9 follicular cells migration in *Trl* mutant egg chambers is disrupted. We detected disturbance in movement of border and centripetal cells. In addition, we found that dorsal appendages formation is also disrupted in egg chambers of *Trl* mutants. That led us to conclusion that migration of cells giving rise to these structures is altered.