

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ МЕЧЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ И ГЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ В ГОНАДАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© П. П. Лактионов, Д. А. Максимов, Е. Н. Андреева,
В. В. Шлома, С. Н. Белякин¹

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск;

¹ электронный адрес: belyakin@mcb.nsc.ru

Значительный прогресс в области биологии развития дрозофилы во многом связан с совершенствованием методик генетических манипуляций, в частности с развитием способов создания мозаичных организмов. Особенностью мозаичных организмов является наличие в их составе генетически различающихся популяций клеток. Такое различие может выражаться в экспрессии этими клетками репортерного гена, который неактивен в других клетках организма. На основе такого принципа реализован метод отслеживания клеточных поколений (отслеживания клеточных клонов). Суть этого метода заключается во внесении направленных изменений в генетический аппарат клеток-предшественниц, дающих начало клеточным линиям или органам и тканям. Генетическая особенность клетки-предшественницы, например способность экспрессировать флуоресцентный белок, будет наследоваться клетками-последователями, и в результате вся клеточная линия или ткань будет обладать меткой, отличающей ее от остальных клеток организма. Метод отслеживания клеточных поколений позволяет исследовать процесс пролиферации клеток, проследить их происхождение, а также исследовать функции интересующих генов в процессе развития отдельной ткани или органа. Нами найден подход, позволяющий избирательно метить клетки зародышевого пути или соматические клетки в гонадах дрозофилы.

Ключевые слова: дрозофила, оогенез, сперматогенез, прослеживание клеточных поколений.

Разные варианты методов отслеживания клеточных поколений широко используются в исследованиях, посвященных развитию организма (Liu, Hou, 2008). Для реализации этого подхода требуется наличие в исследуемом организме двух генетических конструкций, одна из которых служит для внесения направленной модификации во вторую, что приводит к необратимой индукции репортерного гена во всех последующих клеточных поколениях (Liu, Hou, 2008). Индуцирующая конструкция кодирует рекомбиназу (*FLP* или *Cre*) под контролем тканеспецифичного промотора. Эти ферменты способны проводить рекомбинацию между специфическими определенными последовательностями ДНК, в случае *Cre*-рекомбиназы — это короткие последовательности, называемые *loxP*-сайтами, участки *FLP*-опосредованной рекомбинации называются *FRT*-сайтами. Эта способность была использована в нескольких вариантах метода отслеживания клеточных поколений (Liu, Hou, 2008).

Вторая конструкция устроена таким образом, что кодирующая область репортерного гена отдалена от промоторной области, но под действием сайт-специфичной рекомбиназы они сближаются, в результате чего запускается экспрессия репортерного белка. В разных вариантах метода промотор и кодирующая область могут быть 1) инвертированы относительно друг друга (Hadjiesonopou et al., 2011), 2) отделены друг от друга другими последовательностями (Davis et al., 2008; Evans et al., 2009) и 3) даже находиться на гомологичных хромосомах (Har-

ison, Perrimon, 1993). Чаще всего в качестве репортера используются флуоресцентные белки в комбинации с промотором, обеспечивающим экспрессию в любых типах клеток.

В организме, содержащем обе конструкции, происходит наработка рекомбиназы в выборочной клеточной популяции. В результате рекомбинационного события вторая конструкция перестраивается таким образом, что запускается экспрессия репортерного белка. Способность экспрессировать репортер передается в последующие клеточные поколения.

Конкретная реализация этого принципа подбирается в зависимости от поставленной задачи. Однако при этом следует помнить о ряде ограничений. Например, в варианте расположения репортерного гена и промотора на гомологичных хромосомах меченой окажется только половина клеток исследуемой ткани (Harrison, Perrimon, 1993). В случае инвертированного расположения репортера и промотора (Hadjiesonopou et al., 2011) существует вероятность обратного события, которое приведет системе в исходное состояние. Таким образом, если требуется пометить выбранную ткань целиком, используется подход 2 (Davis et al., 2008; Evans et al., 2009).

Мы осуществили подобную схему для прослеживания соматических или герминальных клеток в гонадах дрозофилы. И у самцов, и у самок дрозофилы гонады содержат клетки зародышевого пути на разных стадиях развития, а также различные соматические клетки, выполня-

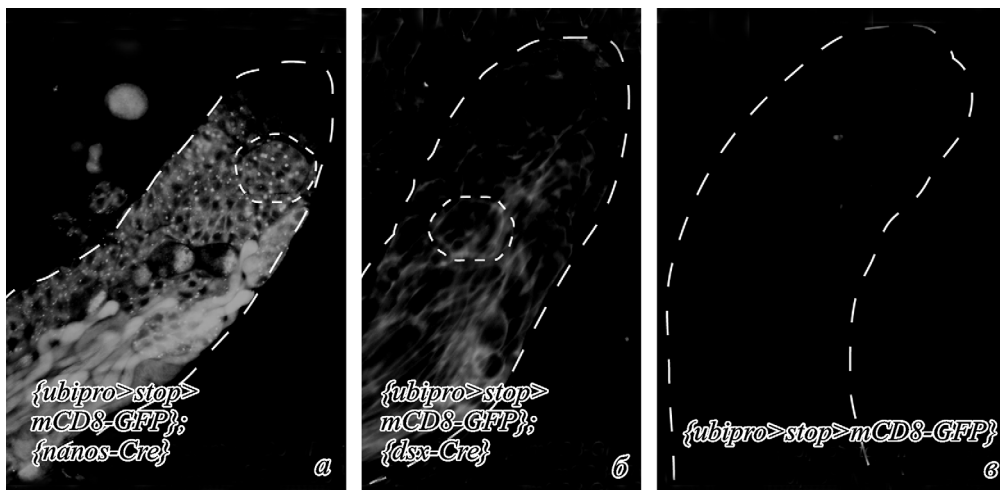


Рис. 1. Специфическое мечение клеток зародышевого пути и соматических клеток в семенниках *Drosophila melanogaster*. *a* — семенник самца, полученного в результате скрещивания $\{Ubi-pro>stop>mCD8-GFP\} \times \{nos-Cre\}$; *b* — семенник самца, полученного в результате скрещивания $\{Ubi-pro>stop>mCD8-GFP\} \times \{dsx-Cre\}$; *в* — семенник самца линии $\{Ubi-pro>stop>mCD8-GFP\}$ (отрицательный контроль). Представлено свечение GFP в клетках, экспрессирующих *Cre*. Штриховой линией обозначены очертания семенников и цисты внутри них.

ющие вспомогательные функции в гаметогенезе. Предложенная нами система позволяет исследовать процессы, происходящие в герминальных и соматических клетках гонад в отдельности.

Результаты и обсуждение

Для внесения генетических изменений нами была использована система *Cre-loxP*. Для специфической экспрессии *Cre* в клетках зародышевого пути были использованы регуляторные элементы гена *nanos* (Gavis et al., 1996a). Этот ген специфически активен в герминальных стволовых клетках обоих полов. Для того чтобы специфически пометить соматические клетки гонад, мы выбрали регуляторные области гена *doublesex*. Этот ген является основным регулятором формирования полового диморфизма в организме дрозофилы и в числе прочего контролирует формирование соматических тканей гонад (Samara et al., 2008).

Для того чтобы экспрессировать ген *Cre* в клетках зародышевого пути, была создана генетическая конструкция, в которой кодирующая область *Cre* была окружена последовательностями, которые, как было показано, достаточны для правильной экспрессии гена *nanos* (Gavis et al., 1996b; Forrest et al., 2004). Эта конструкция была использована для фС31-опосредованной трансформации дрозофилы (Bischof et al., 2007). Интеграцию провели в сайт attP40, расположенный на хромосоме 2.

Регуляторные области гена *doublesex* изучены хуже, чем для гена *nanos*, поэтому для создания линии мух, экспрессирующей *Cre* в тех же клетках, что и *doublesex*, мы применили метод направленного встраивания (gene targeting) (Rong, Golic, 2000). В результате нами была получена линия дрозофилы, в которой кодирующая часть гена *Cre* была встроена в локус *doublesex* и оказалась под контролем его регуляторных элементов. Подробное описание получения этой линии будет приведено в другом месте.

В качестве репортерного белка мы использовали хи-мерный полипептид mCD8-GFP, состоящий из флуоресцентного белка GFP, и трансмембранный домен мышино-

го лейкоцитарного рецептора CD8. За счет трансмембранного домена этот полипептид экспонируется на поверхности нарабатывающих его клеток (Lee, Luo, 2001). Чтобы обеспечить возможность наработки этого белка в разных типах клеток, нами был выбран промотор гена Ubi-p63E, который активен во множестве органов и тканей как взрослых мух, так и личинок дрозофилы (Evans et al., 2009). Между промотором и репортерным геном была помещена стоп-кассета, состоящая из терминатора транскрипции гена теплового шока *hsp70*, окруженного *loxP*-сайтами. Эта последовательность была ранее использована для блокирования транскрипции репортерного гена *lacZ* (Struhl, Basler, 1993). Полученная конструкция активна только в тех клетках, в которых нарабатывается белок *Cre* и вырезается стоп-кассета.

Для проверки эффективности нашей системы мы скрестили мух, экспрессирующих *Cre* под контролем регуляторных элементов генов *nanos* и *doublesex*, с мухами, несущими репортерную конструкцию, и проанализировали свечение GFP в гонадах самцов и самок. Нами были поставлены следующие скрещивания:

$$\varphi\{Ubi-pro > stop > mCD8-GFP\} \times \sigma\{nos-Cre\}$$

и

$$\varphi\{Ubi-pro > stop > mCD8-GFP\} \times \sigma\{dsx-Cre\}.$$

У потомков от обоих скрещиваний были выделены гонады. Свечение GFP и DAPI в яичниках детектировали при помощи конфокальной микроскопии. Анализ экспрессии репортерного белка в семенниках проводили при помощи флуоресцентного микроскопа.

В семенниках дрозофилы присутствует несколько популяций соматических клеток: оболочка семенника (мышечные и пигментные клетки), так называемые клетки хаба, координирующие процесс пролиферации стволовых клеток зародышевого пути, и соматические клетки цисты. Соматические клетки цисты берут начало от стволовых соматических клеток. Две клетки цисты формируют оболочку цисты, которая содержит развивающиеся клетки зародышевого пути, такая оболочка сохраняется

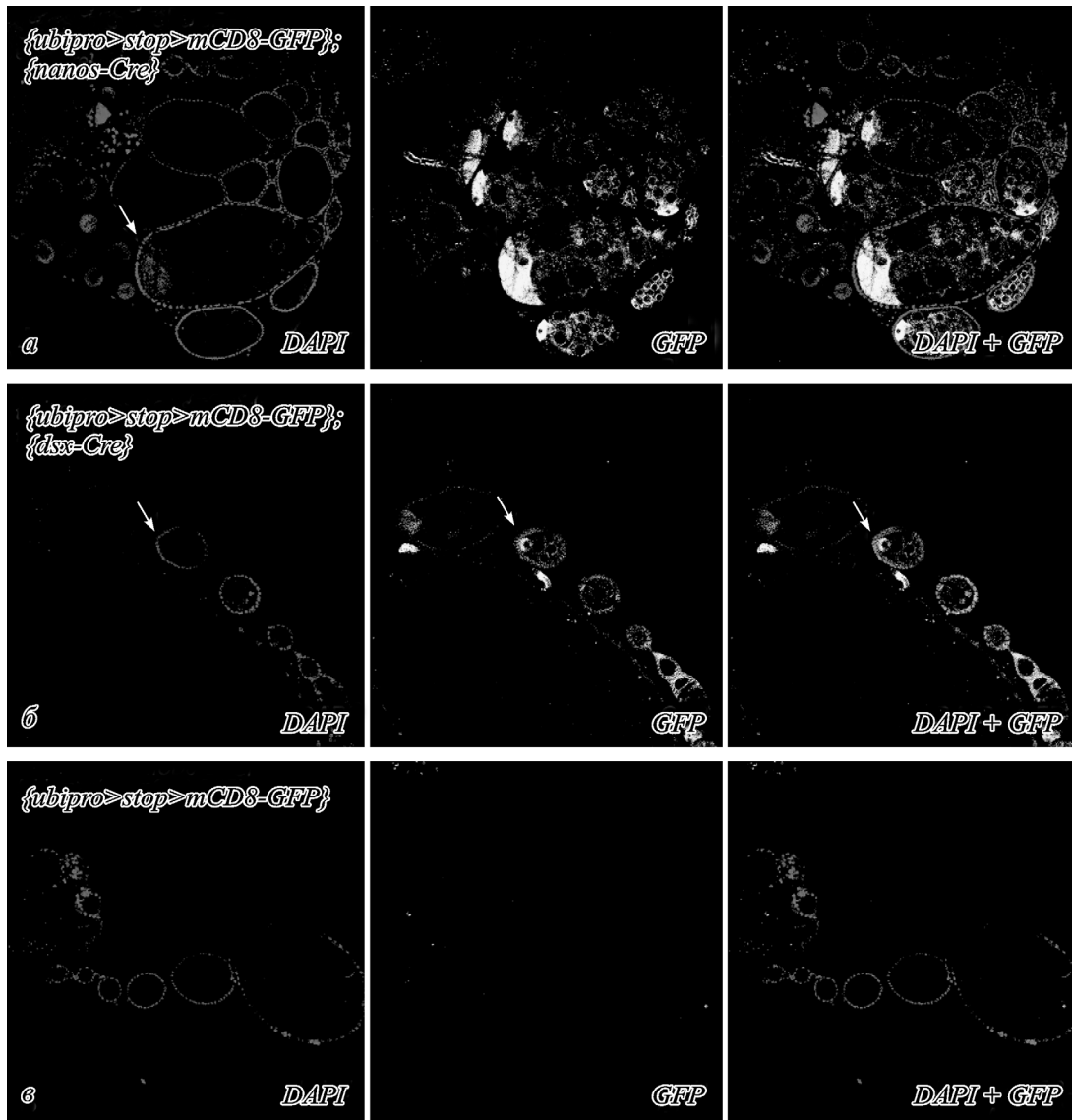


Рис. 2. Специфическое мечение клеток зародышевого пути и соматических клеток в яичниках *Drosophila melanogaster*. *a* — яичник самки, полученной в результате скрещивания $\{Ubiipro>stop>mCD8-GFP\} \times \{nos-Cre\}$; *б* — яичник самки, полученной в результате скрещивания $\{Ubiipro>stop>mCD8-GFP\} \times \{dsx-Cre\}$; *в* — яичник самки линии $\{Ubiipro>stop>mCD8-GFP\}$ (отрицательный контроль). Представлено свечение GFP в клетках, экспрессирующих *Cre*. Ядра клеток окрашены DAPI. Стрелками указаны ооциты.

на протяжении всего процесса сперматогенеза вплоть до стадии обособления сперматозоидов. Клетки зародышевого пути представлены половыми клетками, находящимися на различных стадиях развития, начиная от стволовой клетки и заканчивая зрелыми сперматозоидами.

В семенниках самцов генотипа $\{Ubiipro>stop>mCD8GFP; nos-Cre\}$ репортерный белок mCD8-GFP экспрессируется исключительно клетками зародышевого пути (рис. 1, *a*). Низкий уровень светимости GFP обнаруживается на стадии митотических делений сперматогониев и достигает максимума на стадии первичных сперматоцитов. На рисунке хорошо видны отдельные цисты, содержащие по 16 сперматоцитов, экспрессирующих mCD8-GFP. На последующих стадиях развития флуоресцентный сигнал сохраняется, но становится менее интенсивным, по всей вероятности, это объясняется сниженным уровнем транскрипции и трансляции. Вместе с усиленным ростом клеток на стадии удлиняющихся сперматид это приводит к разбавлению флуоресцентного сиг-

нала. Таким образом, в семенниках самцов $\{Ubiipro>stop>mCD8GFP; nos-Cre\}$ mCD8-GFP нарабатывается исключительно в клетках зародышевого пути, а оболочка семенника, клетки цисты и клетки хаба не экспрессируют флуоресцентный белок.

В семенниках самцов $\{Ubiipro>stop>mCD8GFP; dsx-Cre\}$ репортерный белок экспрессируется только в соматических клетках (рис. 1, *б*). Флуоресцентно меченными оказались клетки хаба, оболочка семенника и клетки цисты. Ни на одной стадии не наблюдалось свечения в половых клетках. Размер и форма цисты меняются в зависимости от стадии развития клеток зародышевого пути, которые они окружают. Начиная со стадии дифференцировки гониобласта, циста увеличивается в размерах, и на стадии, предшествующей мейозу, в ее составе отчетливо видны очертания сперматоцитов, к которым плотно прилегают клетки цисты (рис. 1, *б*, циста выделена *штриховой линией*). На стадии элонгации сперматид клетки цисты приобретают вытянутую форму. Флуоресцентный

сигнал от клеток цисты сохраняется на всем протяжении сперматогенеза. Полученная картина является весьма специфичной, поскольку у контрольных мух, несущих только репортерную конструкцию с невырезанным терминатором, свечение отсутствует (рис. 1, в).

В яичниках дрозофилы соматические клетки образуют оболочку органа, отдельная популяция соматических клеток контролирует процесс развития стволовых клеток зародышевого пути. Из соматических стволовых клеток предшественников развиваются клетки-спутники и фолликулярные клетки, окружающие половую клетку. В результате деления стволовой клетки зародышевого пути воспроизводится стволовая клетка и образуется цистобласт. Цистобласт претерпевает четыре раунда деления, в результате которых образуется 16 цистоцитов, связанных между собой цитоплазматическими мостиками. Один из цистоцитов развивается в ооцит, а остальные — в питающие клетки. В конечном итоге питающие клетки дегенерируют и образуется готовое к оплодотворению яйцо.

У самок, полученных в результате скрещивания линий {Ubi ρ >stop>mCD8GFP} и {nos-Cre}, происходит индукция репортерного гена в клетках зародышевого пути (рис. 2, а). Флуоресцентную метку содержат все клетки зародышевого пути — питающие клетки и ооциты. При этом на более поздних стадиях происходит накопление сигнала в ооците. Связано ли это с усилением экспрессии с промотора гена Ubi-rb3E, входящего в состав репортерной конструкции, или с активным транспортом белка из питающих клеток, пока неясно. В фолликулярных клетках репортерный ген не активируется.

В яичниках самок {Ubi ρ >stop>mCD8GFP; dsx-Cre} репортерный ген активен в соматических клетках. Флуоресцентная метка обнаруживается в фолликулярных клетках, формирующих оболочку яйцевой камеры, а также в соматических клетках гермария (рис. 2, б). Вместе с этим, активность репортерного гена в яичниках не ограничена популяцией соматических клеток — цистоциты и развивающиеся из них питающие клетки и ооциты также проявляют экспрессию репортерного белка. Как и в случае с nos-Cre, происходит явное накопление сигнала в ооците. У контрольных мух с невырезанным терминатором флуоресценция в яичниках отсутствует (рис. 2, в).

Таким образом, в нашей работе мы протестировали генетическую систему для раздельного мечения соматических и герминальных клеток в гонадах дрозофилы. Соматические клетки гонад, особенно клетки цисты в семенниках и фолликулярные клетки в яичниках, оказывают значительное влияние на созревание половых клеток с помощью межклеточных сигналов. Подробности таких взаимодействий остаются малоизученными, и наша система может оказаться полезной в исследованиях межклеточных коммуникаций в процессе гаметогенеза дрозофилы.

В наших экспериментах конструкция nos-Cre продемонстрировала строгую специфичность экспрессии в клетках зародышевого пути обоих полов. Конструкция dsx-Cre экспрессировалась в соматических клетках гонад, но веда себя по-разному в половых клетках самцов и самок. Это наблюдение само по себе интересно тем, что указывает на возможное участие гена doublesex в оогене-

зе, но не в сперматогенезе. Это противоречит представлению о том, что ген dsx не участвует в регуляции созревания половых клеток и может иметь отношение к наблюдаемым нарушениям дифференцировки мужских половых клеток в женском соматическом окружении (Hempel et al., 2008).

Работа проводилась в рамках проекта VI.42.1.2 ФНИ РАН (Гос. регистрация № 01201055588) и выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований президиума РАН № 6 «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-01007 и 11-04-01344).

Список литературы

- Bischof J., Maeda R. K., Hediger M., Karch F., Basler K. 2007. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 104 : 3312—3317.
- Camara N., Whitworth C., Van Doren M. 2008. The creation of sexual dimorphism in the *Drosophila* soma. *Curr. Top. Develop. Biol.* 83 : 65—107.
- Davis M. W., Morton J. J., Carroll D., Jorgensen E. M. 2008. Gene activation using FLP recombinase in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 4 : e1000028.
- Evans C. J., Olson J. M., Ngo K. T., Kim E., Lee N. E., Kuoy E., Patananan A. N., Sitz D., Tran P., Do M. T. et al. 2009. G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods.* 6 : 603—605.
- Forrest K. M., Clark I. E., Jain R. A., Gavis E. R. 2004. Temporal complexity within a translational control element in the nanos mRNA. *Development.* 131 : 5849—5857.
- Gavis E. R., Curtis D., Lehmann R. 1996a. Identification of cis-acting sequences that control nanos RNA localization. *Develop. Biol.* 176 : 36—50.
- Gavis E. R., Lunsford L., Bergsten S. E., Lehmann R. 1996b. A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of nanos RNA. *Development.* 122 : 2791—2800.
- Hadjieconomou D., Rotkopf S., Alexandre C., Bell D. M., Dickson B. J., Salecker I. 2011. Flybow: genetic multicolor cell labeling for neural circuit analysis in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods.* 8 : 260—266.
- Harrison D. A., Perrimon N. 1993. Simple and efficient generation of marked clones in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 3 : 424—433.
- Hempel L. U., Kalamegham R., Smith J. E. 3rd, Oliver B. 2008. *Drosophila* germline sex determination: integration of germline autonomous cues and somatic signals. *Curr. Top. Develop. Biol.* 83 : 109—150.
- Lee T., Luo L. 2001. Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* 24 : 251—254.
- Liu W., Hou S. X. 2008. Genetic tools used for cell lineage tracing and gene manipulation in *Drosophila* germline stem cells. *Meth. Mol. Biol.* 450 : 61—70.
- Rong Y. S., Golic K. G. 2000. Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science.* 288 : 2013—2018.
- Struhl G., Basler K. 1993. Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell.* 72 : 527—540.

Поступила 26 XI 2012

A GENETIC SYSTEM FOR SOMATIC AND GERMINAL LINEAGE TRACING
IN THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* GONADSP. P. Laktionov, D. A. Maksimov, E. N. Andreyeva, V. V. Shloma, S. N. Belyakin¹

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk;

¹ e-mail: belyakin@mcb.nsc.ru

Significant progress in the developmental biology of *Drosophila* is largely due to the improvement of methods of genetic manipulation and, in particular, development of ways to create mosaic organisms. The main characteristic of the mosaic organisms is the presence of genetically different populations of cells. For example, some tissues express a transgenic reporter gene that is absent in other cells of the body. This principle is used in a variety of the methods with the common name *lineage tracing*. The essence of these approaches is to perform the targeted changes in the genetic apparatus of progenitor cells that give rise to cell lines or organs and tissues. Genetic modification in progenitor cells, such as the ability to express a fluorescent protein, will be inherited by the next cell generations, and, as a result, the entire cell line or tissue will have a tag, which distinguishes it from the rest of the body. The lineage tracing methods allow tracking the cell generations, studying the cell proliferation process, tracing their origin and investigating the function of genes of interest in the development of a single tissue or organ. We have designed an approach to selectively label germ line or somatic cells in the gonads of *Drosophila*.

Key words: *Drosophila* oogenesis, spermatogenesis, lineage tracing.
