

Миграцию клеток зародышевой линии в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster* негативно регулируют окружающие соматические клетки

Н.В. Дорогова¹, А.С. Хрущева¹, Ю.А. Галимова², Д.Ю. Ощепков¹, Д.Е. Маслов³, Е.Д. Шведкина³,
К.А. Ахметова^{1,4}, С.А. Фёдорова¹ ✉

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Университет Алабамы, Бирмингем, отдел биохимии и молекулярной генетики, медицинский факультет, Бирмингем, Алабама, США

✉ e-mail: fsveta@bionet.nsc.ru

Аннотация. Клеточная миграция – важный морфогенетический процесс, необходимый на разных этапах индивидуального развития и функционирования организма. Инициация и поддержание состояния движения клеток требуют активации множества факторов, участвующих в регуляции транскрипции, преобразованиях сигналов, адгезивных взаимодействиях, модуляциях мембран и цитоскелета. Однако клеточная миграция зависит не только от статуса клеток, способных к активному движению, но и от состояния окружающих клеток, с которыми взаимодействуют движущиеся клетки. Окружающие клетки или матрикс не просто формируют субстрат для перемещения, но могут также участвовать в пространственно-временной регуляции миграции. В настоящее время нет точных представлений о генетических механизмах этой регуляции. Чтобы определить роль клеточного окружения в регуляции индивидуальной клеточной миграции, в настоящей работе мы изучали миграцию клеток зародышевой линии (КЗЛ) в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster*. В норме, КЗЛ обособляются на 3-й стадии эмбриогенеза на заднем полюсе эмбриона. Во время гастрюляции (6–7-я стадии) КЗЛ в виде консолидированной группы пассивно перемещаются внутрь эмбриона и оказываются в кармане первичной кишки. Далее КЗЛ индивидуализируются, приобретают амебондную форму, активно перемещаются сквозь эпителий кишки и мигрируют в 5–6-й брюшные сегменты эмбриона, где формируют парные первичные гонады. Мы провели скрининг генов, экспрессирующихся в окружающем КЗЛ эпителии в раннем эмбриогенезе и влияющих на их миграцию. Выявили гены *mys*, *Hph*, *stat92E*, *Tre-1* и *hop*, РНК-интерференция которых приводит к преждевременной активной миграции КЗЛ на 4–7-й стадиях эмбриогенеза. Эти гены можно разделить на две группы: модуляторы активности JAK/STAT сигнального каскада, индуцирующего миграцию в КЗЛ, – гены *stat92E*, *Tre-1*, *hop*, и гены, вовлеченные в морфогенез и поляризацию эпителия, т.е. модифицирующие проницаемость эпителиального барьера, – *mys*, *Hph*. Так как снижение количества продуктов каждого из этих генов приводило к преждевременной миграции КЗЛ, то можно сделать вывод, что в норме на ранних стадиях эмбриогенеза соматическое окружение негативно регулирует миграцию клеток зародышевой линии. Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; эмбриогенез; клетки зародышевой линии; миграция клеток; формирование эмбриональных гонад.

Для цитирования: Дорогова Н.В., Хрущева А.С., Галимова Ю.А., Ощепков Д.Ю., Маслов Д.Е., Шведкина Е.Д., Ахметова К.А., Фёдорова С.А. Миграцию зародышевой линии в раннем эмбриогенезе *Drosophila melanogaster* негативно регулируют окружающие соматические клетки. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(5):525-532. DOI 10.18699/VJ20.644

Migration of primordial germline cells is negatively regulated by surrounding somatic cells during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*

N.V. Dorogova¹, A.S. Khruscheva¹, Yu.A. Galimova², D.Yu. Oshchepkov¹, D.E. Maslov³, E.D. Shvedkina³,
K.A. Akhmetova^{1,4}, S.A. Fedorova¹ ✉

¹ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Molecular and Cellular Biology of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ University of Alabama at Birmingham, Department of Biochemistry and Molecular Genetics, School of Medicine, Birmingham, Alabama, USA

✉ e-mail: fsveta@bionet.nsc.ru

Abstract. Cell migration is an important morphogenetic process necessary at different stages of individual development and body functioning. The initiation and maintenance of the cell movement state requires the activation of many factors involved in the regulation of transcription, signal transduction, adhesive interactions, modulation of membranes and the

cytoskeleton. However, cell movement depends on the status of both migrating and surrounding cells, interacting with each other during movement. The surrounding cells or cell matrix not only form a substrate for movement, but can also participate in the spatio-temporal regulation of the migration. At present, there is no exact understanding of the genetic mechanisms of this regulation. To determine the role of the cell environment in the regulation of individual cell migration, we studied the migration of primordial germline cells (PGC) during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. Normally, PGC are formed at the 3rd stage of embryogenesis at the posterior pole of the embryo. During gastrulation (stages 6–7), PGC as a consolidated cell group passively transfers into the midgut primordium. Further, PGC are individualized, acquire an amoeboid form, and actively move through the midgut epithelium and migrate to the 5–6 abdominal segment of the embryo, where they form paired embryonic gonads. We screened for genes expressed in the epithelium surrounding PGC during early embryogenesis and affecting their migration. We identified the *myc*, *Hph*, *stat92E*, *Tre-1*, and *hop* genes, whose RNA interference leads to premature active PGC migration at stages 4–7 of embryogenesis. These genes can be divided into two groups: 1) modulators of JAK/STAT pathway activity inducing PGC migration (*stat92E*, *Tre-1*, *hop*), and 2) *myc* and *Hph* involved in epithelial morphogenesis and polarization, i.e. modifying the permeability of the epithelial barrier. Since a depletion of each of these gene products resulted in premature PGC migration, we can conclude that, normally, the somatic environment negatively regulates PGC migration during early *Drosophila* embryogenesis.

Key words: *Drosophila melanogaster*; embryogenesis; germline cells; cell migration; embryonic gonad development.

For citation: Dorogova N.V., Khruscheva A.S., Galimova Iu.A., Oshchepkov D.Yu., Maslov D.E., Shvedkina E.D., Akhmetova K.A., Fedorova S.A. Migration of primordial germline cells is negatively regulated by surrounding somatic cells during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(5):525-532. DOI 10.18699/VJ20.644

Введение

Клеточная миграция – важный морфогенетический процесс, необходимый на разных этапах индивидуального развития и функционирования организма. Масштабная миграция клеток происходит во время формирования зародышевых слоев, затем на этапе закладки и последующего формирования органов и тканей (Aman, Piotrowski, 2010; Schumacher, 2019). Некоторые дифференцированные клетки также сохраняют способность к миграции при выполнении своих специализированных функций (Ratheesh et al., 2015; Barros-Becker et al., 2017; Sharouri-Moghaddam et al., 2018). Инициация и поддержание состояния движения клеток требуют активации множества факторов, участвующих в регуляции транскрипции, преобразованиях сигналов, адгезивных взаимодействиях, модуляциях мембран и цитоскелета (Devreotes, Horwitz, 2015). Молекулярно-генетическая природа этих процессов эволюционно консервативна и имеет высокую гомологию в клеточных типах и у разных организмов. Поэтому различные аспекты клеточной миграции и механизмы ее регуляции эффективно изучаются на модельных организмах как *in vivo*, так и *in vitro*. Одной из таких моделей является эмбрион *Drosophila melanogaster* (Reig et al., 2014).

Эмбрион дрозофилы на ранних этапах развития представляет собой синцитий. В течение первых 15 мин (1-я стадия эмбриогенеза) происходит слияние мужского и женского пронуклеусов, сопровождающееся 13 раундами эмбриональных митозов. На 3-й стадии развития эмбриона обособляются первые клетки – клетки зародышевой линии (КЗЛ), которые формируются на заднем полюсе эмбриона в области половой плазмы. Остальные ядра продолжают дробление и только на 5-й стадии эмбриогенеза приобретают клеточные мембраны в процессе целлюляризации. В течение гастрюляции группа тесно связанных между собой КЗЛ пассивно перемещается с заднего полюса внутрь эмбриона за счет инвагинации клеточного слоя будущей эндодермы и, таким образом, оказывается в кармане первичной кишки. На 10-й стадии эмбриогенеза КЗЛ в кармане первичной кишки теряют межклеточные

контакты, индивидуализируются и приобретают амебонную форму. Одновременно в клетках первичной кишки активируется процесс эпителиально-мезенхимального перехода, в результате которого они частично теряют апикально-базальную поляризацию, сопровождающуюся ослаблением межклеточных контактов. Эти процессы позволяют КЗЛ активно перемещаться сквозь стенки первичной кишки и мигрировать в область формирования первичных гонад. В ходе активной миграции КЗЛ разделяются на две группы, которые в 5-м брюшном сегменте эмбриона объединяются с мезодермальными клетками и формируют парные эмбриональные гонады (Dansereau, Lasko, 2008; Richardson, Lehmann, 2010).

Мы показали, что транскрипционный фактор GAGA (GAF) участвует в регуляции миграции КЗЛ в раннем эмбриогенезе (Дорогова и др., 2016). У мутантов по гену *Trl*, кодирующему GAF, КЗЛ в раннем эмбриогенезе вместо пассивного перемещения консолидированной группой начинают активно мигрировать с заднего полюса внутрь эмбриона. При этом КЗЛ теряют округлую форму, у них возникают выросты цитоплазмы, подобные ламеллоподиям, они хаотично двигаются, не участвуя в итоге в формировании гонад. Нами было показано, что в самих КЗЛ белок GAF отсутствует, а эффект их преждевременной миграции в раннем эмбриогенезе зависит от экспрессии *Trl* в соматических клетках, окружающих КЗЛ (Дорогова и др., 2016). Настоящая работа посвящена выявлению генов-мишеней транскрипционного фактора GAF, участвующих в регуляции миграции КЗЛ со стороны окружающих их эпителиальных клеток.

Материалы и методы

В работе использована линия *D. melanogaster* дикого типа *Hikone AW* из фонда лаборатории генетики клеточного цикла Института цитологии и генетики СО РАН. Остальные линии получены из стоковых центров Мишима (National Institute of Genetics, NIG, Япония) и Блумингтон (Bloomington Stocks Centre, США), номера линий и их генотипы представлены в табл. 1. Все перечисленные в

Таблица 1. Линии мух, используемые в работе

| Ген | Стоковый центр | Номер линии | Генотип |
|-----------------|----------------|-------------|--|
| +/+ | Bloomington | 4 | Линия дикого типа, контроль 1 |
| <i>tub-GAL4</i> | Bloomington | 30029 | y[1] w[11 18]; P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7 P{ry[+t7.2] = neoFRT}82B/TM6B, Tb[1] |
| <i>myc</i> | NIG | 51454 | y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC03189}attP40 |
| <i>myc</i> | Bloomington | 25783 | y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiPJF01761}attP2 |
| <i>stat92E</i> | Bloomington | 33637 | y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00035}attP2 |
| <i>Tre-1</i> | NIG | HMS00433 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>Hph</i> | Bloomington | 34717 | y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01196}attP2 |
| <i>Hph</i> | NIG | 1114R-2 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2/TM3,Sb |
| <i>hop</i> | NIG | 2720R-1 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>hop</i> | NIG | HMS00779 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>for</i> | NIG | 10033R-1 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>for</i> | NIG | GL00026 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP40 |
| <i>mbc</i> | NIG | 10379R-1 | y[1] v[1]; P{TRiP}attP40/CyO |
| <i>mbc</i> | NIG | HMC03172 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>pod1</i> | Bloomington | 41705 | y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS02270}attP2 |
| <i>pod1</i> | Bloomington | 31219 | y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiPJF01774}attP2 |
| <i>rib</i> | NIG | HMC03083 | y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC03083}attP2 |
| <i>rib</i> | NIG | 7230R-2 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>ptp4E</i> | Bloomington | 38369 | y[1] sc[*] v[1] sev[21]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS01838}attP2 |
| <i>ptp4E</i> | Bloomington | 60008 | y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS05000}attP40 |
| <i>tll</i> | NIG | HMS01316 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>tll</i> | Bloomington | 27242 | y[1] v[1]; P{TRiPJF02545}attP2 |
| <i>tao</i> | NIG | HMS01226 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>tao</i> | Bloomington | 31226 | y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiPJF01803}attP2 |
| <i>shg</i> | Bloomington | 27698 | y[1] v[1]; P{TRiPJF02769}attP2/TM3, Sb1 |
| <i>shg</i> | NIG | HMS00693 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>Sdc</i> | NIG | 10497Rb-2 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>bbg</i> | NIG | HMJ23903 | y[1] v[1]; P{TRiPJF02769}attP2/TM3, Sb1 |
| <i>unc-115a</i> | NIG | 31352R-3 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |
| <i>Crk</i> | NIG | HMJ22995 | y[1] sc v[1]; P{TRiP}attP2 |

табл. 1 линии содержат генетические конструкции для эктопической РНК-интерференции соответствующих генов. Для индукции РНК-интерференции осуществляли скрещивание линий, несущих интерферирующую генетическую конструкцию под UAS-промотором с линией, имеющей драйвер *tub-GAL4*, повсеместно экспрессирующий дрожжевой транскрипционный фактор GAL, специфично связывающийся с UAS-промотором. Мух содержали на стандартной агар-агар/кукурузной среде при температуре 25 °С.

Выделение, фиксацию и окраску эмбрионов антителами осуществляли согласно методике, описанной ранее (Dorogova et al., 2014). Для этого оплодотворенных самок оставляли откладывать яйца в течение ночи, затем проводили сбор и фиксацию эмбрионов. Фиксированные эмбрионы хранили в метаноле при -20 °С, для анализа их

регидрировали и окрашивали антителами. В работе были использованы первичные антитела rabbit anti-Vasa (разведение 1 : 30, SC 30210, Santa Cruz Biotechnology) и вторичные антитела anti-rabbit Alexa 568 (разведение 1 : 300, Molecular probe, A-11011). После инкубации с антителами препараты окрашивали раствором DAPI (2 мг/мл в 1 × PBS, pH 7.4) 5 мин и заключали в Mowiol, содержащий 10 % DABCO. Для каждой комбинации (РНК-интерференции исследуемого гена, индуцируемой повсеместным драйвером *tub-GAL4*), суммарно анализировали 400–500 эмбрионов на разных стадиях эмбриогенеза, в качестве контролей использовали линию дикого типа *Hikone AW*, драйвер *tub-GAL4*, а также перечисленные в табл. 1 линии без индукции РНК-интерференции. В каждом контроле проанализировано 100–200 эмбрионов на разных стадиях эмбриогенеза. Анализ и фотографирование препаратов

выполняли с помощью микроскопа AxioImager Z1 с приставкой ApoTome (Zeiss, Германия) и фотокамеры Axio-Cam MR (Zeiss).

Биоинформатический анализ проводили, используя базы данных FlyExpress, Fly-FISH и Berkeley Drosophila Genome Project, DRoID. Сопоставляя данные из перечисленных баз, получили выборку генов, экспрессирующихся на нужных стадиях эмбриогенеза и потенциально регулируемых GAGA-фактором. Наличие неканонических сайтов связывания анализировали при помощи оригинального программного пакета SITECON (Omelina et al., 2011). Для этого использовали регуляторные области 500 и 1000 нуклеотидных пар выше старта транскрипции.

Результаты

Ранее мы показали, что у мутантов по гену *Trl*, кодирующему транскрипционный фактор GAGA (GAF), нарушена миграция КЗЛ в эмбриогенезе (Дорогова и др., 2016). Недостаток GAF приводит к преждевременному транзитальному перемещению КЗЛ с заднего полюса внутрь эмбриона. Нами выявлено, что эффект преждевременной миграции КЗЛ в раннем эмбриогенезе зависит от зиготической экспрессии *Trl* в соматических клетках заднего полюса эмбриона. Так как GAF – регулятор транскрипции, то логично было предположить, что его влияние на миграцию КЗЛ происходит опосредованно, через его гены-мишени. Экспериментально подтверждено связывание GAF с промоторами примерно 300 генов (van Steensel et al., 2003; Omelina et al., 2011), участвующих в большом разнообразии фундаментальных клеточных процессов.

Для определения роли клеточного окружения в регуляции и осуществлении индивидуальной клеточной миграции в раннем эмбриогенезе мы провели скрининг генов, экспрессирующихся на 4–6-й стадиях эмбриогенеза в соматических клетках, окружающих КЗЛ (т.е. области экспрессии гена *Trl* на этих стадиях, паттерн экспрессии подтверждался данными литературы и из базы Berkeley Drosophila Genome Project, <https://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>), и получили выборку из 81 гена. В выборку попали гены *stat92E*, *hop*, *Trl*, *Tre-1*, которые являются известными регуляторами миграции клеток (Kunwar et al., 2003, 2008; Li et al., 2003; Sheng et al., 2009; Дорогова и др., 2016). Согласно базе данных DRoID, 67 % генов из полученной выборки – потенциальные мишени транскрипционного фактора GAF. Поэтому полученная выборка генов была затем проанализирована при помощи оригинального программного пакета SITECON (Omelina et al., 2011) на наличие сайтов связывания GAF. Для анализа использованы регуляторные области 500 нуклеотидных пар выше старта транскрипции. В результате были выявлены 39 потенциальных сайтов связывания GAF типа GAGnGAG и 68 сайтов GAGnnnGAG в области –500...+1. В качестве первичной проверки функциональности найденных сайтов мы проанализировали наличие пиков связывания GAF из базы данных ModEncode (Embryo_0_12h_GAF_ChIP_chip; <http://www.modencode.org/>) и выяснили, что только для 7 из 39 GAGnGAG сайтов и для 6 из 68 сайтов GAGnnnGAG из выборки (–500...+1) не показано связывания с GAF в эмбриогенезе (а также для двух генов не было данных).

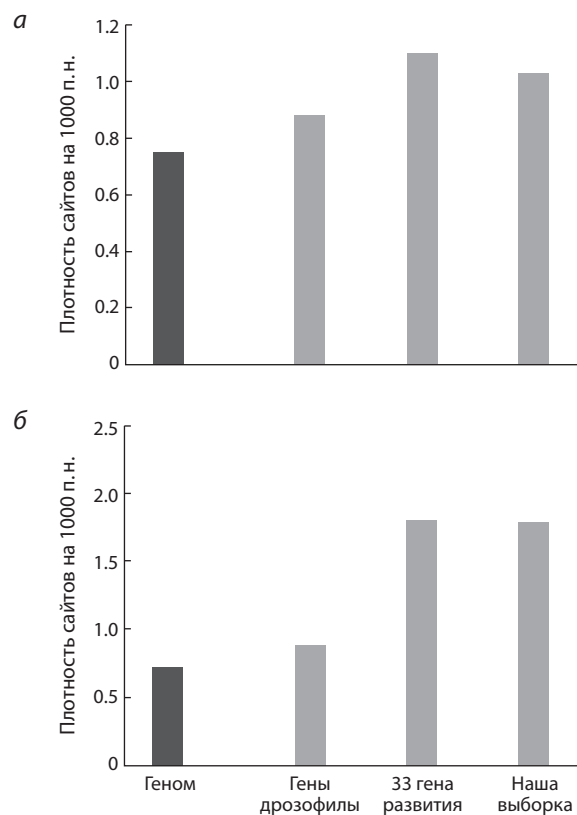


Рис. 1. Плотность распределения потенциальных сайтов связывания GAF (на 1000 нуклеотидов) типа GAGnGAG (а) и GAGnnnGAG (б) по различным выборкам генов.

Черный столбец – плотность сайтов по всему геному дрозофилы, серые столбцы – плотность сайтов в промоторных районах (–500...+1) различных выборок генов: «гены дрозофилы» – 6947 случайных генов, «33 гена развития» – гены развития дрозофилы (Omelina et al., 2011), «наша выборка» – выборка генов, экспрессирующихся в эпителиальных клетках заднего полюса эмбриона на 4–6-й стадиях развития.

Интересно отметить, что плотность распределения сайтов связывания GAF в районах –500...+1 от старта инициации транскрипции генов, экспрессирующихся в раннем эмбриогенезе в соматических клетках, окружающих КЗЛ, неслучайна (рис. 1), она превышает среднюю плотность распределения таких сайтов (на 1000 п.н.) на геном (например, плотность распределения сайтов GAGnnnGAG в области –500...+1 превышает среднюю плотность на геном более чем в два раза) и, что особенно любопытно, соответствует плотности сайтов GAF в генах раннего развития. В нашей выборке были гены, действительно экспрессирующиеся в раннем эмбриогенезе, однако большинство из них не являются генами раннего развития.

Мы проанализировали миграцию КЗЛ при РНК-интерференции ряда генов, запускаемой посредством GAL4/UAS системы с помощью повсеместного драйвера *tub-GAL4* (табл. 2, рис. 2). Для многих генов были доступны линии с РНК-интерференцией разных участков этих генов, в таких случаях мы использовали эти линии в независимых экспериментах по исследованию миграции КЗЛ в эмбриогенезе. В качестве контроля были: линии дикого типа *Hikone AW*, линия, содержащая драйвер *tub-GAL4*, и линии с *UAS –RNAi* (без индукции интерференции).

Таблица 2. Фенотипы миграции КЗЛ при РНК-интерференции соответствующего гена

| Ген, номер линии | Область экспрессии на 1–5-й стадиях эмбриогенеза | Наблюдаемый фенотип при РНК-интерференции |
|-----------------------|---|---|
| <i>mys</i> 51454 | 1–4-я стадии – повсеместно* | Преждевременная миграция КЗЛ на 5-й стадии |
| <i>mys</i> 25783 | 5-я стадия – в эпителиальных клетках на полюсах эмбриона | Преждевременная миграция КЗЛ на 5-й стадии |
| <i>mbc</i> 51446 | 1–4-я стадии – повсеместно*, 5-я стадия – бластодермальные клетки, кроме КЗЛ | Ранняя миграция не нарушена, но при выходе из кармана первичной кишки на 11-й стадии КЗЛ теряют ориентацию |
| <i>mbc</i> 10379R-1 | | Ранняя миграция не нарушена, но есть слабые нарушения направления миграции КЗЛ на 11-й стадии |
| <i>hop</i> 32979 | 1–4-я стадии – сильная повсеместно*, 5-я стадия – слабая повсеместно, включая КЗЛ | Нарушение выхода КЗЛ из первичной кишки на 10-й стадии |
| <i>hop</i> 00779 | | Нарушение выхода КЗЛ из первичной кишки на 10-й стадии |
| <i>stat92E</i> 33637 | 1–5-я стадии – повсеместно* | Преждевременная миграция на ранних стадиях и в среднем эмбриогенезе, часть КЗЛ остается в кармане на 10–11-й стадиях |
| <i>Hph</i> 1114R | 1–4-я стадии – повсеместно*, исчезает к 5-й стадии | Высокий уровень гибели эмбрионов, многие эмбрионы не доживают до гастрюляции, у выживших гастрюляция и формирование эпителия идут с нарушениями, КЗЛ растекаются по поверхности, раскиданы хаотично |
| <i>Hph</i> 34717 | | Высокая смертность в среднем эмбриогенезе. У выживших есть нарушения на ранних и поздних стадиях, КЗЛ растекаются по поверхности |
| <i>Tre-1</i> 3171R | 1–5-я стадии – задний полюс эмбриона, область половой плазмы | Примерно одна треть эмбрионов гибнет, есть нарушения гастрюляции, миграция КЗЛ нарушена и на ранних, и на средних стадиях |
| <i>Tre-1</i> HMS00433 | | Примерно одна треть эмбрионов гибнет, есть нарушения гастрюляции, миграция КЗЛ нарушена и на ранних, и на средних стадиях |
| <i>ptp4E</i> 60008 | 1–5-я стадии – повсеместно* с постепенным снижением | Нарушения миграции КЗЛ есть на 10–11-й стадиях, часть клеток остается в кармане кишки |
| <i>ptp4E</i> 38369 | | На 10–11-й стадиях часть КЗЛ остается в кармане кишки |
| <i>pod1</i> 31219 | 1–5-я стадии – повсеместно* | Нет нарушений |
| <i>pod1</i> 41705 | | » |
| <i>rib</i> 7230R-2 | 1–4-я стадии – экспрессии нет, | » |
| <i>rib</i> 50682 | 5-я стадия – в эпителиальных клетках на полюсах эмбриона | » |
| <i>for</i> 10033R-1 | 1–3-я стадии – повсеместно*, | » |
| <i>for</i> GL00026 | 4-я стадия – повсеместно, кроме КЗЛ, 5-я стадия – в эпителиальных клетках на заднем полюсе эмбриона | » |
| <i>tll</i> HMS01316 | 1–4-я стадии – экспрессии нет, | » |
| <i>tll</i> 27242 | 5-я стадия – половая плазма | » |
| <i>tao</i> HMS01226 | 1–4-я стадии – повсеместно*, | » |
| <i>tao</i> 31226 | 5-я стадия – КЗЛ | » |
| <i>shg</i> 27698 | 1–5-я стадии – повсеместно* | » |
| <i>shg</i> HMS00693 | | » |
| <i>bbg</i> HMJ23903 | 1–4-я стадии – экспрессии нет, 5–6-я стадии – в эпителиальных клетках на заднем полюсе эмбриона | » |
| <i>unc-115a</i> | 1–4-я стадии – повсеместно*, деградирует к 5-й стадии | » |
| <i>Sdc</i> 10497 | 1–6-я стадии – повсеместно*, кроме КЗЛ | Эмбрион деградирует, и КЗЛ гибнут на ранних стадиях, нарушений миграции нет |
| <i>Crk</i> 22995 | 1–6-я стадии – повсеместно* | Нарушения есть только на 10-й стадии при миграции через кишку: не все КЗЛ мигрируют, часть остается в кармане |

* Повсеместно – означает локализацию мРНК соответствующего гена по всему объему эмбриона, включая область половой плазмы на 1–3-й стадиях и сформировавшиеся КЗЛ на 4–6-й стадиях (если не указано другое).

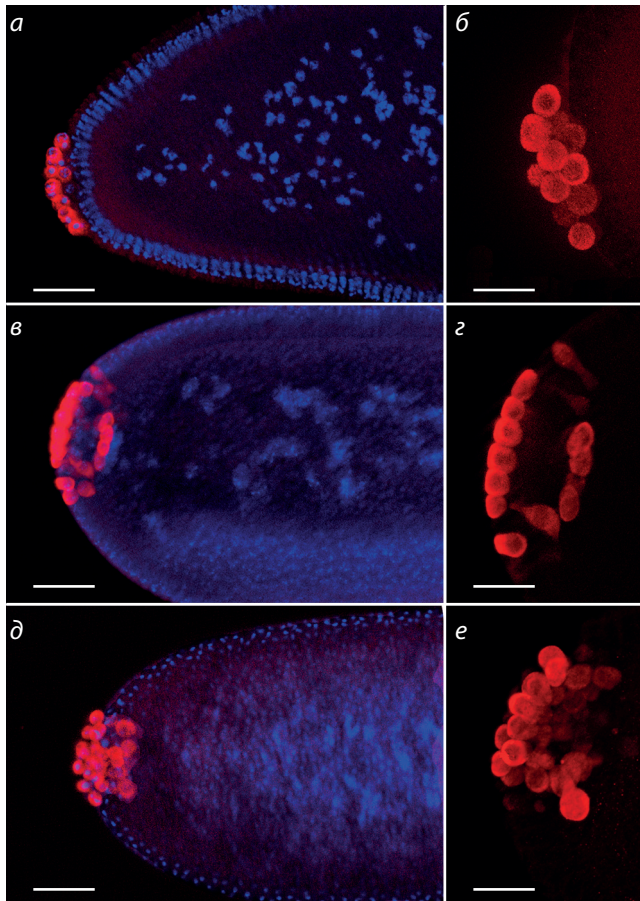


Рис. 2. Клетки зародышевой линии на 4–5-й стадиях эмбрионального развития в норме (а, б) и у *tub-GAL4/UAS-myc-RNAi* (в, з) и *tub-GAL4/UAS-Hph-RNAi* (д, е).

а, б – в норме примордиальные зародышевые клетки располагаются на заднем полюсе эмбриона и имеют характерную для этой стадии сферическую форму; в, з – преждевременная миграция КЗЛ в *tub-GAL4/UAS-myc-RNAi* эмбрионах; д, е – преждевременная миграция КЗЛ в *tub-GAL4/UAS-Hph-RNAi* эмбрионах. Ядра окрашены DAPI (синий), КЗЛ – антителами к белку VASA (красный). Масштаб: а, в, д – 30 мкм; б, з, е – 50 мкм.

Во всех контрольных образцах преждевременная миграция КЗЛ не наблюдалась.

Обнаружена преждевременная миграция КЗЛ в раннем эмбриогенезе при РНК-интерференции генов *myc* (~90 %, $n^* = 60$; * здесь и далее n – число просмотренных эмбрионов *tub-GAL4/UAS-RNAi* на 4–5-й стадиях эмбриогенеза), *Hph* (~70 %, $n = 45$), *stat92E* (~90 %, $n = 50$), *Tre-1* (~70 %, $n = 40$) и *hop* (~40 %, $n = 40$). При этом интерференция генов *stat92E*, *Tre-1* и *hop*, помимо нарушений в раннем эмбриогенезе, приводила еще и к нарушениям миграции КЗЛ в среднем эмбриогенезе, на 10–11-й стадиях. Часть генов, *shg*, *hop*, *mbc*, *Hph*, *ptp4E* и *Crk*, оказалась вовлеченной только в процесс миграции КЗЛ сквозь первичную кишку на 10–11-й стадиях. В случае интерференции генов *tll*, *tao*, *for*, *bbg*, *unc-115a*, *Sdc*, *pod1* и *rib* никакого влияния на миграцию КЗЛ в эмбриогенезе нами не выявлено.

Обсуждение

Обнаруженный ранее феномен преждевременной миграции КЗЛ, зависящей от экспрессии гена *Trl* в окружающих КЗЛ соматических клетках (Дорогова и др., 2016),

побудил нас к поиску других генов, регулирующих миграцию КЗЛ в раннем эмбриогенезе. Любопытно, что 67 % генов, экспрессирующихся на 4–6-й стадиях эмбриогенеза в эпителиальных клетках, окружающих КЗЛ, оказались потенциальными мишенями транскрипционного фактора GAF, что позволяет предполагать его участие в регуляции миграции клеток зародышевой линии. Мы сравнили полученные нами данные с транскрипционной регуляцией других типов мигрирующих клеток в эмбрионе дрозофилы (Bae et al., 2017) – соматических клеток висцеральной мезодермы (предшественники продольных мышц кишечника, мигрируют коллективным потоком) и гемоцитов (эквивалент клеток крови, мигрируют индивидуально). Среди 73 генов, имеющих общие профили экспрессии в обоих типах мигрирующих соматических клеток, экспрессия 64 генов (88 %) может регулироваться транскрипционным фактором. Интересно также отметить, что плотность распределения сайтов связывания GAF в промоторных районах генов из нашей выборки почти двукратно превышает случайную плотность и соответствует плотности распределения сайтов GAF в генах раннего развития (Omelina et al., 2011). Таким образом, можно предположить, что GAF не только регулирует эмбриональную миграцию клеток, но также служит регулятором раннего развития эмбриона дрозофилы.

Так как гены, участвующие в регуляции миграции эмбриональных клеток, «обогащены» мишенями транскрипционного фактора GAF, то мы использовали этот факт для дальнейшей селекции генов, участвующих в регуляции миграции КЗЛ со стороны окружающей их соматических клеток. Для 17 генов из полученной выборки мы проанализировали их влияние на миграцию КЗЛ и выявили ряд генов, негативно регулирующих этот процесс. Мы показали, что РНК-интерференция генов *myc*, *Hph*, *stat92E*, *Tre-1* и *hop* приводит к преждевременному трансэпителиальному перемещению КЗЛ в раннем эмбриогенезе. Участие трех последних генов в регуляции миграции КЗЛ было известно и ранее. Так, ген *hop* (*hopscotch*) кодирует Янус-киназу (JAK-киназу), а ген *stat92E* – транскрипционный фактор STAT92E (Signal Transducer and Activator of Transcription), оба этих белка – активаторы эволюционно консервативного JAK/STAT сигнального каскада, индуцирующего миграцию различных клеток у дрозофилы, мышей и людей (Li et al., 2003; Silver et al., 2005). Наблюдаемая нами преждевременная миграция КЗЛ при РНК-интерференции гена *hop* хорошо согласуется с данными J. Li с коллегами (2003), которые показали, что ген *hop* экспрессируется только в соматических клетках эмбриона, а его мутации приводят к гиперактивации STAT92E, вызывая преждевременную миграцию клеток зародышевой линии. Следует отметить, что для инициации миграции необходима активация JAK/STAT пути в самих КЗЛ. На стадии раннего эмбриогенеза в КЗЛ этот сигнальный каскад активируется киназой Tor (Li et al., 2003). В соматических клетках, окружающих КЗЛ, этот сигнальный каскад активируется JAK-киназой и, по-видимому, контролирует реорганизацию цитоскелета и поляризацию эпителиальных клеток.

Участие JAK/STAT в морфогенезе и поляризации эпителия было определено для многих тканей, включая эм-

бриональный кишечник дрозофилы (Josten et al., 2004). Ген *Tre-1* также относится к JAK/STAT-пути и кодирует рецептор G-белка (GPCR) – трансмембранный рецептор хемоаттрактантов (Kunwar et al., 2003, 2008; Sheng et al., 2009). Активация *Tre-1* инициирует серьезные внутриклеточные перестроения – клетка меняет свою поляризацию, изменяется регуляция цитоскелета, что в совокупности создает условия для активного перемещения клетки. Показано, что на ранних стадиях эмбриогенеза *Tre-1* также необходим для поляризации клеток (Richardson, Lehmann, 2010). Мы полагаем, что РНК-интерференция этого гена может приводить к более слабой поляризации эпителиальных клеток и, как следствие, к повышению их проницаемости.

Наиболее интересными нам представляются полученные результаты об участии в регуляции миграции КЗЛ генов *mus* и *Hph*. Ген *mus* (другое название – *dm, diminutive*) кодирует хорошо известный транскрипционный фактор, гомологичный протоонкогену Мус позвоночных, необходимый для пролиферации и роста клеток. Удивительно, но в недавнем скрининге модуляторов инвазии опухолей обнаружено, что Мус препятствует распространению и метастазированию опухоли (Ma et al., 2017). Эктопическая экспрессия человеческого сМус эффективно подавляла JNK-зависимую клеточную инвазию и миграцию в клеточных линиях как дрозофилы, так и аденокарциномы легкого человека (Ma et al., 2017). Эти исследователи выяснили, что Мус со своим транскрипционным партнером усиливают экспрессию тирозинкиназы *puc* (*pucered*), которая, с одной стороны, вовлечена в поляризацию и морфогенез эпителиальных клеток, а с другой, является ингибитором JNK сигнального каскада, критически необходимого для опухолевых инвазий и миграции клеток (Ma et al., 2017). Следовательно, снижение уровня Мус в соматических клетках способно провоцировать миграцию КЗЛ за счет увеличения проницаемости окружающих соматических клеток.

Ген *Hph* (*HIF prolyl hydroxylase*) кодирует HIF пролил-4-гидролазу – ядерный транспортер белков и сенсор кислорода в клетке. Мутации по этому гену нарушают формирование эмбриональных трахей у дрозофилы. Кроме того, показано, что от дозы гена *Hph* зависит скорость миграции соматических бордюрных клеток в оогенезе дрозофилы: сверхэкспрессия гена *Hph* в этих клетках ускоряла их движение, тогда как истощение по этому белку приводило к замедлению миграции (Doronkin et al., 2010). При этом в клеточных клонах, мутантных по *Hph*, наблюдалось снижение уровня экспрессии транскрипционного фактора *slbo* (*slow border cells*) – ключевого регулятора миграции бордюрных клеток, и *shg* (*shotgun*), кодирующего белок клеточной адгезии ДЕ-кадгерин (Doronkin et al., 2010).

Таким образом, выявленные нами негативные регуляторы миграции КЗЛ в раннем эмбриогенезе можно разделить на две группы: модификаторы активности JAK/STAT сигнального каскада, индуцирующего миграцию клеток у различных организмов, и гены, вовлеченные в поляризацию и морфогенез эпителия. Первая группа генов в норме снижает инвазивный потенциал мигрирующих клеток зародышевой линии, а вторая отвечает за непроницаемость эпителиального слоя.

Заключение

В настоящей работе мы провели скрининг генов, вовлеченных в миграцию КЗЛ в раннем эмбриогенезе. Особенностью нашего скрининга был поиск регуляторов миграции не в самих мигрирующих КЗЛ, а в окружающих их соматических клетках. Выявлено пять генов, *mus*, *Hph*, *stat92E*, *Tre-1* и *hop*, РНК-интерференция которых приводит к преждевременной миграции КЗЛ в раннем эмбриогенезе. Феномен преждевременной миграции демонстрирует, что окружающие клетки, в частности эпителиальные, не просто формируют субстрат для перемещения КЗЛ, но и могут влиять на этот процесс регуляторно. Однако именно этот аспект регуляции миграции слабо изучен и далек от понимания. Тем не менее он представляет интерес и требует дальнейшего детального изучения, поскольку прослеживается гомология с другими вариантами индивидуальной клеточной миграции, в том числе связанными с метастазированием.

Список литературы / References

- Дорогова Н.В., Хрущева А.С., Федорова Е.В., Огиенко А.А., Баричева Э.М. Роль фактора GAGA в миграции примордиальных зародышевых клеток и формировании гонад дрозофилы. *Онтогенез*. 2016;47(1):40-48. DOI 10.7868/S0475145016010031. [Dorogova N.V., Fedorova E.V., Ogienko A.A., Baricheva E.M., Khrushcheva A.S. Role of GAGA factor in *Drosophila* primordial germ cell migration and gonad development. *Russ. J. Dev. Biol.* 2016;47(1):33-40. DOI 10.1134/S1062360416010033.]
- Aman A., Piotrowski T. Cell migration during morphogenesis. *Dev. Biol.* 2010;341(1):20-33. DOI 10.1016/j.ydbio.
- Bae Y.K., Macabenta F., Curtis H.L., Stathopoulos A. Comparative analysis of gene expression profiles for several migrating cell types identifies cell migration regulators. *Mech. Dev.* 2017;148:40-55. DOI 10.1016/j.mod.2017.04.004.
- Barros-Becker F., Lam P.Y., Fisher R., Huttenlocher A. Live imaging reveals distinct modes of neutrophil and macrophage migration within interstitial tissues. *J. Cell Sci.* 2017;130(22):3801-3808. DOI 10.1242/jcs.206128.
- Dansereau D.A., Lasko P. The development of germline stem cells in *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.* 2008;450:3-26. DOI 10.1007/978-1-60327-214-8_1.
- Devreotes P., Horwitz A.R. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015;7(8):a005959. DOI 10.1101/cshperspect.a005959.
- Dorogova N.V., Fedorova E.V., Bolobolova E.U., Ogienko A.A., Baricheva E.M. GAGA protein is essential for male germ cell development in *Drosophila*. *Genesis*. 2014;52(8):738-751. DOI 10.1002/dvg.22789.
- Doronkin S., Djagaeva I., Nagle M.E., Reiter L.T., Seagroves T.N. Dose-dependent modulation of HIF-1 α /sima controls the rate of cell migration and invasion in *Drosophila* ovary border cells. *Oncogene*. 2010;29(8):1123-1134. DOI 10.1038/onc.2009.407.
- Josten F., Fuss B., Feix M., Meissner T., Hoch M. Cooperation of JAK/STAT and Notch signaling in the *Drosophila* foregut. *Dev. Biol.* 2004;267(1):181-189. DOI 10.1016/j.ydbio.2003.11.016.
- Kunwar P.S., Sano H., Renault A.D., Barbosa V., Fuse N., Lehmann R. Tre1 GPCR initiates germ cell transepithelial migration by regulating *Drosophila melanogaster* E-cadherin. *J. Cell Biol.* 2008;183(1):157-168. DOI 10.1083/jcb.200807049.
- Kunwar P.S., Starz-Gaiano M., Bainton R.J., Heberlein U., Lehmann R. Tre1, a G protein-coupled receptor, directs transepithelial migration of *Drosophila* germ cells. *PLoS Biol.* 2003;1(3):E80. DOI 10.1371/journal.pbio.0000080.
- Li J., Xia F., Li W.X. Coactivation of STAT and Ras is required for germ cell proliferation and invasive migration in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 2003;5(5):787-798. DOI 10.1016/s1534-5807(03)00328-9.

- Ma X., Huang J., Tian Y., Chen Y., Yang Y., Zhang X., Zhang F., Xue L. Myc suppresses tumor invasion and cell migration by inhibiting JNK signaling. *Oncogene*. 2017;36:3159-3167. DOI 10.1038/onc.2016.463.
- Omelina E.S., Baricheva E.M., Oshchepkov D.Y., Merkulova T.I. Analysis and recognition of the GAGA transcription factor binding sites in *Drosophila* genes. *Comput. Biol. Chem.* 2011;35:363-370. DOI 10.1016/j.compbiolchem.2011.10.008.
- Ratheesh A., Belyaeva V., Siekhaus D.E. *Drosophila* immune cell migration and adhesion during embryonic development and larval immune responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015;36:71-79. DOI 10.1016/j.ceb.2015.07.003.
- Reig G., Pulgar E., Concha M.L. Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development*. 2014;141(10):1999-2013. DOI 10.1242/dev.101451.
- Richardson B.E., Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11(1):37-49. DOI 10.1038/nrm2815.
- Schumacher L. Collective cell migration in development. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1146:105-116. DOI 10.1007/978-3-030-17593-1_7.
- Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaceli S.-A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-6440. DOI 10.1002/jcp.26429.
- Sheng X.R., Posenau T., Gumulak-Smith J.J., Matunis E., Van Dorren M., Wawersik M. Jak-STAT regulation of male germline stem cell establishment during *Drosophila* embryogenesis. *Dev. Biol.* 2009;334(2):335-344. DOI 10.1016/j.ydbio.2009.07.031.
- Silver D.L., Geisbrecht E.R., Montell D.J. Requirement for JAK/STAT signaling throughout border cell migration in *Drosophila*. *Development*. 2005;132(15):3483-3492. DOI 10.1242/dev.01910.
- 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;100(5):2580-2585. DOI 10.1073/pnas.0438000100.

ORCID ID

S.A. Fedorova orcid.org/0000-0001-8257-4654

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00321. Работа Н.В. Дороговой и С.А. Фёдоровой поддержана базовым бюджетным проектом № 0324-2019-0042-С-01.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.03.2020. После доработки 11.05.2020. Принята к публикации 18.05.2020.