

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ ЭКТОПИЧЕСКОГО ГЛАЗА НА КРЫЛЕ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Эктопические глаза могут формироваться в различных органах Drosophila melanogaster с помощью экспрессии мастер-гена ey в системе GAL4-UAS. Индукция эктопических глаз наблюдается в определенных участках имагинальных дисков, которые частично совпадают с зонами, где происходит трансдетерминация дифференцированных клеток, т.е. процесс изменения клеточной судьбы. Это позволяет рассматривать систему индукции эктопических глаз как модель для изучения клеточной пластичности. В работе проведен поиск трансгенов, совместная эктопическая экспрессия которых с мастер-геном ey вызывает изменение морфологии эктопических глаз на крыле по сравнению со случаем эктопической экспрессии только ey. Большинство трансгенов, модифицирующих размер эктопических глаз, относятся к классу генов везикулярного трафика, которые изменяют активность различных сигнальных путей. Все эти трансгены сами по себе при эктопической экспрессии в крыловом и глазном дисках изменяют морфологию нормального крыла и нормального глаза (или обоих сразу). Очевидно, что действие этих генов состоит в изменении размера области, в которой происходят события изменения клеточной судьбы.

Ключевые слова: генетический модификатор, эктопические глаза, трансген, трансдетерминация, клеточная пластичность.

Введение. Клетки раннего эмбриона плюрипотентны, по мере развития они становятся детерминированными к образованию определенной ткани и теряют потенциальную возможность стать клетками другой ткани. Процесс последовательной детерминации клеточной судьбы не является необратимым и может быть нарушен при некоторых экспериментальных воздействиях. Способность клеток изменять свою судьбу, несмотря на предшествующую детерминацию, называют клеточной пластичностью. Удобным модельным объектом для изучения феномена клеточной пластичности являются имагинальные диски *Drosophila* — предшественники конечностей и других структур

взрослой мухи. Диски начинают детерминироваться в процессе эмбриогенеза, окончательно устанавливая свою судьбу в личиночном развитии и в ответ на действие гормональных сигналов подвергаются конечной дифференцировке [1]. Морфологическая дифференцировка клеток имагинальных дисков происходит после метаморфоза личинки, что дает возможность отделить детерминированное состояние клеток от дифференцированного в экспериментах по трансплантации. При переносе имагинального диска личинки в брюшную полость взрослой самки состояние детерминированности сохраняется, а дифференцировка не наступает вследствие отсутствия необходимых для этого гормонов. В то же время дифференцировку можно искусственно вызвать (и тем самым выявить состояние детерминации к образованию того или иного органа) при пересадке имагинального диска в личинку. После метаморфоза личинки трансплантированная часть диска дифференцируется, что позволяет отнести трансплантат к той или иной ткани [2]. В экспериментах по культивированию регенерирующих фрагментов имагинального диска выявлено, что в особых точках имагинального диска, так называемых weak-points, может происходить изменение детерминированного состояния клеток — трансдетерминация [3].

Некоторые данные свидетельствуют о том, что трансдетерминация связана с пролиферацией и приурочена к формированию бластемы — группы пространственно сближенных и интенсивно пролиферирующих клеток [4]. Установлено, что пролиферация клеток бластемы управляется JNK (c-Jun NH(2)-terminal kinase) сигналингом [5]. Анализ клеточного цикла клеток бластемы при регенерации и трансдетерминации показал, что только в последнем случае изменяется структура цикла — удлиняется S-фаза, что не характерно для нор-

мальных клеток диска на какой-либо стадии развития [6]. Это подтверждает результаты более ранних исследований, показавших отсутствие реювенилизации клеток бластемы как при регенерации, так и при трансдетерминации [7, 8]. Имеются указания на то, что в клетках бластемы компартментная идентичность не является стабильной [9] и граница компартментов может образовываться *de novo* [10].

Установлено, что экспрессия Wingless в мозаичных клонах личинок 3-го личиночного возраста приводит к событиям, сходным с трансдетерминацией, наблюдаемой при фрагментации дисков [6]. Трансдетерминация клеток 1-й ноги в крыло в слабой точке трансдетерминации может быть индуцирована под действием эктопической экспрессии *Wg* и детектирована с помощью крылоспецифических анти-*Wg* антител. Комбинация *wg-GAL4* и *UAS-GFP* позволяет физически отделить трансдетерминированные клетки и проводить для них полногеномный анализ профиля экспрессии генов [11].

В более ранних работах показано, что оверэкспрессия гена *ey* в различных тканях с помощью системы *GAL-UAS* приводит к формированию эктопических глаз [12]. Результаты ряда работ свидетельствуют о том, что при необходимом уровне экспрессии трансгенов, содержащих *retinal determination network* (*toy*, *ey*, *eya*, *so*, *dac*, *optix*, *tsh*), эктопические глаза могут образовываться в любой ткани [13–18]. Однако в более поздней работе установлено, что индукция эктопических глаз может происходить только в определенных участках имагинальных дисков [19]. Некоторые из этих участков совпадают со слабыми точками, выявляемыми в экспериментах по трансдетерминации. Это позволяет рассматривать систему индукции эктопических глаз как модель изменения клеточной детерминации. Удобство системы заключается в том, что эктопические глаза индуцируются в определенном участке имагинального диска, что позволяет иметь более строгий тканевый контекст этих событий по сравнению с системой эктопической индукции морфогена *Wg*. Настоящая работа посвящена общей характеристике предлагаемого генетического скрининга и выявлению классов генов, влияющих на образование эктопического глаза на крыле дрозофилы.

Материалы и методы. Линии $w^{1118} P\{w^{+m}W.hs = GawB\}Bx^{MS1096}$ (*1096-GAL4* крыловой драйвер) и $y^1 w^*$; $P\{w^{+mC} = UAS-ey.H\}UE11$ (конструкт, индуцирующий эктопические глаза) получены из Bloomington Drosophila Stock Center. Драйвер активен на личиночной и куколичной стадии в почке крыла [20, 21]. Структурные формулы линий, среди которых проводился скрининг (*UAS*-конструкты, *EP*-инсерции, *PHKi*-конструкты, оставшиеся в лабораторном фонде после выполнения предыдущих проектов), перечислены в таблице, где также указан их источник и эффекты в различных тестовых скрещиваниях. Линия с глазным драйвером *w*; $P\{w^{+mC} = GAL4-ey.H\}$ получена от Dr. F. Karch (Univ., Geneva). Процедура скрининга состояла в том, что самок у *w 1096-GAL4/+; UAS-ey/+* скрещивали с самцами, содержащими *UAS*-конструкт, *EP*-элемент или *UAS-RNAi*-конструкт гена-респондера (условно *U-rsp*). Среди потомков этого скрещивания образуются особи, содержащие одновременно драйвер *1096-GAL4* и конструкты *UAS-ey* и *U-rsp* в гетерозиготном состоянии. Просматривая особей этого класса, визуально устанавливали, влияет ли *U-rsp* на локализацию и морфологию эктопических глаз на крыле в сравнении с контролем у *w 1096-GAL4/+; UAS-ey/+*. Поскольку в таком скрещивании появляются особи у *w 1096-GAL4; U-rsp/+*, то отмечали изменения, которые упомянутый ген-респондер вызывает в крыле при индукции драйвером *1096-GAL4*. У личинок этого генотипа исследовали паттерн экспрессии *Wg* в крыловом имагинальном диске. Конструкцию *U-rsp* испытывали также на способность изменять морфологию нормального глаза под действием драйверов *ey-GAL4*.

Имагинальные диски извлекали из тела личинок 3-го возраста и фиксировали в 3,7%-ном формальдегиде, приготовленном на буфере PBS pH 7,2. После трехкратной промывки в PBS (10 мин) ткань 30 мин обрабатывали 1 % Triton-X100, приготовленным на PBS, затем в течение 1 ч блокирующим раствором, содержащим 1 % сухого молока (на PBS). Далее проводили связывание с крысиными антителами anti-Elav (1:200 dilution Hybridoma Bank) или мышинными anti-*Wg* (1:10, Hybridoma Bank) в течение ночи. Обработанные таким образом диски отмывали в PBT (0,05 % of Tween-20

Список трансгенов и их фенотипические эффекты на формирование эктопического глаза в системе *1096-GAL4; UAS-ey*, нормального крыла (драйвер *1096-GAL4*) и нормального глаза (драйвер *ey-GAL4*)

| Класс генов и генетическая формула | <i>1096-GAL4; UAS-ey</i> | <i>1096-GAL4</i> | <i>ey-GAL4</i> |
|--|--------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Гены клеточного цикла | | | |
| w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-CycE.L\}ML1$ (B) ¹ | — | — | |
| $y^1 v^1$; $P\{y^{+t7.7} v^{+t1.8}=TRiP.JF02828\}attP2$ RNAi of <i>E2f2</i> (B) | — | — | |
| w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-Cdk1-myc\}II.2$ (B) | — | — | |
| w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-Cdk2-myc\}II.1$; <i>Sb¹/TM3, Ser¹</i> (B) | — | — | |
| w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-CycB3.W\}II.1$ (B) | — | — | |
| w^{1118} ; $P\{w^{+mC}=UAS-stg.N\}4$ (B) | — | — | |
| w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-dia.CA\}3$ HA-tagged <i>dia</i> (B) | + (куколка) | Редукция крыла у куколок | Нерегулярные фасетки |
| $y^1 v^1$; $P\{y^{+t7.7} v^{+t1.8}=TRiP.JF02701\}attP2$ <i>Klp67A</i> (B) | — | — | |
| $y^1 w^{1118}$; $P\{w^{+mC}=UAS-BubR1.DN\}3$ (B) | — | — | |
| Гены-супрессоры опухолей | | | |
| $y^1 v^1$; $P\{y^{+t7.7} v^{+t1.8}=TRiP.JF02619\}attP2$ RNAi- <i>l(2)gdl</i> (B) | — | — | |
| w^{1118} ; $P\{GD8432\}v38821$ <i>Vps25^{GD8432}</i> (B) | — | — | |
| w^{1118} ; $P\{GD14295\}v23944/CyO$ <i>TSG101^{GD14295}</i> (B) | — | — | |
| w^{1118} ; $P\{GD1563\}v9928$ <i>wis^{GD1563}</i> (V) | — | — | |
| w^{1118} ; $P\{GD1570\}v7823$ RNAi of <i>Hippo</i> (V) | — | — | |
| w^{1118} ; $P\{GD4047\}v51247$ <i>Lgl-RNAi</i> (V) | +/- | Дефект жилкования | |
| w^{1118} ; $P\{GD881\}v9396$ <i>Fat-RNAi</i> (V) | — | Широкое крыло | |
| w^{1118} ; $P\{GD1484\}v7161$ <i>Mer-RNAi</i> (V) | — | Искажение морфологии крыла | |
| w^{1118} ; $P\{GD14227\}v44675$ RNAi- <i>Hyd</i> (V) | — | Дефект жилкования | |
| Гены, работающие на хроматине | | | |
| w^{1118} ; $P\{GD1467\}v24505$ <i>Acf A-RNAi</i> (V) | — | Слабый дефект жилкования | |
| w^{1118} ; $P\{GD11258\}v26456/TM$ <i>CAF1-RNAi</i> (V) | — | Искажение морфологии крыла | |
| w^{1118} ; $P\{UAS-asf1.M\}/CyO$ <i>UAS-Asf1</i> (<i>Y. Moshkin</i>) | — | То же | |
| $y^1 v^1$; $P\{y[+t7.7] v^{+t1.8}=TRiP.JF01207\}attP2$ <i>osa-RNAi</i> (T) | Морфология изменена | Дефект жилкования | Редукция глаза |
| $y^1 w^{67c23}$; $P\{w^{+mC} y^{+mDint2}=EPgy2\}TrlEY04024$ <i>Trl-RNAi</i> (B) | — | | |
| $y^1 w^{67c23}$; $P\{w^{+mC} y^{+mDint2}=EPgy2\}trxEY12356/TM3, Sb1 Ser1$ <i>trx-RNAi</i> (B) | — | | |
| Гены везикулярного трафика | | | |
| $y^1 v^1$; $P\{y^{+t7.7} v^{+t1.8}=TRiP.JF02561\}attP2$ RNAi of <i>dnc</i> (B) | — | — | |
| $y^1 v^1$; $P\{y^{+t7.7} v^{+t1.8}=TRiP.JF02038\}attP2/TM3, Sb1$ RNAi of <i>Syx8</i> (B) | — | | |
| $y w$ $P\{w^{+mC}=UAS-Hrs\}18$ (<i>III</i>) (<i>H. Bellen</i>) | + | | |
| <i>UAS-Rab 7.Q67L</i> (<i>M.A. Gonzalez-Gaitan</i>) | + | Редукция крыла | Редукция глаза, дубликации антенн |
| <i>UAS-Csp2</i> (<i>Szeged</i>) | + | То же | То же |
| $y^1 w^{67c23}$; $P\{w^{+mC} y^{+mDint2}=EPgy2\}lap[EY11719]$ $P\{EPgy2\}EY11719$ (B) | — | | |
| $P\{EP\}AP-47[EP1112]$ $P\{EP\}AP-47[EP3436]$ (B) | — | | |
| $P\{EP\}alpha-Adaptin[EP2519]$ $P\{EP\} alpha-Adaptin[EP896]$ (B) | — | | |

| Класс генов и генетическая формула | 1096-GAL4; UAS-ey | 1096-GAL4 | ey-GAL4 |
|---|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Разные гены | | | |
| $y^l y^l; P\{y^{+17.7} v^{+11.8} = TRiP.JF02311\}attP2 ap-RNAi$ (B) | — | | |
| $w^{1118}; P\{w^{+mC} = EP\}CG5899[EP701]$ (B) | — | | |
| $y^l y^l; P\{y^{+17.7} v^{+11.8} = TRiP.JF02018\}attP2 RNAi$ of SoxN (B) | — | — | |
| $y^l y^l; P\{y^{+17.7} v^{+11.8} = TRiP.JF02119\}attP2 RNAi$ of Sox14 (B) | — | — | |
| $w^{1118}; P\{GD117\}v1016 RNAi$ of Tor (V) | +/- | — | |
| $w^{1118}; P\{GD1334\}v7748/TM Axin-RNAi$ (V) | — | — | |
| $w^{1118}; P\{GD14101\}v26998 iw-RNAi$ (V) | — | Дефект жилкования | |
| $w^{1118}; P\{GD1515\}v3018 Puc-RNAi$ (JNK-signalling) (V) | — | — | |
| $w^{1118}; P\{GD1493\}v101517Msn-RNAi$ (JNK-signalling) (V) | — | Дефект жилкования | |
| $y^l y^l; P\{y^{+17.7} v^{+11.8} = TRiP.HM05061\}attP2 upd3-RNAi$ (B) | — | — | |
| $w^{1118}; P\{GD1158\}v3282 RNAi-Upd$ (V) | — | — | |
| $P\{UAS-os.Z\} UAS-Upd$ (E. Matunis) | + | Редукция крыла, дефект жилкования | Редукция глаза, дупликации пальп |

Примечание. В скобках — источник линии: B — Blomington Drosophila Stock Center, V — Vienna Drosophila RNAi Center, T — Trangenic RNAi Stock Collection или указана фамилия автора, любезно предоставившего линию. Фенотип эктопических глаз по сравнению с контролем: «+» — увеличение эктопического глаза; «+/-» — слабое увеличение эктопического глаза; «-» — нет фенотипического эффекта.

in PBS) в течение 10 мин три раза и затем инкубировали со вторичными антителами [Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:400 dilution; Molecular Probe) или Rhodamine-conjugated антикрысиные антитела козла IgG (1:200; Abcam)] при 37 °C в течение 1 ч. Окрашенные диски промывали в PBS и заключали в Mowiol, содержащий 10 % DABCO («Sigma», США). Цитологический анализ проводили на микроскопах Axiovert-200 или Axioskop-2 («Carl Zeiss», Германия).

Результаты исследований. Эктопическая экспрессия гена *ey* в крыловом имагинальном дис-



Рис. 1. Эктопические глаза у мух *1096-GAL4; UAS-ey* на дорсальной и вентральной сторонах крыла (a) и две группы фоторецепторов, выявляемых антителами на Elav, соответствующих потенциальным клеткам эктопического глаза (б)

ке под действием драйвера *1096-GAL4* приводит к тому, что часть клеток крылового имагинального диска меняют свою судьбу и становятся клетками глаза. Эктопические глаза индуцируются в определенных участках крылового диска и формируют стабильный паттерн на крыле взрослой мухи (рис. 1). Мы использовали эту систему для скрининга генов, активность которых способна модифицировать процесс формирования эктопических глаз, т.е. изменять состояние детерминации клеток крыла, возникающее под воздействием эктопической экспрессии *ey*.

В таблице дано описание эффектов исследованных конструкций на морфологию эктопического глаза, а также фенотипы крыла и глаз, образующихся при эктопической экспрессии каждого конструкта соответствующими драйверами. На рис. 2 представлены некоторые из этих фенотипов. Среди генов, продукты которых функционируют на хроматине, эффект на морфологию эктопического глаза обнаружен только в случае RNAi конструкции гена *osa*. Среди генов опухолевых супрессоров не было найдено генов, изменяющих морфологию эктопического глаза. Среди генов клеточного цикла

эффект обнаружен для гена *dia*. В классе генов везикулярного трафика эффект дали *hrs*, *Rab7* и *Csp*. Эффект на морфологию эктопического глаза обнаружен для гена *Upd*, участвующего в JAK-STAT-signalling pathway (класс «разные гены»).

Сайленсинг гена *osa* (конструкт *UAS-RNAi-osa*) в системе *1096-GAL4*; *UAS-ey* приводил к тому, что фоторецепторы эктопического глаза не собирались в компактную структуру. Эк-

прессия такой конструкции в крыловом имагинальном диске под действием драйвера *1096-GAL4* вызывала нарушения в развитии крыла — укороченное смятое крыло, в котором отсутствовало нормальное жилкование, а MTR (medial triple row) утратила часть stout bristles. Эктопическая экспрессия *UAS-RNAi-osa* в глазном имагинальном диске (драйвер *ey-GAL4*) вызывала небольшую редукцию нормального глаза (рис. 2). В имагинальных дисках личинок

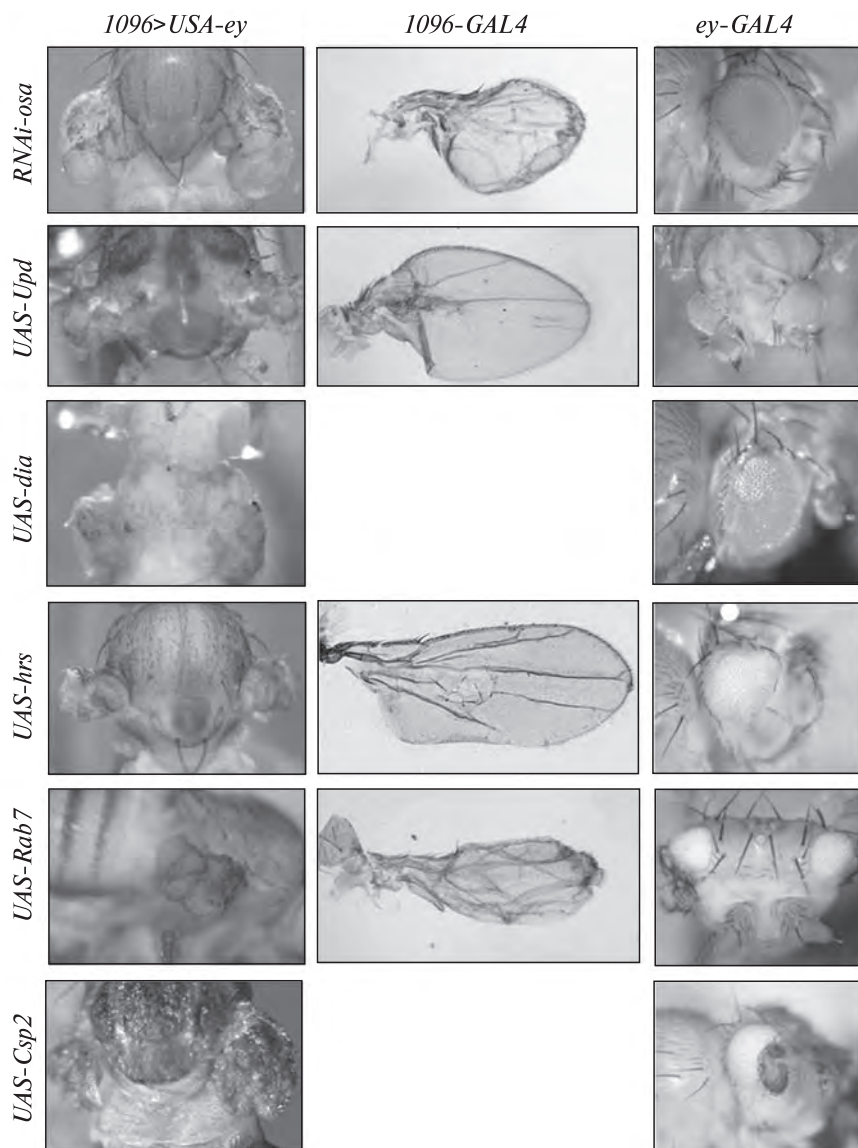


Рис. 2. Фенотипы эктопических глаз у взрослых особей при экспрессии некоторых генов-респондеров в системе *1096-GAL4*; *UAS-ey* и при их эктопической экспрессии драйверами *1096-GAL4* и *ey-GAL4* в соответствующих имагинальных дисках

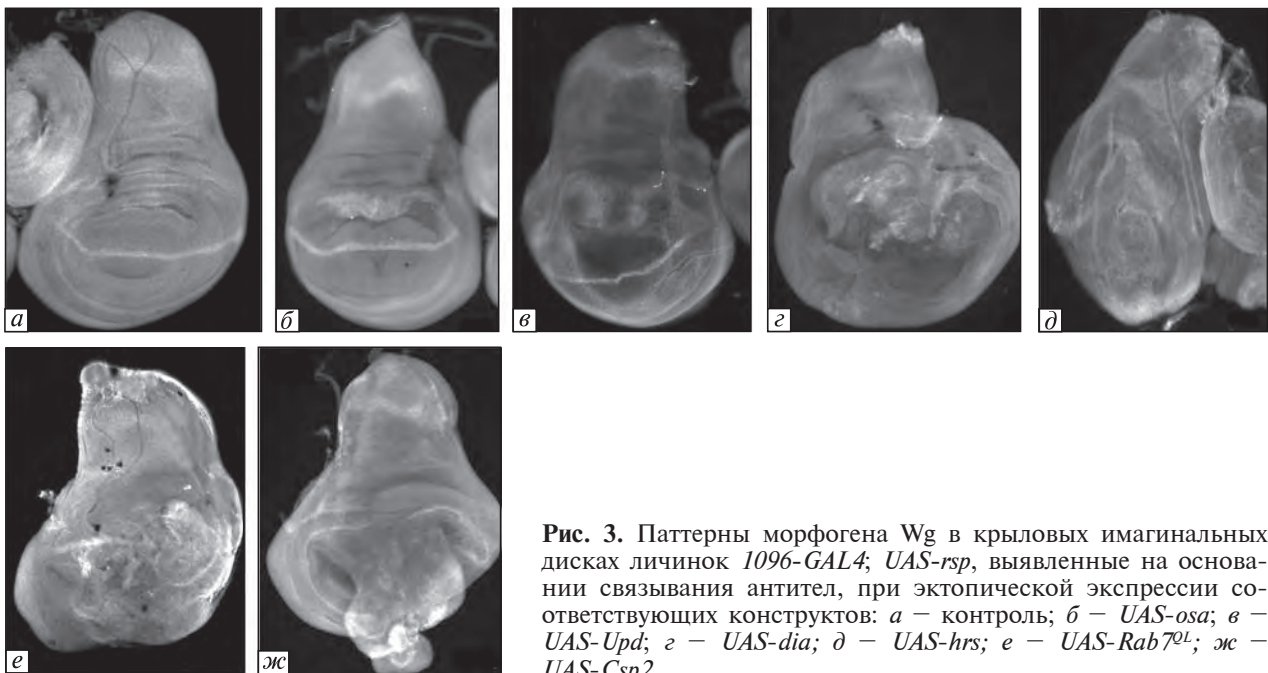


Рис. 3. Паттерны морфогена Wg в крыловых имагинальных дисках личинок *1096-GAL4; UAS-rsp*, выявленные на основании связывания антител, при эктопической экспрессии соответствующих конструкций: *a* – контроль; *б* – *UAS-osa*; *в* – *UAS-Upd*; *г* – *UAS-dia*; *д* – *UAS-hrs*; *е* – *UAS-Rab7^{0L}*; *ж* – *UAS-Csp2*

1096-GAL4; UAS-osa паттерн экспрессии морфогена Wg искажен в дорсальной области почки крыла (рис. 3, б).

В случае гиперэкспрессии *UAS-Upd* в системе *1096-GAL4; UAS-ey* эктопические глаза увеличены по сравнению с контролем. У мух *1096-GAL4; UAS-Upd* происходит уменьшение крыла и нарушение его жилкования. При гиперэкспрессии *UAS-Upd* в глазном имагинальном диске наблюдаются сильная редукция головных структур, образование дубликаций пальцев и изменение морфологии глаза (рис. 2). Крыловые имагинальные диски личинок *1096-GAL4; UAS-Upd* на D/V границе имеют нормальный паттерн экспрессии Wg, однако в дорсальной области почки крыла наблюдаются изменения, сходные по расположению с изменениями у *RNAi-osa* (рис. 3, в).

Гиперэкспрессия *UAS-dia* в системе образования эктопических глаз приводит к значительному увеличению размера последних (изменение размера эктопических глаз определяли у куколок, поскольку имаго не выживали) (рис. 2). Эктопическая экспрессия *dia* под действием крылового драйвера *1096-GAL4* вызывает летальность на стадии куколки. В крыловых имагинальных дисках таких личинок можно видеть редукцию D/V границы и других элементов

паттерна Wg (рис. 3, г). Экспрессия в глазном диске под действием *ey-GAL4* дает фенотип грубых глаз.

Аналогичное влияние на размер эктопического глаза оказывает экспрессия конструкции *UAS-hrs*. На рис. 2 приведены фенотипы крыла и глаза, образующиеся при эктопической экспрессии указанного трансгена в соответствующих имагинальных дисках. Исследование имагинальных дисков у особей *1096-GAL4; UAS-hrs* показало наличие существенных искажений паттерна экспрессии Wg (рис. 3, д).

Конструкция *UAS-Rab7^{0L}* представляет собой доминантный аллель с гиперфункцией гена. При гиперэкспрессии в крыле *UAS-Rab7^{0L}* в системе *1096-GAL4; UAS-ey* эктопические глаза увеличены по сравнению с контролем. При эктопической экспрессии *UAS-Rab7^{0L}* под действием крылового драйвера *1096-GAL4* морфология крыла искажается: размер крыла уменьшен, жилкование нарушено, нет адгезии D и V поверхностей крыла. Имагинальные диски таких особей имеют нарушенный паттерн Wg (рис. 3, е). При гиперэкспрессии конструкции в глазу драйвером *ey-GAL4* формируется фенотип грубых уменьшенных глаз (рис. 2).

В случае гиперэкспрессии *UAS-Csp2* эктопические глаза также увеличены. Особи *1096-*

GAL4; UAS-Csp2 не доживают до имаго, поэтому морфологию крыла проанализировать не удалось. При оверэкспрессии конструкции в глазу драйвером *ey-GAL4* наблюдаются уменьшение глаза, изменение его морфологии и появление дубликаций кутикулярных структур головы, замещающих часть глаза. Паттерн экспрессии *Wg* в почке крыла личинок *1096-GAL4; UAS-Csp2* сильно нарушен, морфология имагинального диска искажена (рис. 3, ж).

Обсуждение полученных данных. Конструкции *UAS-hrs*, *UAS-Rab7^{ol}* и *UAS-dia* при оверэкспрессии в системе *1096-GAL4; UAS-ey* увеличивают эктопический глаз, при этом *UAS-dia* не влияет на нормальный глаз, *UAS-hrs* слабо уменьшает, а *UAS-Rab7^{ol}* сильно редуцирует нормальный глаз. Все эти конструкции существенно влияют на морфологию нормального крыла. Ранее в работах Komada et al. [22] и Seto et al. [23] установлено, что оверэкспрессия белка *Hrs* искажает *Wg*-сигналинг. Рассматривая эффект морфогена *Wg* на образование эктопических глаз на крыле, мы обнаружили известный для нормального глаза антагонизм действия *Eu* и *Wg* [24] и в эктопическом глазу [25]. Более того, эффект оверэкспрессии *Hrs* в районе образования эктопического глаза хорошо согласуется с его известной ролью в регуляции *Wg*-сигналинга [25]. В целом результаты этого исследования показали, что оверэкспрессия белка *Hrs* вызывает расширение зоны крылового имагинального диска (свободной от ингибирующего действия морфогена *Wg*), из которой может образоваться эктопический глаз. Иными словами, конструкт действует на проспективные клетки эктопического глаза в крыле на стадии, когда эти клетки находятся еще в состоянии крыловой детерминации. Исходя из сходства фенотипических эффектов *UAS-hrs*, *UAS-Rab7^{ol}* и *UAS-dia* на морфологию нормального крыла и глаза (рис. 2) и сходства нарушений паттерна морфогена *Wg* под действием этих конструктов, можно предполагать, что действие *UAS-Rab7^{ol}* и *UAS-dia* также заключается в расширении зоны крылового имагинального диска, из которой далее развивается эктопический глаз. Такая интерпретация не противоречит молекулярной функции этих генов. Как было показано в работе [26], функция белка

Rab7 заключается в управлении сортировкой эндоситотических везикул, что близко к функции белка *Hrs*. Установлено влияние белка *Rab7* на *Wg*-сигналинг [27]. Механизм увеличения эктопического глаза под действием трансгена *UAS-dia* менее понятен. Мутации *dia* нарушают цитокinesis и некоторые другие клеточные функции, связанные с актиновым цитоскелетом. Поскольку паттерн экспрессии *Wg* в крыловом имагинальном диске нарушен под действием оверэкспрессии *dia*, то можно полагать, что нарушения актинового цитоскелета каким-то способом (возможно и не прямым) нарушают миграцию морфогена *Wg* по ткани диска. Дефекты глаза у особей с оверэкспрессией *dia* выражены слабее, чем у двух других рассмотренных трансгенов. Это может указывать на то, что за эффект в эктопическом глазу, скорее всего, отвечает фокус действия *dia* в крыле. Таким образом, конструкт *UAS-dia* также может действовать на проспективные клетки эктопического глаза в крыле на стадии, когда эти клетки находятся еще в состоянии крыловой детерминации.

Согласно полученным нами данным конструкция *UAS-Upd* увеличивает размер эктопического глаза. В то же время она редуцирует нормальное крыло и вызывает нарушения формирования головы и глаза. В отношении изменения размеров нормального глаза при эктопической экспрессии трансгена *UAS-Upd* интерпретация затруднена, поскольку происходит сильная редукция тканей головы. В полном геномном исследовании генов, экспрессирующихся при трансдетерминации, Klebes et al. [11] обнаружили, что экспрессия *Upd* значительно повышена в трансдетерминирующихся клетках. По мнению этих авторов, роль гена *Upd*, кодирующего лиганд *JAK-STAT* сигнального пути в процессе трансдетерминации, состоит в ингибировании дифференцировки клеток и усилении их пролиферационного обновления [28]. Приведенный вывод хорошо проецируется на полученные нами результаты: уменьшение нормального крыла указывает на то, что размер участка, из которого далее разовьется эктопический глаз, тоже, вероятно, уменьшается. Если эктопическая экспрессия *Upd* приводит к увеличению пролиферации трансдетерминирующихся клеток, то увеличе-

ние размеров эктопического глаза становится понятным. Кроме того, паттерн экспрессии Wg изменен только по периферии почки крыла, а полоса Wg на D/V границе диска остается интактной (рис. 3, в). Это также свидетельствует о том, что механизм влияния *Upd* существенно отличается от Wg опосредованного влияния *hrs* и *Rab7*.

Трансген *UAS-Csp2* вызывает увеличение эктопического глаза. Вследствие ранней летальности нам не удалось выяснить, имеется ли крыловой фенотип при оверэкспрессии трансгена в почке крыла. На рис. 3, ж, однако, продемонстрировано, что паттерн экспрессии Wg при оверэкспрессии *Csp2* в почке крыла искажен. Это сходно с эффектами *UAS-hrs* и *UAS-Rab7* на паттерн Wg. *Csp2* является белком экзоцитоза, существенным для передачи нервного сигнала, что также указывает на сходство с действием генов класса *UAS-hrs*. Дополнительно мы наблюдали дубликации кутикулярных структур, замещающие часть нормального глаза. Возможно, что оверэкспрессия трансгена *UAS-Csp2* не только расширяет зону крылового диска, из которой далее разовьется эктопический глаз, но может существенным образом изменять дифференцировку клеток нормального глаза. Вероятным объяснением этих аномалий дифференцировки является то, что трансген способен направлять часть клеток эктопического глаза по пути дифференцировки в дубликации кутикулярных структур головы.

Эктопические глаза, модифицированные действием трансгена *UAS-RNAi-osa*, в отличие от других исследованных нами случаев представляют собой группу фасеток, не связанных тесно между собой. При экспрессии трансгена в почке крыла происходит существенная редукция размеров крыла, а при экспрессии в нормальном глазу возникает его редукция и формирование нерегулярных фасеток. Ранее в полногеномном скрининге ген *osa* идентифицирован как ген с достоверно пониженной экспрессией в трансдетерминирующей ткани [11]. Более того, установлено, что под действием мутации, находящейся в гетерозиготе *osa/+*, частота событий трансдетерминации увеличивается по сравнению с нормой. При этом, однако, область диска, в которой про-

исходят события трансдетерминации, уменьшается. Последнее хорошо согласуется с нашими данными (рис. 2). По механизму действия гены Tlx-группы, к которой относится *osa*, кодируют белки ремоделирования хроматина и являются активаторами экспрессии генов развития, поэтому можно полагать, что наблюдаемые эффекты *osa* на эктопический глаз в данном случае объясняются действием гена на «эпигенетический ландшафт» трансдетерминирующих клеток.

Таким образом, среди 44 проанализированных трансгенов мы обнаружили 6, оверэкспрессия которых способна модифицировать процесс образования эктопического глаза на крыле. Большинство найденных модификаторов относятся к классу генов везикулярного трафика, которые, как известно, модифицируют активность различных сигнальных путей.

Проведенный анализ показывает, что в большинстве рассмотренных случаев модифицируется Wg-сигналинг, определяющий размер области, из которой развивается эктопический глаз. К группе модификаторов эктопического глаза мы также отнесли ген *Upd*, отвечающий за пролиферацию, и ген Tlx-группы — *osa*, влияние которых на клеточную пластичность обнаружено ранее на модели трансдетерминации клеток ноги в клетки крыла. Эти результаты показывают, что предложенная процедура генетического скрининга модификаторов формирования эктопического глаза создает возможность проведения генетической диссекции процесса изменения клеточной судьбы в системе крыло — глаз.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-00652-а.

S.A. Kopyl, T.D. Dubatolova,
E.I. Volkova, L.V. Omelyanchuk

Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian
Branch of Russian Academy of Science, Novosibirsk
E-mail: ome@mcb.nsc.ru

GENETIC MODIFIERS OF ECTOPIC EYE FORMATION IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* WING

Ectopic expression of a master gene *ey* by GAL4-UAS system can induce ectopic eye formation in different organs. Formation of ectopic eyes takes place in the defined regions of imaginal discs which partially overlap with regions responsible for transdetermination of differentiated

cells (essentially meaning alteration of the cell fate). In this way, ectopic eye induction could be considered as a model for cellular plasticity studies. In the present work we looked for transgenes whose ectopic co-expression with the master gene *ey* induced morphologic changes of the ectopic eyes on the wing compared to sole expression of *ey*. Most of the transgenes found to affect the size of ectopic eyes belonged to the class of vesicular trafficking genes capable to affect different signaling pathways. Ectopic expression of the revealed transgenes in the wing and eye discs altered the morphology of both the normal wings and normal eyes. We argue that the effect of these genes may be that they change the size of the region responsible for cell fate transdetermination.

С.А. Копил, Т.Д. Дубатолова,
Е.И. Волкова, Л.В. Омелянчук

ГЕНЕТИЧНІ МОДИФІКАТОРИ ФОРМУВАННЯ
ЕКТОПІЧНИХ ОЧЕЙ НА КРИЛІ
DROSOPHILA MELANOGASTER

Ектопічні очі можуть формуватися в різних органах *Drosophila melanogaster* за допомогою експресії майстер-гена *ey* в системі GAL4-UAS. Індукція ектопічних очей виникає в певних ділянках імагінальних дисків, які частково збігаються із зонами, де відбувається трансдeterminація диференційованих клітин, тобто процес зміни клітинної долі. Це дозволяє розглядати систему індукції ектопічних очей як модель для вивчення клітинної пластичності. В роботі проведено пошук трансгенів, спільна ектопічна експресія яких з майстер-геном *ey* зумовлює зміну морфології ектопічних очей на крилі в порівнянні з випадком ектопічної експресії тільки *ey*. Більшість трансгенів, що модифікують розмір ектопічних очей, належать до класу генів везикулярного трафіка, які змінюють активність різних сигнальних шляхів. Всі ці трансгени самі по собі при ектопічній експресії в дисках крила та ока змінюють морфологію нормального крила і нормального ока (або обох відразу). Ми вважаємо, що дія цих генів полягає у зміні розміру ділянки, де відбуваються події зміни клітинної долі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Fristrom D., Wilcox M., Fristrom J.* The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development // *Development*. — 1993. — **117**, № 2. — P. 509–523.
2. *Gehring W.J.* Imaginal disks // *The Genetics and Biology of Drosophila* / Eds M. Ashburner, T.R.F. Wright. — New York : Acad. press, 1978. — Vol. 2. — P. 511–554.
3. *Hadorn E.* Differenzierungsleistungen wiederholt fragmentierter Teilstücke männlicher Genitalscheiben von *Drosophila melanogaster* nach Kultur in vivo // *Dev. Biol.* — 1963. — **6**. — P. 617–629.
4. *Tobler H.* Cell specific determination and the rela-

- tionship between proliferation and transdetermination in leg and wing primordia in *Drosophila melanogaster* // *J. Embryol. Exp. Morphol.* — 1966. — **16**, № 3. — P. 609–633.
5. *Mattila J., Omelyanchuk L., Kyttälä S. et al.* Role of Jun N-terminal Kinase (JNK) signaling in the wound healing and regeneration of a *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc // *Int. J. Dev. Biol.* — 2005. — **49**, № 4. — P. 391–399.
6. *Maves L., Schubiger G.* A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between wingless and decapentaplegic signaling // *Development*. — 1998. — **125**, № 1. — P. 115–124.
7. *Hadorn E., Gsell R., Schultz J.* Stability of a position-effect variegation in normal and transdetermined larval blastemas from *Drosophila melanogaster* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1970. — **65**, № 3. — P. 633–637.
8. *Schubiger G., Alpert G.D.* Regeneration and duplication in a temperature sensitive homeotic mutant of *Drosophila melanogaster* // *Dev. Biol.* — 1975. — **42**, № 2. — P. 292–304.
9. *Abbott L.C., Karpen G.H., Schubiger G.* Compartmental restrictions and blastema formation during pattern regulation in *Drosophila* imaginal leg discs // *Dev. Biol.* — 1981. — **87**, № 1. — P. 64–75.
10. *Mattila J., Omelyanchuk L., Nokkala S.* Dynamics of decapentaplegic expression during regeneration of the *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc // *Int. J. Dev. Biol.* — 2004. — **48**, № 4. — P. 343–347.
11. *Klebes A., Sustar A., Kechris K. et al.* Regulation of cellular plasticity in *Drosophila* imaginal disc cells by the Polycomb group, trithorax group and lama genes // *Development*. — 2005. — **132**, № 16. — P. 3753–3765.
12. *Halder G., Callaerts P., Gehring W.J.* Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila* // *Science*. — 1995. — **267**, № 5205. — P. 1788–1792.
13. *Shen W., Mardon G.* Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed dachshund expression // *Development*. — 1997. — **124**. — P. 45–52.
14. *Bonini N.M., Bui Q.L., Gray-Board G.L., Warrick J.M.* The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates // *Development*. — 1997. — **124**. — P. 4819–4826.
15. *Pan D., Rubin G.M.* Targeted expression of teashirt induces ectopic eyes in *Drosophila* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1998. — **95**, № 26. — P. 15508–15512.
16. *Czerny T., Halder G., Kloter U. et al.* Twin of eyeless, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of eyeless in the control of eye development // *Mol. Cell*. — 1999. — **3**, № 3. — P. 297–307.
17. *Seimiya M., Gehring W.J.* The *Drosophila* homeobox

- gene optix is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism // *Development*. – 2000. – **127**, № 9. – P. 1879–1886.
18. *Weasner B., Salzer C., Kumar J.P.* Sine oculis, a member of the SIX family of transcription factors, directs eye formation // *Dev. Biol.* – 2007. – **303**, № 2. – P. 756–771.
 19. *Salzer C.L., Kumar J.P.* Identification of retinal transformation hot spots in developing *Drosophila* epithelia // *PLoS One*. – 2010. – **5**, № 1. – P. e8510.
 20. *Capdevila J., Guerrero I.* Targeted expression of the signaling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings // *EMBO J.* – 1994. – **13**, № 19. – P. 4459–4468.
 21. *Coelho C.M., Leivers S.J.* Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organisms // *J. Cell Sci.* – 2000. – **113**, № 17. – P. 2927–2934.
 22. *Komada M., Kitamura N.* The Hrs/STAM complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases // *J. Biochem.* – 2005. – **137**, № 1. – P. 1–8.
 23. *Seto E.S., Bellen H.J.* Internalization is required for proper Wingless signaling in *Drosophila melanogaster* // *J. Cell Biol.* – 2006. – **173**, № 1. – P. 95–106.
 24. *Held L.J.* Imaginal discs. The genetic and cellular logic of pattern formation. – Cambridge : Univ. press, 2002. – 460 p.
 25. *Копыл С.А., Дубатолова Т.Д., Волкова Е.И. и др.* Влияние морфогена Wg на формирование эктопического глаза у *Drosophila melanogaster* // *Генетика*. – 2011. – **47**, № 8. – С. 1026–1031.
 26. *Entchev E.V., Schwabedissen A., González-Gaitán M.* Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp // *Cell*. – 2000. – **103**, № 6. – P. 981–991.
 27. *Marois E., Mahmoud A., Eaton S.* The endocytic pathway and formation of the Wingless morphogen gradient // *Development*. – 2006. – **133**, № 2. – P. 307–317.
 28. *McClure K.D., Schubiger G.* Transdetermination: *Drosophila* imaginal disc cells exhibit stem cell like potency // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – **39**, № 6. – P. 1105–1118.

Поступила 20.03.12