

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ГЛАЗА МУТАНТОВ ПО ГЕНУ *TRITHORAX-LIKE DROSOPHILA MELANOGASTER*

Н.В. Павлова, Д.А. Карагодин, С.И. Байборodin, Э.М. Баричева

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: npav@bionet.nsc.ru

Анализ структуры глаза новых мутантов по гену *Trithorax like (Trl) D. melanogaster* выявил широкий спектр нарушений. В частности, было обнаружено нарушение организации рядов омматидиев, дефекты в структуре омматидия (изменение количества фоторецепторов и конусных клеток), изменения ориентации омматидиев и количества клеток, окружающих омматидии (вторичных и третичных пигментных клеток и клеток, составляющих механо-сенсорные щетинки). Картина нарушений, наблюдаемых у *Trl*-мутантов, указывает на то, что транскрипционный фактор GAGA, кодируемый геном *Trl*, участвует в регуляции экспрессии ряда генов, необходимых для развития глаза дрозофилы.

Ключевые слова: дрозофила, развитие глаза, омматидий, *Trithorax like*, GAGA.

Введение

Глаз дрозофилы является удобной модельной системой, позволяющей проводить всесторонние исследования процессов клеточной дифференцировки, движения клеток, программируемой клеточной смерти (апоптоза), взаимодействия эволюционно-консервативных сигнальных путей, клеточной адгезии и регуляции организации цитоскелета. Нарушения в этих процессах приводят к изменению количества клеток глаза и/или к их неправильной организации, в результате чего поверхность глаза выглядит «грубой» (Cagan, 2009).

Сложный (фасеточный) глаз дрозофилы состоит приблизительно из 750 структурных единиц, называемых омматидиями. Каждый омматидий содержит 8 фоторецепторных нейронов – фотонейронов (R1–R8), 4 конусные клетки, секретирующие линзы и 2 первичные пигментные клетки. Вторичные и третичные пигментные клетки, обеспечивающие световую изоляцию, а также механо-сенсорные щетинки окружают омматидии, образуя сетчатую структуру с гексагональными ячейками. Расположенные в середине омматидия 8 фоторецепторных нейронов подразделяются на три функциональные группы: R1–R6, R7 и R8. Фо-

торецепторы каждого класса имеют различную спектральную восприимчивость, поскольку в них присутствуют разные фоточувствительные пигменты. Фотонейроны характеризуются наличием фоторецепторной структуры – рабдомера, который представляет собой примерно 60 тыс. светочувствительных микроворсинок, содержащих белок родопсин. Рабдомеры внешних фоторецепторов (R1–R6) образуют трапециевидную структуру вокруг внутренних рабдомеров (R7 и R8). Рабдомеры R1–R6 простираются на всю длину омматидия. Рабдомер фоторецептора R7 занимает центр верхней части омматидия, а рабдомер R8 – центральную позицию в нижней части омматидия. Над фоторецепторами располагается светопреломляющая часть омматидия, состоящая из заполненного жидкостью кристаллического конуса, который сверху ограничен корнеальной линзой, с боков двумя первичными пигментными клетками, и снизу четырьмя конусными клетками (Cagan, Ready, 1989; Wolff, Ready, 1993).

К настоящему времени хорошо изучена роль многих генов, участвующих в развитии глаза дрозофилы, в частности, определены и изучены ключевые гены, ответственные за дифференцировку клеток, входящих в омматидий (Voas, Rebay, 2004). Однако роль многих других генов

изучена слабо, хотя есть данные о том, что мутации этих генов приводят к нарушению структуры глаза (Call *et al.*, 2007). К числу таких генов относится ген *Trithorax-like (Trl) Drosophila melanogaster*, кодирующий многофункциональный белок GAGA. В одной из первых работ по исследованию гена *Trl* было отмечено, что гипоморфная мутация *Trl^{13C}* приводит к нарушению поверхности глаза мутантов (Farkas *et al.*, 1994). В дальнейшем было показано, что у *Trl*-мутантов наблюдаются дополнительные вторичные и третичные пигментные клетки, что связано с подавлением процесса апоптоза, в норме удаляющего избыток этих клеток. Анализ мозаичных клонов показал, что в омматидах, состоящих из клеток гомозиготных по нуль-аллелю *Trl^{81.1}*, в которых, по мнению авторов, отсутствует белок GAGA, наблюдаются изменения числа и формы первичных пигментных клеток, а также отсутствие некоторых щетинок, расположенных между омматидами (Dos-Santos *et al.*, 2008).

При исследовании влияния гена *Trl* на формирование глаза дрозофилы мы использовали не только ранее известных мутантов *Trl^{13C}*, но и набор новых, полученных нами мутантов по гену *Trl*, которые характеризуются снижением транскрипции гена. В результате нами был выявлен ряд ранее не отмеченных дефектов в структуре глаза *Trl*-мутантов. Так, было обнаружено нарушение организации параллельных рядов омматидиев, связанное с тем, что дополнительные омматидии вклиниваются между ними. Показано, что у *Trl*-мутантов отсутствует около 1/4 щетинок, расположенных в вершинах линз. В некоторых омматидах наблюдается отличное от нормы количество фоторецепторов и конусных клеток. Некоторые омматидии имеют отличную от нормы ориентацию.

Материалы и методы

Мутации *D. melanogaster*, используемые в работе. Мутация *Trl³⁶²* получена в лаборатории эволюционной биологии клетки ИЦиГ СО РАН (Огиенко и др., 2006); мутация *Trl^{en82}* получена в лаборатории молекулярной биологии Института фундаментальных исследований, г. Бомбей, Индия (Огиенко и др., 2008а); мутация *Trl^{R85}* – нуль-аллель гена и гипоморфная мутация *Trl^{13C}* любезно предоставлены

Ф. Каршем, (Женевский университет, Швейцария) (Farkas *et al.*, 1994), мутация *Trl³⁶⁰⁹* получена из Сегетского центра линий, Венгрия (Катохин и др., 2001), *Oregon R* – дикий тип, из фонда лаборатории эволюционной биологии клетки ИЦиГ СО РАН.

Нозерн-блот анализ. Суммарную РНК выделяли из глазо-антеннальных имагинальных дисков и мозго-вентральных ганглиев 0–4-часовых предкуколок с использованием реагента TRIzol (Gibco BRL, USA) согласно рекомендациям изготовителя. Нозерн-блот-гибридизацию проводили по ранее описанной методике (Burnett, 1997) с использованием [³²P]-меченых фрагментов генов *Trl* и *rpl19* в качестве зондов. Эти фрагменты были получены ПЦР с использованием праймеров *ex2_1ev* (5'-CAATTGTTGCGCTGCCATGG-3'), *ex5_2ev* (5'-GGCAAGTAGCAGGTTGTTTC-3') для гена *Trl* и *rpl19_1* (5'-AAGGTCTGGTTGGATCCCA-3'), *rpl19_2* (5'-ACAATATGGAGTTCCTCGACTAG-3') для гена *rpl19*. Интенсивности полученных сигналов измеряли с использованием фосфоимиджера Pharos FX Plus Molecular Imager (Bio-Rad Laboratories, USA), полученные данные анализировали с помощью программного пакета Quantity One v.4.6.5 (Bio-Rad).

Окрашивание глазо-антеннальных дисков с помощью фаллоидина. Перед окрашиванием глазо-антеннальные диски куколок (на стадии 42 часа после окукливания) изолировали в растворе PBS (1,7 мМ КН₂РO₄, 5,2 мМ NaH₂РO₄, 150 мМ NaCl, pH 7.0). Фиксацию и окрашивание дисков фаллоидином проводили по Гуилду с соавторами (Guild *et al.*, 1997). В работе использовали TRITC-фаллоидин (Sigma, США).

Приготовление полутонких срезов глаз дрозофилы. Головы мух разрезали сагитально, фиксировали в растворе 1 %-го глутаральдегида и 1 %-го параформальдегида в 1×PBS в течение 1 часа. После промывки в течение 5 мин в 1×PBS проводили постфиксацию в 1 %-м OsO₄ в 1×PBS в течение 1 часа. Затем образцы промывали водой и контрастировали в растворе 1 %-го уранил ацетата не менее 8 часов при 4 °С. Дегидратацию и пропитку образцов смолой Agar 100 проводили по стандартному протоколу. Полимеризацию проводили в термостате при 60 °С в течение двух суток. Срезы

толщиной 0,5 мкм получали с помощью стеклянного ножа на ультрамикротоме «Ultrascut» фирмы Reichert-Jung (Австрия). Для окраски срезов использовали 1 %-й раствор толудина синего в 1 %-м тетрагидроборате натрия.

Микроскопический анализ. Микроскопический анализ проводился в центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН на микроскопах Axioscope 2 plus и LSM 510 Meta (Zeiss) и в центре коллективного пользования ЦСБС СО РАН на сканирующем электронном микроскопе ТМ-1000 Tabletop (Hitachi). Обработка изображений проводилась с помощью программ Adobe Photoshop CS и Zeiss LSM Image Browser (Version 3.5).

Результаты и обсуждение

1. Анализ экспрессии гена *Trl* у мутантов.

Анализ экспрессии гена *Trl* в развивающемся глазе мух дикого типа и *Trl*-мутантов проводили методом Нозерн-блот-гибридизации. В норме в РНК, выделенной из глазо-антеннальных имагинальных дисков и мозго-вентральных ганглиев, отчетливо выявляются два транскрипта размером 2,5 и 3 т.н. У мутантов также выявляются два транскрипта с теми же размерами. Однако уровень экспрессии гена *Trl* у мутантов *Trl^{en82}/Trl^{R85}* и *Trl³⁶²/Trl^{R85}* составляет 42 % и 33 % от нормы соответственно (рис. 1).

Таким образом, используемые в данной работе мутанты характеризуются значительным снижением экспрессии гена *Trl* в глазо-антеннальных дисках и мозго-вентральных ганглиях.

2. Анализ поверхности глаза у *Trl*-мутантов. В данной работе с помощью сканирующего электронного микроскопа проведен анализ поверхности глаза *Trl*-мутантов. Поверхность глаза *D. melanogaster* состоит из линз, имеющих форму шестиугольника. В норме данная структура напоминает соты (рис. 2, а, д).

Длина горизонтальных сторон шестиугольника составляет 9 мкм, а скошенных – 11 мкм. Расположение линз можно представить в виде четко организованных вертикальных или горизонтальных рядов, наклоненных под разными углами. В трех вершинах каждой линзы располагается по одной механо-сенсорной щетинке. Таким

образом, каждая из щетинок является общей для трех оммагидиев (рис. 2, д). Следует отметить, что у мух дикого типа вокруг линз, располагающихся на самой кромке глаза, щетинки могут отсутствовать. В некоторых случаях щетинки могут отсутствовать и в вершинах других линз. Так, в линии *Oregon R* щетинки отсутствовали в 3,6 % вершин линз, расположенных не по краю глаза. Иногда это сопровождалось появлением щетинки в необычной позиции. Кроме этого, в некоторых случаях наблюдалось появление дополнительных щетинок. В результате в глазах мух дикого типа в среднем 1,3 % щетинок изменили локализацию.

Было установлено, что у *Trl*-мутантов встречаемость описанных выше дефектов значительно увеличивается, кроме того, выявляются и другие дефекты глаза. Во-первых, у всех проанализированных *Trl*-мутантов, *Trl^{en82}/Trl^{R85}*, *Trl³⁶²/Trl^{R85}* и *Trl³⁶⁰⁹/Trl^{13C}*, наблюдалось нарушение в организации рядов линз (рис. 2, е–з). Особенно часто такие нарушения встречаются

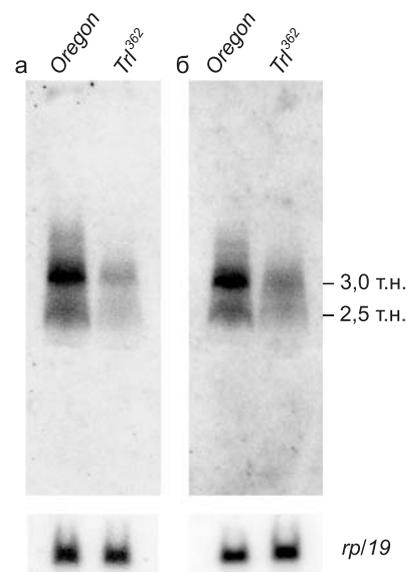


Рис. 1. Анализ транскрипции гена *Trl* у мутантов *Trl³⁶²* и *Trl^{en82}*.

Нозерн-блоты содержат суммарную РНК, выделенную из глазо-антеннальных имагинальных дисков и мозго-вентральных ганглиев 0–4-часовых предкуколок мутантов *Trl³⁶²/Trl^{R85}* (а), *Trl^{en82}/Trl^{R85}* (б) и мух дикого типа *Oregon R*. Выявляются два транскрипта размером 2,5 и 3 т.н. Суммарное количество транскриптов у мутантов *Trl³⁶²/Trl^{R85}* и *Trl^{en82}/Trl^{R85}* составляет 42 % и 33 % от нормы соответственно. Гибридизация с зондом к гену *rpl19* используется в качестве контроля нанесения.

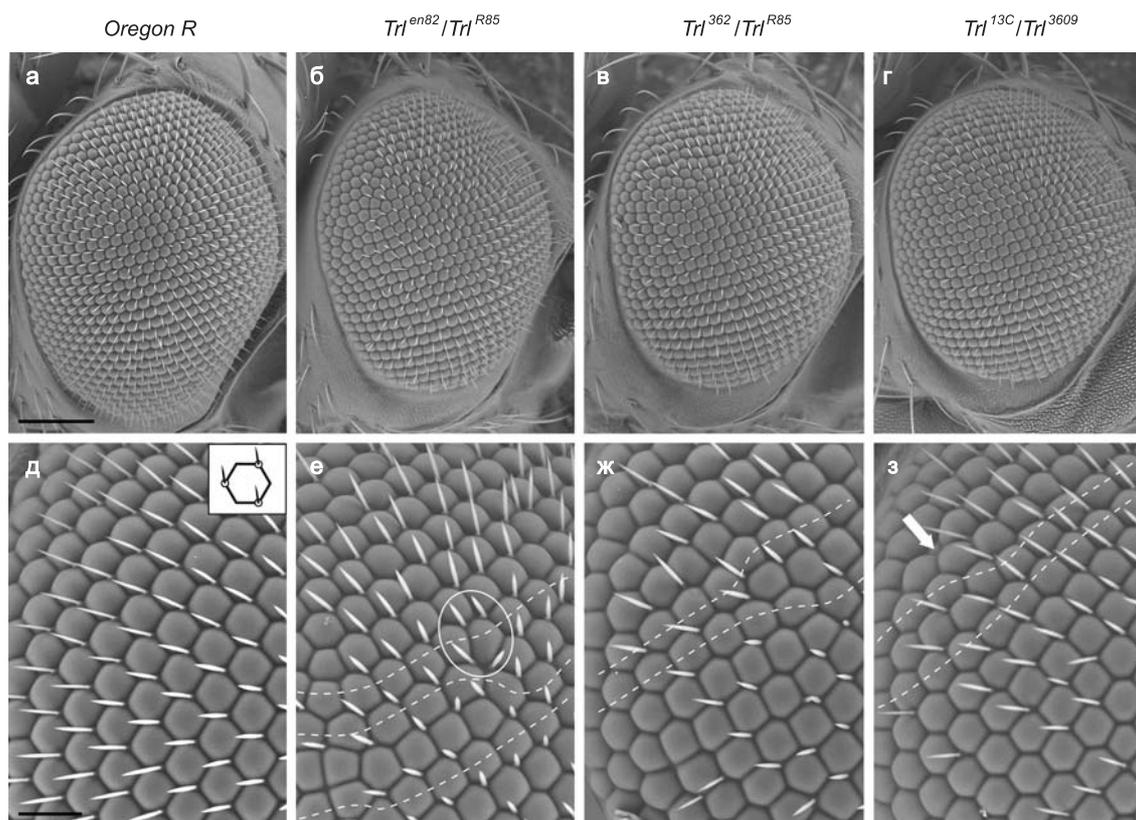


Рис. 2. Нарушения поверхности глаза имаго *Trl*-мутантов.

а, д – глаз мухи дикого типа; б, е – глаз мутанта *Trl^{en82}/Trl^{R85}*; в, ж – глаз мутанта *Trl³⁶²/Trl^{R85}*; г, з – глаз мутанта *Trl³⁶⁰⁹/Trl^{13C}*. Фотографии получены с помощью электронного сканирующего микроскопа. (а, д) В норме линзы располагаются ровными рядами. На схеме показано, что линза имеет форму шестиугольника, в трех вершинах которого располагаются щетинки. (е–з) Пунктиром отмечены ряды линз, между которыми вклиниваются дополнительные линзы. (е) Эллипсом отмечена линза, негексагональной формы и с отличным от нормы расположением щетинок. (з) Стрелкой указана несформировавшаяся линза. Масштаб: 100 мкм (а–г), 25 мкм (д–з).

на заднем крае глаза. Нарушение рядов линз может быть связано с появлением дополнительных линз, отсутствием линз или изменением их размера и формы. Следует отметить, что форма линз может быть изменена не только в дополнительных, но и в регулярных рядах. Во-вторых, было отмечено, что размер глаз у *Trl*-мутантов несколько меньше, чем у мух дикого типа. Количество линз (омматидиев) в глазах мутантов примерно на 80 меньше, чем у мух *Oregon R* (табл. 1).

Анализ поверхности глаза *Trl*-мутантов показал, что примерно 1/4 щетинок, располагающихся вокруг линз, отсутствует, т. е. отсутствие щетинок у мутантов наблюдается в 7 раз чаще, чем в контроле (табл. 1). В анализе не учитывались щетинки вокруг двух

рядов линз, находящихся на периферии глаза, поскольку данные щетинки часто отсутствуют в глазах мух дикого типа. Установлено, что доля щетинок с измененной локализацией у мутантов также выше, чем в контроле (табл. 1). Механо-сенсорная щетинка представляет собой сложное образование, берущее начало из клетки-основательницы. Эта клетка в результате двух делений дает 4 клетки, одна из которых превращается в сенсорный нейрон, вторая – в поддерживающую нейрон глиальную клетку, третья клетка секретирует стержень щетинки, а четвертая секретирует розеткоподобную структуру, ограничивающую снизу формирование стержня щетинки. (Cagan, Ready, 1989; Bodmer *et al.*, 1989). У *Trl*-мутантов в большинстве случаев отсутствия щетинки отсутствует и ро-

Таблица 1

Анализ поверхности глаза имаго *Trl*-мутантов

Нарушения	Генотип							
	<i>Trl³⁶²/Trl^{R85}</i>		<i>Trl^{en82}/Trl^{R85}</i>		<i>Trl^{13C}/Trl³⁶⁰⁹</i>		+/+	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Отсутствие щетинки	515	26,0 ± 1,0*	514	26,0 ± 1,0*	356	24,0 ± 1,0*	78	3,60 ± 0,2
Изменена локализация щетинки	83	4,20 ± 0,5*	69	3,4 ± 0,4*	86	5,7 ± 0,6*	29	1,3 ± 0,3
Просмотрено позиций локализации щетинок	1974	100,00	2006	100,00	1502	100,00	2167	100,00
Среднее число омматидиев в глазе	584		588		587		665	

* $P > 0,999$. Достоверность различий между частотами нарушений у мутантов и в контроле определялась с помощью критерия Фишера.

зеткоподобная структуры. Однако в некоторых позициях, в которых щетинки отсутствовали, розеткоподобная структура сохранялась, что никогда не наблюдалось в глазах мух дикого типа. Отсутствие щетинки или наличие только розеткоподобной структуры может быть связано с нарушением процессов деления клетки-основательницы. Ранее было показано, что у *Trl*-мутантов наблюдается нарушение митозов, в частности, было отмечено нарушение процесса сегрегации хромосом во время анафазы (Bhat *et al.*, 1996, Трунова и др., 2001; Огиенко и др., 2006). Аномальная сегрегация хромосом может приводить к нарушению функции, а возможно, и к гибели дочерних клеток. Это может быть причиной отсутствия у *Trl*-мутантов всех или некоторых клеток, формирующих механо-сенсорную щетинку.

Не исключено, что и нарушение регулярности в организации рядов омматидиев, наблюдаемое у *Trl*-мутантов, может быть также обусловлено нарушением процесса митоза. Однако хорошо известно, что в основе формирования рядов омматидиев лежит четкий временной и пространственный контроль запуска дифференцировки клеток-основательниц омматидиев-фотонейронов R8 (Roignant, Treisman, 2009). Не исключено, что белок GAGA, участвующий в регуляции экспрессии многих генов дрозофилы, регулирует и экспрессию генов, контролирующих своевременный запуск дифференцировки фотонейрона R8.

3. Анализ структуры омматидия у *Trl*-мутантов

3.1. Анализ полутонких срезов глаз имаго дрозофилы. Для детального анализа структуры омматидиев были использованы полутонкие срезы глаз дрозофил. В норме омматидии имеют форму правильного шестиугольника, между омматидиями видны гранулы пигментных клеток (рис. 3, а). В каждом омматидии наблюдаются 7 рабдомеров фоторецепторов: рабдомеры фоторецепторов R1–R6 образуют трапецевидную структуру, в центре которой располагается меньший по размеру рабдомер фоторецептора R7 или R8 (рис. 3, а) в зависимости от глубины среза, поскольку эти клетки лежат друг под другом. Аномалий в расположении и количестве рабдомеров у мух дикого типа выявлено не было.

При анализе полутонких срезов глаз *Trl*-мутантов были выявлены нарушения структуры омматидиев. У *Trl*-мутантов обнаружено нарушение количества рабдомеров. У мутантов *Trl³⁶²* и *Trl^{en82}* такие нарушения встречаются с частотой 2,0 % (в 22 из 1107 омматидиев, просмотрено 7 глаз) и 1,8 % (в 17 из 967 омматидиев, просмотрено 5 глаз) соответственно. Были отмечены омматидии с большим (8, 9), чем в норме, количеством внешних рабдомеров R1–R6 (рис. 3, б). Это свидетельствует о том, что в омматидии *Trl*-мутантов могут присутствовать дополнительные фоторецепторы, поскольку рабдомер является неотъемлемой частью этих клеток. Иногда

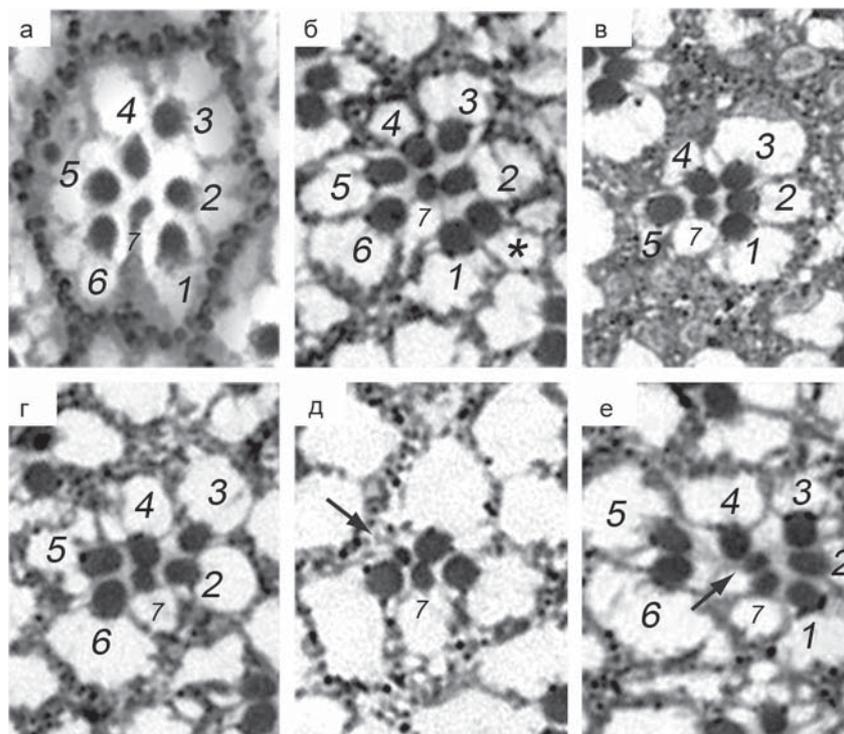


Рис. 3. Нарушения структуры омматидиев в глазах *Trl*-мутантов.

а – омматидий мухи дикого типа; б–е – омматидии *Trl*-мутантов. Цифрами 1–7 указаны фоторецепторы R1–R7 соответственно. б–д – изменено количество внешних фоторецепторов – R1–R7. б – наблюдается дополнительный внешний фоторецептор, указан звездочкой. д, е – появляется дополнительный внутренний фоторецептор R7, отмечен стрелкой.

встречаются омматидии с меньшим (3–6) числом внешних рабдомеров (рис. 3, в–д). Отсутствие рабдомера на срезе не всегда свидетельствует об отсутствии фоторецептора, поскольку рабдомер может быть прерывистым, как это наблюдается у мутантов по гену *zipper*, кодирующего тяжелую цепь немускульного миозина II (Baumann, 2004). Поэтому заключение об отсутствии фоторецепторов требует анализа нескольких срезов и констатации отсутствия не только рабдомера, но и тела фоторецептора. В некоторых омматидиях *Trl*-мутантов встречаются дополнительные рабдомеры, по размеру и расположению похожие на рабдомер R7 (рис. 3, д, е). На некоторых срезах рабдомер R7, напротив, не был выявлен. Однако этот рабдомер мог появляться на других срезах этого глаза, что может свидетельствовать или о прерывистости рабдомера R7, или, что кажется нам более вероятным, об увеличении расстояния между рабдомерами R7 и R8.

Следует отметить, что Н. Дос-Сантос и его коллеги не обнаружили изменения числа раб-

домеров на срезах глаз имаго гомозигот *Trl^{13C}* (Dos-Santos *et al.*, 2008). Однако данные нарушения встречаются у *Trl*-мутантов довольно редко. Авторы не приводят число проанализированных омматидиев, поэтому, возможно, размер их выборки был недостаточным для того, чтобы выявить данный дефект. Нарушение числа фотонейронов также не было обнаружено при анализе глазных дисков, содержащих клоны клеток, гомозиготных по нуль-аллелю *Trl^{81.1}*. С помощью иммунохимического окрашивания было показано, что в клонах омматидии содержат ядра всех 8 фоторецепторов (Dos-Santos *et al.*, 2008). Мы полагаем, что использование клонов *Trl^{81.1}/Trl^{81.1}* для анализа нарушений структуры омматидиев имеет ряд недостатков. Мутация *Trl^{81.1}*, полученная с помощью EMS (Greenberg, Schedl, 2001), слабо охарактеризована. В статьях, где используется эта мутация, нет данных о нарушениях экспрессии гена *Trl* или нарушениях в формировании белка GAGA у этих мутантов. Кроме того, не исключено,

что в клетках, гомозиготных по нуль-аллелю *Trl^{81.1}*, могут присутствовать продукты гена *Trl*, наработанные в предшественниках этих клеток до запуска FLP/FRT рекомбинации (на стадии второго личиночного возраста), приводящей к формированию гомозигот. Поскольку продукты гена *Trl* достаточно стабильны в течение длительного времени (Bhat *et al.*, 1996), то они, вероятно, могут в некотором количестве сохраняться в клетках *Trl^{81.1}/Trl^{81.1}* в период дифференцировки клеток глаза, т. е. с середины 3-й личиночной стадии до 23 часов после окукливания.

Таким образом, данные, полученные при анализе клонов *Trl^{81.1}*, не могут исключать влияние белка GAGA на дифференцировку фоторецепторов и других клеток, входящих в состав омматидия. Нарушение дифференци-

ровки может объяснять изменение количества фоторецепторов, наблюдаемое нами у мутантов *Trl³⁶²* и *Trl^{en82}*. Недостаток фоторецепторов может быть также связан с нарушениями в формировании рабдомеров. Известно, что такие нарушения приводят к деградации фотонейронов (Mollereau, Domingos, 2005).

Еще одним типом нарушения структуры омматидиев, обнаруженных у мутантов, является изменение их ориентации (рис. 4, в, г). Об ориентации омматидия судят по расположению структуры из рабдомеров. В норме структуру из рабдомеров можно представить в виде трапеции (рис. 3, а; 4, а, б). Две стороны, располагающиеся параллельно друг другу, содержат рабдомеры R1, R2, R3, и R5, R6. Третья сторона этой структуры содержит рабдомеры R3, R4, R5 и располагается под углом 45° относительно

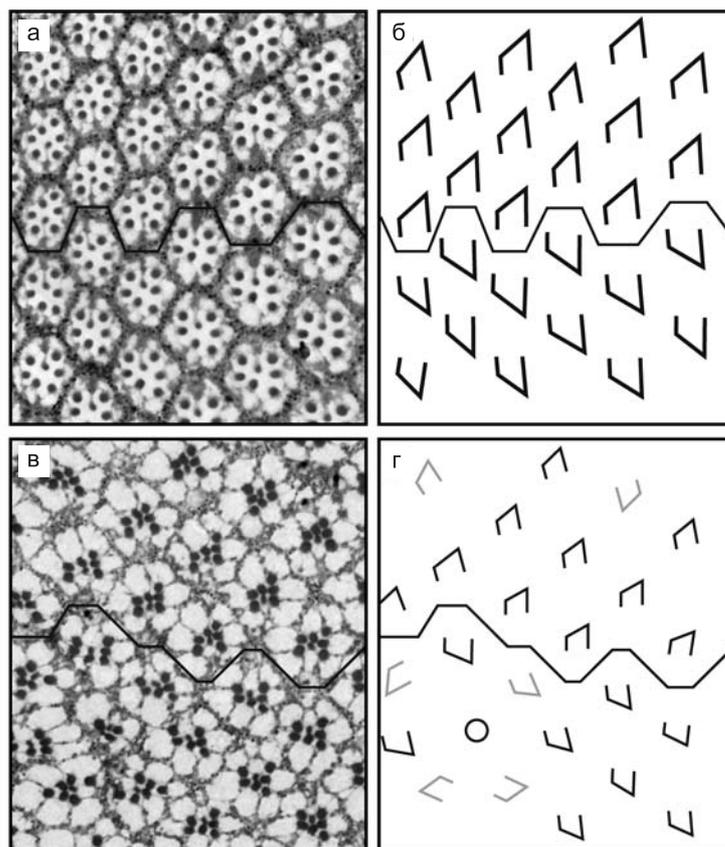


Рис. 4. Нарушение ориентации омматидиев в глазах *Trl*-мутантов.

а – срез глаза мухи дикого типа; в – срез глаза мутанта *Trl³⁶²/Trl^{R85}*; б, г – схемы, изображающие ориентацию омматидиев на срезах. Линией изображен экватор, относительно которого в дорзальной и вентральной частях глаза, омматидии располагаются зеркально. В норме трапециевидные структуры из рабдомеров располагаются под углом $90^\circ \pm 20^\circ$ к горизонтали, отмечены черным, (г). Трапециевидные структуры из рабдомеров отклоняются от нормального положения, отмечены серым. Кругом отмечен омматидий с нарушением числа рабдомеров.

R1, R2, R3. В норме омматидий ориентирован так, что рабдомеры R1, R2, R3, и R5, R6 располагаются практически перпендикулярно, т. е. под углом $90^\circ \pm 10^\circ$ к условной срединной линии – экватору глаза. Известно, что в процессе развития глаза в глазо-антеннальном диске клетки омматидиев претерпевают ротацию, в результате чего устанавливается описанная ориентация омматидия у взрослых мух. Омматидий претерпевает ротацию как единое целое, поэтому нарушение данного процесса приводит к тому, что стороны трапециевидной структуры из рабдомеров R1, R2, R3 и R5, R6 одинаково отклоняются от нормального положения. В норме отклонение не превышает 10° в омматидиях, располагающихся в центральной части глаза, и 20° в омматидиях, располагающихся ближе к периферии глаза (Reifegerste, Moses, 1999; Mirkovic, Mlodzik, 2006).

У мутантов *Trl*³⁶² в 11 % (18 омматидиях из 1006) омматидиев такое отклонение составляло более 20° . В крайних случаях угол расположения трапециевидной структуры из рабдомеров относительно горизонтали составлял 53° и 167° . Данные нарушения встречались и у мутантов *Trl*^{en82}. Изменение угла расположения трапециевидной структуры обусловлено нарушением процесса ротации (Mirkovic, Mlodzik,

2006). Известно, что в ротации омматидиев участвуют гены, контролирующие миграцию клеток, в частности миграцию бордюрных клеток яйцевой камеры дрозофилы (Bastock, Strutt, 2007). Существуют данные, что у *Trl*-мутантов нарушена миграция бордюрных клеток (Огиенко и др. 2008б).

При анализе срезов глаз *Trl*-мутантов мы также наблюдали нарушение четкости рядов омматидиев, что согласуется с нарушением рядов линз, наблюдаемым нами при анализе поверхности глаз этих мутантов.

3.2. Анализ глазо-антеннальных имагинальных дисков *Trl* мутантов. Для изучения структуры и распределения пигментных и конусных клеток у *Trl*-мутантов мы анализировали глазо-антеннальные имагинальные диски 42-часовых куколок (развивающихся при 25°C) с помощью конфокального микроскопа. К этому моменту все клетки глаза дрозофилы занимают свои окончательные позиции (Cagan, Ready, 1989). Глазо-антеннальные диски окрашивались фаллоидином, выявляющим актиновые филаменты, что позволяло визуализировать границы клеток омматидия. В норме на оптических срезах, проходящих через вершину омматидия, выявляются две первичные пигментные клетки и четыре конусные клетки (рис. 5, а–в).

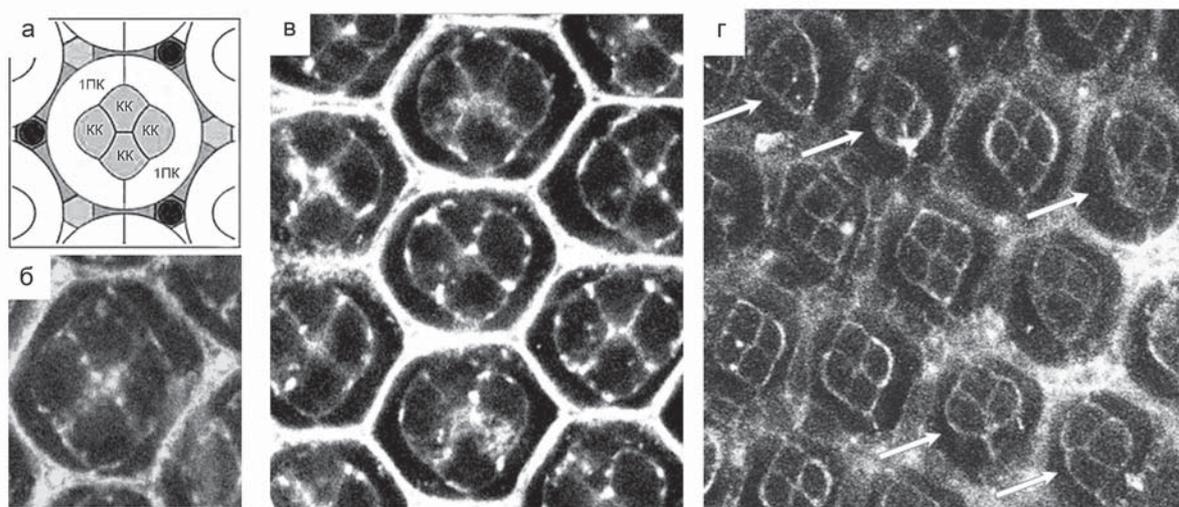


Рис. 5. Анализ оптических срезов глазо-антеннальных дисков куколок *Trl*-мутантов (42 часа после окуливания), проходящих через вершину омматидиев.

а – схема расположения клеток в вершине омматидия, отмечены первичные пигментные клетки (1ПК) и конусные клетки (КК); б, в – омматидии мух дикого типа Oregon R; г – омматидии мутантов *Trl*^{en82}/*Trl*^{R85}, стрелками показаны омматидии с нарушенным числом КК.

У мутантов *Trl³⁶²* и *Trl^{en82}* форма и число первичных пигментных клеток не отличаются от нормы. Однако число конусных клеток у *Trl*-мутантов может быть уменьшено по сравнению с нормой (рис. 4, г).

На оптическом срезе, проходящем через основание омматидия, в норме выявляются три щетинки. Напротив каждой щетинки располагается третичная пигментная клетка, между ними находятся 6 вторичных пигментных клеток (рис. 6, а). У мутантов *Trl³⁶²* и *Trl^{en82}* в некоторых омматидиях встречаются дополнительные вторичные пигментные клетки (рис. 6, в), кроме этого, иногда в омматидиях на месте одной из щетинок располагается третичная пигментная клетка (рис. 6, б). Следует отметить, что такое замещение иногда наблюдается на краю диска мух линии *Oregon R*. У *Trl*-мутантов встречается также и обратная ситуация, когда на месте третичной пигментной клетки располагается щетинка.

Наши результаты подтверждают данные Н. Дос-Сантоса и его коллег о появлении допол-

нительных вторичных и третичных пигментных клеток у *Trl*-мутантов. По мнению авторов, появление этих клеток связано с нарушением апоптоза у *Trl*-мутантов, в результате которого в норме удаляется избыток вторичных и третичных пигментных клеток (Dos-Santos *et al.*, 2008).

Проведенные нами исследования подтвердили полученные ранее данные о появлении дополнительных пигментных клеток у мутантов по гену *Trl*. Кроме того, мы выявили ряд новых дефектов в структуре глаза *Trl*-мутантов. В глазах мутантов наблюдается появление дополнительных рядов омматидиев, в некоторых омматидиях нарушено количество фоторецепторов и конусных клеток, исчезает примерно 1/4 щетинок, окружающих омматидий. Кроме того, у *Trl*-мутантов наблюдается изменение ориентации трапецевидной структуры из рабдомеров. Широкий спектр нарушений, наблюдаемый у *Trl*-мутантов, указывает на то, что белок GAGA участвует в регуляции экспрессии генов, задействованных в ряде процессов, определяющих

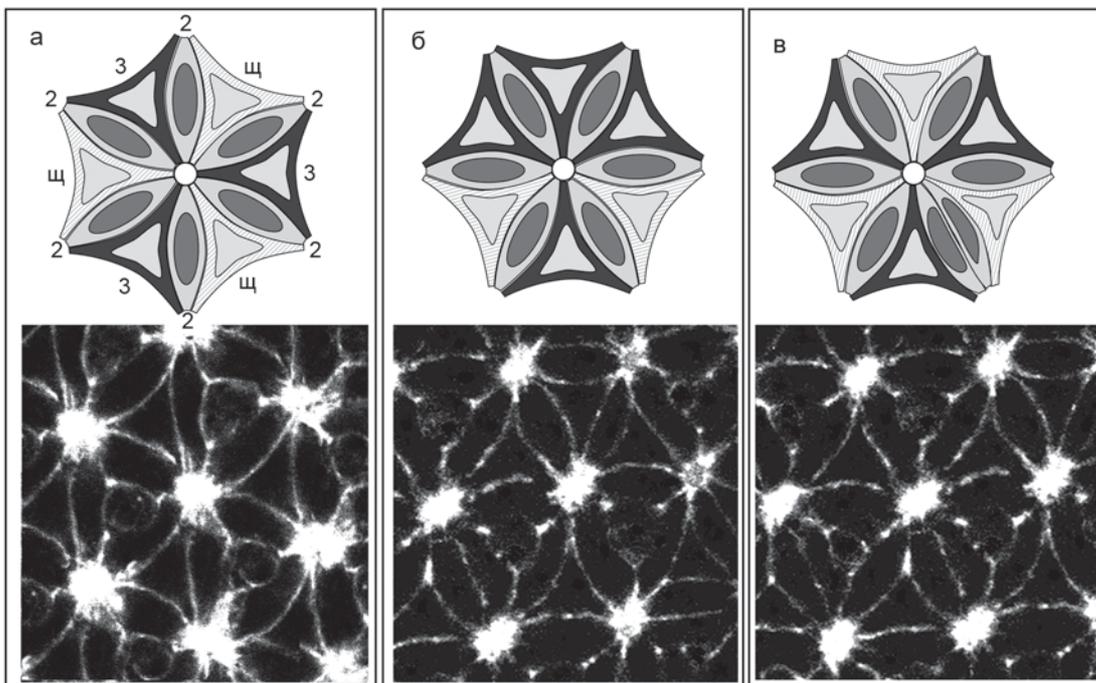


Рис. 6. Анализ оптических срезов глазо-антеннального диска куколок *Trl*-мутантов (42 часа после окукливания), проходящих через основание омматидия.

а – основание омматидия мухи дикого типа; б, в – основания омматидиев мутантов *Trl^{en82}/Trl^{R85}*. На схемах: 2 – вторичная пигментная клетка (ПК), 3 – третичная ПК, Щ – щетинка. б – на месте одной из щетинок располагается третичная ПК; в – наблюдается дополнительная вторичная ПК.

развитие глаза. К числу таких генов можно отнести ген *lozenge* (*lz*) (Daga *et al.*, 1996) и комплекс генов *Bar* (*BarH1* и *BarH2*) (Higashijima *et al.*, 1992). Транскрипционный фактор *Lozenge* участвует как в дифференцировке клеток глаза (Daga *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2000), так и в регуляции процесса запрограммированной клеточной смерти, происходящего в развитии глаза (Wildonger *et al.*, 2005). Транскрипционные факторы *BarH1* и *BarH2* участвуют как в дифференцировке фоторецепторов R1 и R6 (Higashijima *et al.*, 1992), так и во временном и пространственном контроле запуска дифференцировки фотонейронов R8 (клеток-основательниц омматидиев) (Lim, Choi, 2003).

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-01011.

Литература

- Катохин А.В., Пиндюрин А.В., Федорова Е.В. и др. Молекулярно-генетический анализ гена *Trithorax-like*, кодирующего транскрипционный фактор GAGA *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2001. V. 37. № 4. С. 467–474.
- Огиенко А.А., Карагодин Д.А., Павлова Н.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика новой гипоморфной мутации гена *Trithorax-like* и анализ ее влияния на оогенез *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2008а. V. 39. № 2. С. 134–142.
- Огиенко А.А., Карагодин Д.А., Федорова С.А. и др. Влияние гипоморфной мутации гена *Trithorax-like* на оогенез *Drosophila melanogaster* // Онтогенез. 2006. V. 37. № 3. С. 211–220.
- Огиенко А.А., Лаухина О.В., Васильев Г.В. и др. Нарушение функционирования соматических клеток в яйцевых камерах *Drosophila melanogaster* у мутантов по гену *Trithorax-like* // Информ. вестник ВОГиС. 2008б. Т. 12. № 3. С. 399–405.
- Трунова С.А., Федорова С.А., Лебедева Л.И. и др. Влияние некоторых мутаций по гену *Trl* на митоз в эмбриональной и личиночной тканях и морфологию яйцевых камер у *Drosophila melanogaster* // Генетика. 2001. Т. 37. № 12. С. 1604–1615.
- Bastock R., Strutt D. The planar polarity pathway promotes coordinated cell migration during *Drosophila* oogenesis // Development. 2007. V. 134. P. 3055–3064.
- Baumann O. Spatial pattern of nonmuscle myosin-II distribution during the development of the *Drosophila* compound eye and implications for retinal morphogenesis // Dev. Biol. 2004. V. 269. P. 519–533.
- Bhat K.M., Farkas G., Karch F. *et al.* The GAGA factor is required in the early *Drosophila* embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division // Development. 1996. V. 122. № 4. P. 1113–1124.
- Bodmer R., Carretto R., Jan Y.N. Neurogenesis of the peripheral nervous system in *Drosophila* embryos: DNA replication patterns and cell lineages // Neuron. 1989. V. 3. P. 21–32.
- Burnett W.V. Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation // BioTechniques. 1997. V. 22. P. 668–671.
- Cagan R. Principles of *Drosophila* eye differentiation // Curr. Top. Dev. Biol. 2009. V. 89. P. 115–135.
- Cagan R.L., Ready D.F. The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina // Dev. Biol. 1989. V. 136. № 2. P. 346–362.
- Call G.B., Olson J. M., Chen J. *et al.* Genomewide clonal analysis of lethal mutations in the *Drosophila melanogaster* eye: comparison of the X chromosome and autosomes // Genetics. 2007. V. 177. № 2. P. 689–697.
- Daga A., Karlovich C.A., Dumstrei K. *et al.* Patterning of cells in the *Drosophila* eye by *Lozenge*, which shares homologous domains with AML1 // Genes Dev. 1996. V. 10. № 10. P. 1194–1205.
- Dos-Santos N., Rubin T., Chalvet F. *et al.* *Drosophila* retinal pigment cell death is regulated in a position-dependent manner by a cell memory gene // Int. J. Dev. Biol. 2008. V. 52. № 1. P. 21–31.
- Farkas G., Gausz J., Galloni M. *et al.* The *Trithorax-like* gene encodes the *Drosophila* GAGA factor // Nature. 1994. V. 371. № 6500. P. 806–808.
- Flores G.V., Duan H., Yan H. *et al.* Combinatorial signaling in the specification of unique cell fates // Cell. 2000. V. 103. № 1. P. 75–85.
- Greenberg A.J., Schedl P. GAGA factor isoforms have distinct but overlapping functions *in vivo* // Mol. Cell Biol. 2001. V. 21. № 24. P. 8565–8574.
- Guild G.M., Connelly P.S., Shaw M.K. *et al.* Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping // J. Cell Biol. 1997. V. 138. № 4. P. 783–797.
- Higashijima S., Kojima T., Michiue T. *et al.* Dual *Bar* homeo box genes of *Drosophila* required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development // Genes Dev. 1992. V. 6. № 1. P. 50–60.
- Lim J., Choi K.W. *Bar* homeodomain proteins are anti-proneural in the *Drosophila* eye: transcriptional repression of *atonal* by *Bar* prevents ectopic retinal neurogenesis // Development. 2003. V. 130. № 24. P. 5965–5974.
- Mirkovic I., Mlodzik M. Cooperative activities of *Drosophila* DE-cadherin and DN-cadherin regulate the cell motility process of ommatidial rotation //

- Development. 2006. V. 133. № 17. P. 3283–3293.
- Mollereau B., Domingos P.M. Photoreceptor differentiation in *Drosophila*: from immature neurons to functional photoreceptors // Dev. Dyn. 2005. V. 232. № 3. P. 585–592.
- Reifegerste R., Moses K. The genetics of epithelial polarity and pattern in the *Drosophila* retina // BioEssays. 1999. V. 21. P. 275–285.
- Roignant J.Y., Treisman J.E. Pattern formation in the *Drosophila* eye disc // Int. J. Dev. Biol. 2009. V. 53. № 5/6. P. 795–804.
- Voas M.G., Rebay I. Signal integration during development: insights from the *Drosophila* eye // Dev. Dyn. 2004. V. 229. № 1. P. 162–175.
- Wildonger J., Sosinsky A., Honig B. *et al.* Lozenge directly activates *argos* and *klumpfuss* to regulate programmed cell death // Genes Dev. 2005. V. 19. № 9. P. 1034–1039.
- Wolff T., Ready D.F. Pattern formation in the *Drosophila* retina // The Development of *Drosophila melanogaster*. M.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. C. 1277–1325.

ANALYSIS OF EYE STRUCTURE IN *TRITHORAX-LIKE* *DROSOPHILA MELANOGASTER* MUTANTS

N.V. Pavlova, D.A. Karagodin, S.I. Bayborodin, E.M. Baricheva

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

Summary

Analysis of the *Drosophila* eye structure in new *Trithorax-like* (*Trl*) mutants revealed a wide range of abnormalities. In particular, the arrangement of ommatidium rows, the ommatidium structure (numbers of photoreceptors and cone cells), ommatidial orientation and number of interommatidial cells (secondary and tertiary pigment cells and cells of mechanosensory bristles) were affected. These numerous defects in eyes of *Trl* mutants indicate that transcription factor GAGA, encoded by the *Trl* gene, is involved in the regulation of several genes essential for *Drosophila* eye development.

Key words: *Drosophila*, eye development, ommatidia, *Trithorax-like*, GAGA.