

АНОМАЛИИ МИТОЗА В ИМАГИНАЛЬНЫХ ДИСКАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, НЕСУЩИХ КОНСТРУКЦИЮ ГАШЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА Dlg

© Л. И. Лебедева,¹ Т. Д. Дубатолова,¹ Л. В. Омелянчук^{1, 2, *}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск,

и ² Новосибирский государственный университет;

* электронный адрес: ome@mcbb.nsc.ru

Изучено влияние сайленсирующей конструкции *UAS-RNAi-dlg*, индуцированной крыловым драйвером *1096-Gal4*, на митоз, цитокинез и текстуру ядра в крыловых имагинальных дисках. Конструкция представляет собой геномную инсерцию Р-элемента, содержащую *UAS*-промотор, который управляет сайленсирующим элементом. Последний представлен кодирующим участком гена *dlg* и комплементарным к нему участком. Вместе они образуют шпильку на уровне РНК, считываемой с этого элемента (Dietzl et al., 2007). Такая шпильчатая РНК расщепляется эндогенным белком *Dicer* на несколько фрагментов РНК, которые в свою очередь залипают на мРНК гена *dlg*. Далее эти комплексы расщепляются генным *Dicer*, в результате чего мРНК *dlg* распадается. Использование конструкции связано с изучением функции гена *dlg*. С этого гена считывается 21 транскрипт. Конструкция *UAS-RNAi-dlg* инактивирует 14 транскриптов — RE, RH, RQ, RS, RG, RD, RL, RB, RK, RR, RT, RN, RA и RP — и не затрагивает 7 других — RO, RF, RI, RU, RJ, RC и RM. Это дает возможность изучить действие считываемых с гена белков, которые содержат гуанилат-киназный домен IPR008145, расположенный на С-конце белка. Наиболее значимые последствия инактивации гена *dlg* проявились в аномальной реализации событий на выходе из митоза: в подавлении цитокинеза и образовании двуядерных клеток. Наблюдались и другие аномалии, приводящие к появлению анеуплоидных и полиплоидных клеток: трехполосная анафаза, асинхронное расхождение сестринских хроматид к полюсам в анафазе, отставание отдельных хромосом и микроядра. Количественные измерения флуоресцентных сигналов анти-Н3-р-антител и флуорохрома DAPI позволили выявить нарушения фазовой специфичности текстуры ядра на входе и выходе из митоза, нарушение согласованности между процессами, управляющими компактизацией хроматина, и процессами, регулирующими прохождение клеток по фазам митоза. По результатам исследования высказано предположение об инактивации микротрубочкового пути поляризации клеточного кортекса как наиболее вероятной причине патологического митоза и цитокинеза в имагинальных дисках *Drosophila* при инактивации гена *dlg*.

Ключевые слова: Dlg, *UAS-RNAi-dlg*, драйвер *1096-Gal4*, конфокальная микроскопия, митоз, цитокинез, текстура ядра.

Принятые сокращения: драйвер *1096-Gal4* — Р-элемент, управляющий транскрипцией *UAS*-конструкции, ИФ — интенсивность флуоресценции, ОФ — объем флуоресцентного сигнала, Dlg (*Discs large*) — опухолевый супрессор, Н3-р — фосфорилированный гистон Н3, *RNAi* — РНК-интерференция, *UAS-RNAi-dlg* — РНК-интерференционная конструкция, подавляющая транскрипцию опухолевого супрессора Dlg.

Белок Dlg (*Discs large*) является известным неопластическим опухолевым супрессором, содержащим PDZ-домен, характерный для белков, вовлеченных в контроль за клеточной полярностью. Белок связывается с базолатеральной частью клеточной стенки (Narayanan, Bilder, 2006). Это указывает на то, что он контролирует межклеточные сигналы, управляющие пролиферацией. Наиболее известная функция белка состоит в том, что, являясь одним из элементов комплекса Khc—73/Dlg/Pins/Gai, он участвует в контроле полярности клеточного кортекса и асимметричного деления клеток в нервных ганглиях *Drosophila*. Потеря любого из указанных выше белков комплекса приводит к аномальной ориентации митотического веретена и различным дефектам клеточ-

ного деления (Siegrist, Doe, 2005, 2007). Повышенное внимание исследователей к функционированию белка Dlg при асимметричном делении нейробластов привело к тому, что аномалии митоза, вызываемые мутациями *dlg*, оказались изученными только в этой ткани. Исходя из того что белок функционирует как опухолевый супрессор в развитии имагинальных дисков, мы изучили влияние инактивации гена *dlg* на деление клетки в крыловом имагинальном диске. Для этого мы использовали конструкцию *UAS-RNAi-dlg*, которая подавляет транскрипцию гена в системе *Gal4—UAS*.

Конструкция *UAS-RNAi-dlg* — это геномная инсерция Р-элемента, содержащая *UAS*-промотор, который управляет сайленсирующим элементом. Последний представ-

ляет собой кодирующий участок гена *dlg* и комплементарный к нему участок. Вместе они образуют шпильку на уровне РНК, считываемой с этого элемента (Dietzl et al., 2007). Такая шпильчатая РНК расщепляется эндогенным белком Dicer на несколько фрагментов РНК, которые в свою очередь залипают на мРНК гена *dlg*. Далее эти комплексы расщепляются геномным Dicer, в результате чего мРНК *dlg* распадается. РНК-интерференция широко используется в фундаментальных и прикладных исследованиях (Bass, 2000; Paddison et al., 2002; Bagasra, Prilliman, 2004; Seydoux, 2013).

Мы используем указанную конструкцию в связи с изучением функции гена *dlg*. Ген *dlg* сложный, с него считывается 21 транскрипт. Конструкция инактивирует 14 транскриптов — RE, RH, RQ, RS, RG, RD, RL, RB, RK, RR, RT, RN, RA и RP — и затрагивает 7 других — RO, RF, RI, RU, RJ, RC и RM. Таким образом, с помощью конструкции можно изучать действие считываемых с гена белков, которые содержат гуанилаткиназный домен IPR008145, расположенный на С-конце белка.

Не все детали работы гена ясны. Возможно, что наиболее ярко он действует в клетках, подвергающихся асинхронному делению. Мы же с помощью крылового драйвера *1096-Gal4* запускаем сайленсирующую конструкцию во всех клетках почки крыла и поэтому можем быть уверены, что во всех клетках подавлена активность указанных выше транскриптов.

В настоящей работе патологии митоза изучены с использованием метода конфокальной микроскопии. При таком подходе структура клеточного ядра исследуется с максимальным приближением к реальным условиям, без разрушения тканевой и клеточной архитектуры. Изображения являются трехмерными, как это и имеет место *in vivo*. Анализ флуориметрических измерений носит количественный характер. Помимо обычных методов визуализации митоза на конфокальных срезах и количественной обработки флуоресцентного сигнала мы использовали развиваемые нами текстурные методы исследования. Термин «текстура ядра» был введен для обозначения различных характеристик флуоресцентного изображения ядра (Ploegher et al., 2008) и используется нами далее в этом же смысле. Ранее нами было показано, что в делящихся клетках имагинальных дисков личинок дикого типа *Nikone AW* имеют место характерные изменения интенсивности (ИФ) и объема (ФО) флуоресцентного сигнала при выявлении фосфорилированного гистона H3 (H3-p), отражающие поступательное движение клеток по фазам митоза (Омельянчук и др., 2007; Лебедева и др., 2010, 2011). Одновременно в последовательных фазах митоза специфически меняется текстура ядра — гистограмма распределения вокселей по интенсивности сигнала флуорохрома DAPI в изображении ядра (Lebedeva et al., 2011). В текстуре отражается специфичность процессов соответствующей фазы митоза, что позволяет использовать анализ текстуры в качестве чувствительного теста на патологические изменения в фазах митоза. Два следующих результата этих работ определили направление наших дальнейших исследований. Это, во-первых, специфические изменения текстуры ядра в последовательных фазах митоза, что позволило нам использовать анализ текстуры в качестве чувствительного теста на патологические изменения событий митоза у личинок, несущих сайленсирующую конструкцию. Результаты исследования представлены в настоящем сообщении. Показано деструктивное влияние сайленсирующей конструкции

UAS-RNAi-dlg (с драйвером и без) на митоз, цитокинез и текстуру ядер.

Второй результат наших отмеченных выше исследований — это некомпактизация и (или) декомпактизация части хроматина во время митоза. Феномен некомпактизации части хроматина в митозе известен в литературе как одно из проявлений букмаркинга (bookmarking) — эпигенетического механизма передачи клеточной памяти модели генной экспрессии через митоз дочерним клеткам (Michelotti et al., 1997; Zaidi et al., 2011). В материнском хроматине перед началом и (или) в начале митоза маркируются промоторы генов, которые будут (должны быть) экспрессированы в ядрах дочерних клеток. Это важная функция хроматина, инактивация которой летальна для клеток (Xing et al., 2005). Предположив, что в настоящем исследовании неконденсация хроматина могла быть проявлением букмаркинга, мы продолжаем изучение упаковки хроматина методом конфокальной микроскопии в интерфазе и митозе. Результаты будут представлены в следующем сообщении.

Материал и методика

Работа выполнена на ядрах делящихся клеток крыловых имагинальных дисков личинок третьего личиночного возраста *Drosophila melanogaster* линии *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg*, несущей сайленсирующую (подавляющую транскрипцию гена) конструкцию *dlg¹JF01365 y¹ v¹; P{y[+i7.7] v[+i1.8]=TRiP.JF01365}attP2* (номер в Блумингтонском центре — 25780), которая индуцируется с помощью крылового драйвера *1096-Gal4*. Линию *UAS-RNAi-dlg*, несущую сайленсирующую конструкцию в отсутствие драйвера *1096-Gal4*, использовали как контроль «подтекания» собственно конструкции. В качестве интактного контроля использовали линию дикого типа *Nikone AW*.

Для визуализации ядер диски окрашивали с помощью антител к H3-p. Использовали антитела кролика (anti-H3-p, Upstate Biotechnology, США) в разведении 1 : 100 и вторые, меченные Alexa-568 антитела козы (goat-anti-rabbit IgG, A-11011, Molecular Probes, США) в разведении 1 : 200. Кроме того, препараты окрашивали красителем DAPI в концентрации 1 мг/мл в течение 2 мин и заключали в Mowiol, содержащий 5 % DABCO. Методики конфокальной микроскопии и численного анализа результатов по разработанной специальной компьютерной программе подробно описаны ранее (Лебедева и др., 2010, 2011). Программа (на языке Mathcad) позволяет интегрировать флуоресцентный сигнал по объему. При этом учитываются суммарная интенсивность и объем флуоресцентного сигнала по слоям. Коррекцию фона осуществляли на каждом оптическом слое отдельно путем измерения ИФ сигнала в участке, расположенном вблизи ядра, затем эту величину вычитали из значения ИФ сигнала для данного оптического слоя. Границы ядра и фона выделяли вручную.

В разных повторах эксперимента ИФ сигнала варьировала, но во всех случаях можно было различить 2 группы ядер, различающиеся между собой в 2 раза по ИФ сигнала DAPI. Это соответственно ядра профазы, прометафазы, метафазы и начала анафазы, характеризующиеся тетраплоидным количеством ДНК (в диплоидных клетках), и ядра анафазы и телофазы, характеризующиеся диплоидным количеством ДНК. Поэтому далее интен-

Плоидность ядер в делящихся клетках крыловых дисков личинок контрольной линии *Hikone AW* и опытных линий *UAS-RNAi-dlg* и *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg*

Клеточная линия	Фаза митоза							Все ядра
	прометафаза-начало анафазы			анафаза-телофаза				
	Плоидность ядра ^{а, б}							
	4n	8n ^в	сумма	2n	4n ^г	4n + 4n = 8n ^д	сумма	2n, 4n, 8n (сумма)
<i>Hikone AW</i> ^б	44 ^е (100)*	0	44 (100)	21 (100)	0	0	21 (100)	65
<i>1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg</i>	43 (65.2)	23 (34.8)	66 (100)	9 (25.7)	19 (54.3)	7 (20.0)	35 (100)	101
<i>UAS-RNAi-dlg</i>	33 (60.0)	22 (40.0)	55 (100)	13 (65.0)	7 (35.0)	0	20 (100)	75

^а Плоидность определена по интенсивности флуоресцентного сигнала DAPI. ^б По данным Лебедевой и соавторов (2011). ^в Двухядерные клетки (ядра контактируют между собой, учтены как одно ядро). ^г Аномально короткое расстояние между полюсами, сестринские ядра контактируют между собой, учтены как одно ядро; предположительно на выходе из митоза образуется двухядерная тетраплоидная клетка. ^д Двухядерная клетка в анафазе, два веретена тесно соприкасаются между собой, учтены как одно веретено. ^е Указано число учтенных ядер. * В скобках указана доля соответствующих ядер в %.

сивность сигнала флуорохрома DAPI и анти-НЗ-р-антител приведена в отн. ед., рассчитанных по формуле $I = I_i/I_{4n}$, где I_i — ИФ сигнала в объеме всего ядра в любой отдельно взятой клетке, I_{4n} — средняя величина ИФ сигнала, определенная в клетках с тетраплоидным набором ДНК (в фазах бихроматидных хромосом). Использование отн. ед. позволило учесть варьирование окрашивания ядер на разных препаратах и таким образом уменьшить ошибку метода. Это дало возможность изучить изменения содержания ДНК, ее пространственной упаковки и содержания НЗ-р в ядре по мере прохождения фаз митоза.

Ядра делящихся клеток охарактеризованы по нескольким следующим параметрам: 1) морфологические особенности (микроядра, асинхронное расхождение сестринских наборов хроматид в анафазе, отставание отдельных хроматид в анафазе, трехполюсный митоз, аномально короткое расстояние между геометрическими центрами ядер); 2) относительный уровень сигнала флуорохрома DAPI в ядре, суммированного по его оптическим срезам с учетом плоидности ядра; 3) траектория «движения» ядер в митозе на основании анализа гистограмм ИФ НЗ-р и ОФ НЗ-р сигнала при выявлении гистона НЗ (Омельянчук и др., 2007; Лебедева и др., 2011); 4) текстура ядра (текстура хроматина) — гистограмма распределения вокселей по интенсивности сигнала флуорохрома DAPI в изображении ядра.

Использовали интегральные характеристики текстуры ядра — объемную долю вокселей с соответствующим уровнем флуоресцентного сигнала. Основными параметрами, по совокупности которых характеризовали гистограмму ядра, были форма, пределы варьирования интенсивности флуоресцентного сигнала DAPI в пикселе от минимального уровня до максимального; доля пикселей с минимальным уровнем флуоресцентного сигнала DAPI; величина сигнала пикселя, представленного в ядре с максимальной частотой; величина углового коэффициента, определяемого в начальной точке изменения наклона кривой распределения пикселей.

По среднему значению суммы числовых параметров текстуры ядер в фазах бихроматидных хромосом митоза определяли символическую (усредненную) текстуру ядра соответствующих клеточных линий. По плоидности ядра и сходству совокупности перечисленных выше параметров гистограмм ядер в опытных клеточных линиях *1096-Gal4, UAS-RNAi-dlg* и *UAS-RNAi-dlg* с фазоспецифи-

ческими гистограммами ядер клеток контрольной линии дикого типа *Hikone AW* определена предположительная фаза митоза в опытных клетках.

Результаты и обсуждение

При анализе результатов мы различали плоидность клетки и плоидность ядра. Учитывали, что в диплоидной клетке в фазах бихроматидных хромосом митоза (в профазае, прометафазае, метафазае, начале анафазы) ядра содержат тетраплоидный набор ДНК, в тетраплоидной клетке — октаплоидный. В полюсах анафазы диплоидной клетки ядра содержат диплоидный набор хромосом, в тетраплоидной клетке — тетраплоидный. При асинхронном расхождении сестринских хроматид к полюсам, а также при аномально коротком расстоянии между разошедшимися к полюсам сестринскими наборами хроматид флуоресцентный сигнал охватывает оба набора хроматид, и изображение ядра часто имеет форму «огурца». В ядре такой анафазы диплоидной клетки определяется тетраплоидное количество ДНК, в анафазе тетраплоидной клетки — октаплоидное.

Аномалии митоза. В крыловых имагинальных дисках личинок линии *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* (конструкция с драйвером) обнаружили аномалии митоза, приводящие к появлению анеуплоидных (не показано) и полиплоидных клеток (см. таблицу). Наиболее значимые последствия инактивации *dlg* проявились в аномально коротком расстоянии между разошедшимися ядрами в анафазе (рис. 1, д, е) и в образовании двухядерных клеток (рис. 1, ж, з). Примерно в 80 % случаев деление диплоидных клеток заканчивается образованием двухядерных (тетраплоидных) клеток. В клетках линии *UAS-RNAi-dlg* (конструкция без драйвера, использованная нами в качестве контроля подтекания собственно конструкции) частота подобной аномалии составляет примерно 50 % (см. таблицу). Таким образом, использованная нами *RNAi*-конструкция проявила существенную активность также в отсутствие драйвера. Наблюдались и другие аномалии митоза: трехполюсная анафаза (рис. 1, в), асинхронное расхождение сестринских хроматид к полюсам в анафазе (рис. 1, з), отставание отдельных хромосом, микроядра (не показано). Вместе эти данные свидетельствуют о нарушении событий на выходе из митоза.

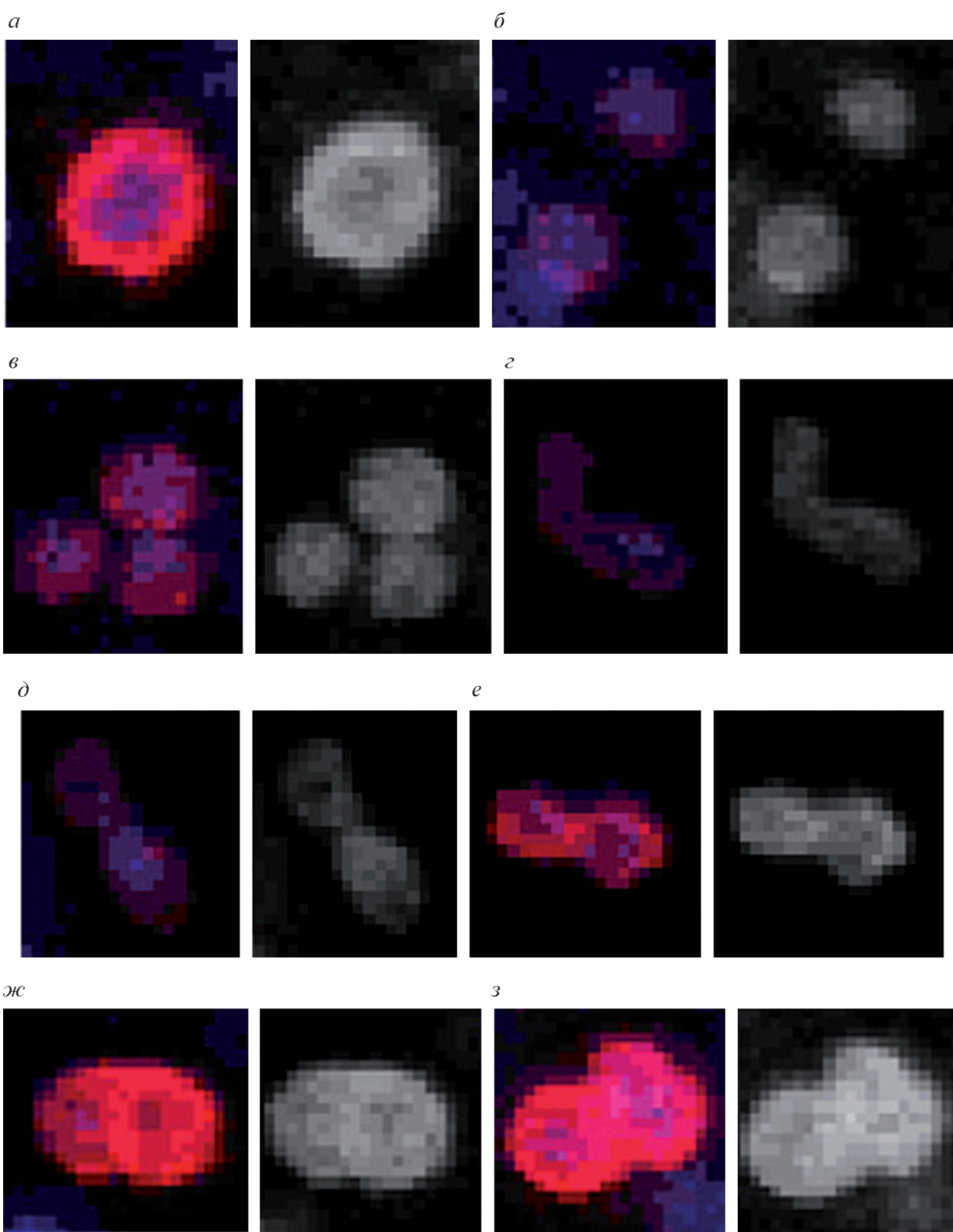


Рис. 1. Аномалии митоза в клетках опытных линий *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* и *UAS-RNAi-dlg*.

а — метафаза (норма, плоидность ядра $4n$); *б* — анафаза (норма, плоидность хроматина в полюсах $2n$); *в* — трехполосная анафаза диплоидной клетки (суммарная плоидность хроматина в полюсах $4n$); *г* — двуядерная клетка в анафазе — это два веретена, тесно соприкасающиеся между собой в одном полюсе, вторые полюса, как правило, раздвинуты, в обоих веретенах сестринские хроматиды расходятся к полюсам асинхронно, так что DAPI и гистон H3-p определяются во всем объеме веретена, суммарная плоидность хроматина обоих веретен равна $8n$ (подобная аномалия обнаружена только у личинок линии *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg*, но не *UAS-RNAi-dlg*); *ж*, *з* — метафаза двуядерной клетки (ядра контактируют между собой, учтены как одно ядро, плоидность $8n$).

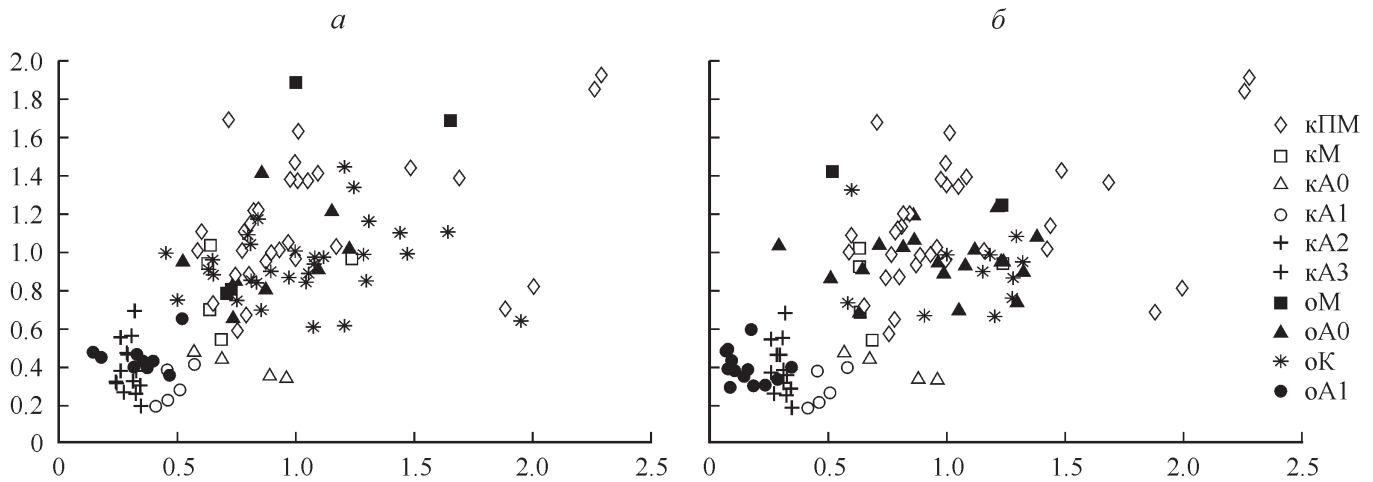


Рис. 2. «Фазовая траектория» в митозе диплоидных клеток, определенная по диаграмме ИФ—ОФ НЗ-р-гистона и текстуре ядра для контрольной линии *Hikone AW* и опытной линии *UAS-RNAi-dlg* с драйвером *1096-Gal4* (а) и для линии *Hikone AW* и опытной линии *UAS-RNAi-dlg* без драйвера (б).

По оси абсцисс — ИФ НЗ-р, отн. ед.; по оси ординат — ФО НЗ-р, отн. ед. В контроле: кПМ — профазы, прометафаза, метафаза ранняя и средняя, кМ — метафаза поздняя, кА0 — начало анафазы, кА1 — анафаза 1, кА2 — анафаза 2, кА3 — анафаза 3; в опыте: оМ — метафаза поздняя, оА0 — начало анафазы, оК — клетки с текстурой ядра типа К-митоза или какого-либо другого типа, нехарактерного для контроля, оА1 — анафаза 1. Здесь и далее за единицу принята средняя величина ИФ сигнала, определенная в клетках с тетраплоидным набором ДНК (фазы бихроматидных хромосом диплоидных клеток).

Нарушение фазовой специфичности текстуры ядра. Текстура ядра рассмотрена отдельно для клеток, вступавших в митоз, соответственно с диплоидным и тетраплоидным наборами хромосом.

Диплоидные клетки. По результатам предыдущих исследований, выполненных на личинках контрольной линии дикого типа *Hikone AW* (Lebedeva et al., 2011), был сделан вывод о неслучайной согласованности между движением клеток по фазам митоза и формированием текстуры ядра, которая проявлялась в фазовой специфичности текстуры. Для того чтобы выяснить, сохраняется ли подобная согласованность в клетках имагинальных дисков личинок опытных линий *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* и *UAS-RNAi-dlg*, были сопоставлены изменения флуоресцентного сигнала гистона НЗ-р с изменениями текстуры ядра при прохождении по фазам митоза клеток опытных и контрольной линий. На диаграмме «ИФ НЗ-р—ОФ НЗ-р» не обнаружено различий между распределением ядер в опытных клеточных линиях и контрольной линии *Hikone AW* (рис. 2, а, б). Иными словами, фазовая траектория в митозе клеток обеих опытных линий существенно не отличается от таковой в клетках контрольной линии. Но при этом в ядрах клеток опытных линий нарушена фазовая специфичность текстуры. Так, не обнаружено ядер с текстурой, характерной для ранних фаз контрольного митоза — профазы, прометафазы, ранней и средней метафазы. На фазовой траектории начальных фаз митоза в имагинальных дисках опытных личинок выявились ядра, текстура которых либо не имела аналогов в контрольной линии, либо была представлена преимущественно гистограммой типа К-митоза (рис. 3). В некоторых случаях текстура ядра у опытных личинок была сходной с текстурой контрольных клеток, но распределение таких ядер на диаграмме фазового пути (ИФ НЗ-р—ОФ НЗ-р) не соответствовало фазе митоза, ожидаемой по распределению ядер контрольной линии. Так, ядра, которые в контроле по типу текстуры характерны только для клеток на выходе из митоза, в имагинальных дисках опытных личинок были разбросаны по всему «облаку» ядер (рис. 2).

Несоответствие между движением клеток по митозу и текстурой ядра дает основание полагать, что в клетках личинок опытных линий *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* и *UAS-RNAi-dlg* нарушена согласованность между процессами, определяющими движение клеток по митозу, и процессами, контролирующими компактизацию хроматина.

Далее мы сопоставили усредненную (символическую) текстуру ядер всех диплоидных клеток в фазах бихроматидных хромосом митоза в контрольной линии с таковой клеток личинок опытной линии *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg*. Оказалось, что символическая текстура ядра диплоидных клеток линии *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* в фазах бихроматидных хромосом митоза отличается от таковой клеток контрольной линии (рис. 3), что свидетельствует о нарушении событий не только на выходе из митоза, как отмечалось выше, но и на входе в митоз.

Тетраплоидные (двуядерные) клетки в фазах бихроматидных хромосом. Выше отмечалось, что в двуядерных клетках имагинальных дисков личинок обеих опытных линий ядра, как правило, тесно контактируют между собой, так что при конфокальной микроскопии они были учтены нами, как один тетраплоидный набор хромосом (одно «ядро»). Подчеркнем, что на стадиях бихроматидных хромосом такие «ядра» содержат октаплоидное количество ДНК. ИФ и ОФ сигнала в тетраплоидном наборе выше, чем в диплоидном. На диаграмме «ИФ НЗ-р—ОФ НЗ-р» распределение «ядер» с тетраплоидным набором хромосом не совпадает с распределением ядер диплоидных клеток контроля (рис. 4). Условно допустив, что оба ядра двуядерной клетки проходят митоз синхронно (в действительности не строго синхронно), мы экстраполировали данные тетраплоидного «ядра»: 1) на два виртуальных диплоидных ядра путем уменьшения в 2 раза уровня и объема сигнала гистона НЗ-р в клетках с бихроматидными хромосомами и 2) на 4 виртуальных ядра в клетках на стадии анафазы. Виртуальные ядра расположились в «облаке» реальных ядер диплоидных клеток контроля (рис. 4). Этот результат позволяет нам сделать вывод о том, что в двуядерной тетраплоидной клетке

путь каждого из двух ядер в митозе существенно не отличается от такового ядер одноядерных диплоидных клеток контроля. Но в отличие от контроля среди двуядерных клеток опытных линий, так же как и среди рассмотренных выше одноядерных, не выявлено ядер с текстурой, характерной для ранних фаз митоза. Ядра двуядерных клеток имеют либо нерегулярную, нехарактерную для контроля текстуру, либо текстуру, которая в контроле характерна для ядер на выходе из митоза (поздней метафазы, начала анафазы), но в отличие от контроля клетки опытных линий с подобной текстурой ядра разбросаны по всему фазовому пути митоза (не показано).

Совокупность полученных данных позволяет сделать следующие выводы. Во-первых, и в одноядерных, и в двуядерных клетках имагинальных дисков опытных линий *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* и *UAS-RNAi-dlg* события на входе и выходе из митоза реализуются аномально, что прямо или косвенно связано с потерей белка Dlg. Во-вторых, в клетках опытных линий нарушена согласованность между процессами, определяющими движение клеток по фазам митоза, и процессами, контролирующими формирование текстуры хроматина.

Анафаза. Полярное расхождение хромосом в анафазе является важнейшим событием митотического цикла, ответственным за точную передачу генетического материала дочерним клеткам. Генетическая нестабильность, вызванная аномальным расхождением хромосом в анафазе, нередко становится причиной заболеваний, в том числе рака. Выявление процессов, прямо или косвенно влияющих на расхождение хромосом, — одна из актуальных задач современных исследований в области клеточной биологии.

Принято различать в анафазе две стадии — анафазу А (полярное расхождение хромосом) и анафазу Б (расхождение полюсов). Наши исследования митоза в имагинальных дисках контрольной линии *Hikone AW* с использованием конфокальной микроскопии позволили предположить существование трех стадий в анафазе: анафазы 1, анафазы 2 и анафазы 3 (A1, A2 и A3 соответственно), различающихся между собой текстурой ядра (Lebedeva et al., 2011). Во время анафазы на пути выхода клеток из митоза по мере снижения сигнала гистона H3-р три типа текстуры последовательно сменяют друг друга. В клетках обеих опытных линий таких изменений в анафазе не обнаружено. Во всех реальных и виртуальных ядрах, учтенных в анафазе, за небольшим исключением случаев нерегулярной текстуры, определяется один и тот же тип текстуры — A1. Следует отметить хотя и не полное, но достаточно выраженное сходство между текстурами ядер в начале анафазы и в A1 и существенное отличие их от текстуры ядер в предшествующих (рис. 3) и последующих (Lebedeva et al., 2011) фазах митоза. Этот специфический тип текстуры формируется в начале анафазы и характеризуется относительно низкой долей пикселей со слабым сигналом DAPI. В рамках принятого нами предположения об обусловленности текстуры ядра специфическим событием фазы митоза, это может означать, что тип текстуры обусловлен теми процессами, которые участвуют в реализации специфического события начала анафазы. Наиболее вероятным специфическим событием начала анафазы, которое могло бы проявиться через специфическую текстуру ядра, может оказаться релокализация хромосомных пассажиров (белков INCENP) и киназы Аутога В на плюс-концы антипараллельных микротрубочек, исходящих из полюсов веретена (Wang,

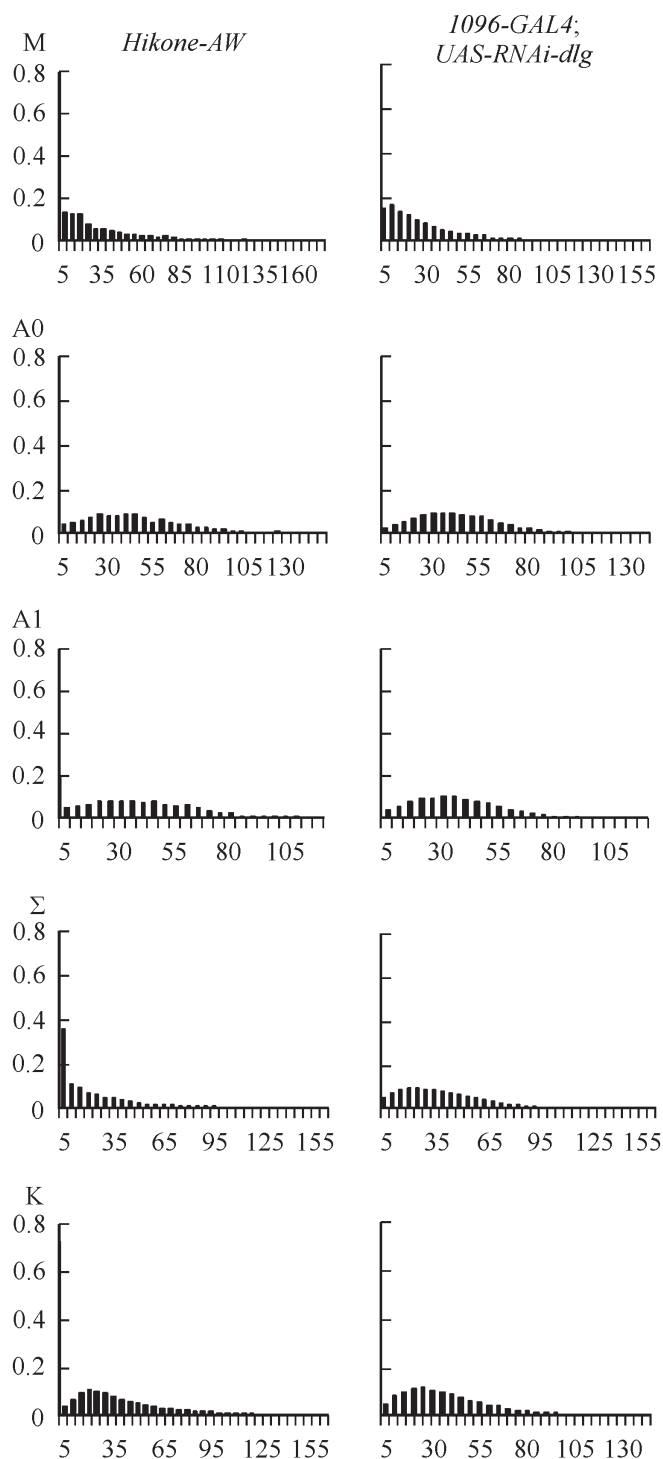


Рис. 3. Фазоспецифические гистограммы (текстуры) ядер в делящихся клетках имагинальных дисков контрольной линии *Hikone AW* (слева) и опытной линии *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* (справа).

По горизонтали — уровень сигнала флуоресценции; по вертикали — количество клеток. М — поздняя метафаза, A0 — начало анафазы, A1 — анафаза 1, Σ — усредненная текстура ядер всех диплоидных клеток в фазах бихроматидных хромосом митоза, К — тип текстуры в клетках *Hikone AW*, обработанных колхицином, и в клетках опытной линии, не подвергавшихся воздействию колхицина.

2001). Эти процессы продолжают в A1 и соответственно определяют текстуру ядра в начале расхождения хроматид к полюсам. Вместе с тем, если не игнорировать

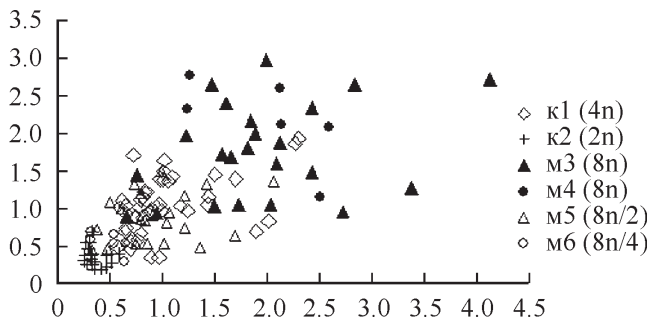


Рис. 4. Распределение реальных (1—4) и виртуальных (5—6, см. текст) ядер диплоидных клеток *Hikone AW* (к) и тетраплоидных клеток *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* (м) в зависимости от ИФ и ФО H_3 -р-гистона.

По оси абсцисс — ИФ H_3 -р, усл. ед.; по оси ординат — ФО H_3 -р, усл. ед. 1, 3, 5 — фазы митоза, характеризующиеся бихроматидными хромосомами. 2, 4, 6 — анафаза. В скобках указана ploidy реальных (4n, 2n, 8n) и виртуальных ядер (8n/2, 8n/4).

различия между текстурами ядер начала анафазы и A1, то следует допустить активацию неких других процессов, которые тоже оказывают влияние на формирование текстуры типа A1 и не проявляются в начале анафазы.

В обеих опытных линиях не обнаружено ядер с текстурами A2 и A3, характерными для контроля на выходе из анафазы, хотя учтенные нами клетки в этих случаях проходили весь путь до конца митоза, определяемый по снижению сигнала гистона H_3 -р (рис. 2). Очевидно, в A2 и A3 реализуются какие-то новые события, специфичные для этих стадий. Они определяют текстуру ядра в этих стадиях анафазы и оказывают подавленными в клетках линий *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* и *UAS-RNAi-dlg*. Спекулятивно их можно связать с завершающей фазой подготовки событий цитокинеза. Во многих системах для успешного цитокинеза необходимо выстраивание антипараллельных микротрубочек во время анафазы (см. обзор: Gatti et al., 2000). В конце митоза микротрубочки и ассоциированные с ними белки определяют место борозды дробления и участвуют в ее формировании (D' Avino et al., 2005). Совокупность литературных данных о важной роли завершающей фазы митоза в успешном цитокинезе и приведенных выше наших данных наводят на мысль о том, что возникновение двуядерных клеток в имагинальных дисках личинок линий *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* и *UAS-RNAi-dlg* обусловлено в значительной степени аномалиями в реализации событий A2 и A3.

Инактивация «микротрубочкового пути» поляризации клеточного кортекса как возможная причина патологического митоза. В качестве одной из экспериментальных моделей патологического митоза мы использовали К-митоз при обработке клеток контрольной линии *Hikone AW* колхицином. По типу текстуры ядра, по отсутствию клеток с текстурой ядра, характерной для ранних фаз митоза (т. е. для профазы, прометафазы и ранней метафазы), К-митоз существенно отличается от митоза интактной контрольной линии (Lebedeva et al., 2011). Важно, что по этим признакам наблюдается сходство между К-митозом и митозом в опытных клеточных линиях *1096-Gal4; UAS-RNAi-dlg* и *UAS-RNAi-dlg* (рис. 2, 3). Сходство в проявлении аномалий позволяет предположить возможное сходство в механизмах их реализации. Известно, что патология К-митоза обусловлена нарушением функции микротрубочек. Воз-

можность того, что аномалии митоза в имагинальных дисках личинок опытных линий объясняются дефектами микротрубочкового цитоскелета, вызванными инактивирующей конструкцией *UAS-RNAi-dlg*, представляется весьма вероятной, поскольку сходные аномалии проявляются у дрозофилы при делении нейробластов, мутантных по гену *dlg* (Siegrist, Doe, 2005, 2007). Белок Dlg входит в состав комплекса Khc—73/Dlg, координирующего кортикальную полярность клеток и полярность оси митотического веретена. Ориентация веретена и его взаимодействие с клеточным кортексом регулируются двумя белками Pins и Gai. В нейробластах дрозофилы это происходит по следующей схеме (Siegrist, Doe, 2005, 2007). Белок Dlg привязывает астральные микротрубочки к протеинам Pins/Gai. Астральные микротрубочки, кинезин Khc-73 и Dlg индуцируют кортикальную поляризацию Pins и Gai. Кортикальные белки Pins, Gai и Dlg регулируют ориентацию веретена относительно кортикальной полярности клеток. Потеря любого белка в комплексе Khc—73/Dlg/Pins/Gai нарушает ориентацию оси веретена и взаимодействие веретена с кортексом (Siegrist, Doe, 2005).

Полярность клеточного кортекса — необходимое условие нормального функционирования многих клеточных типов (Gatti et al., 2000). Клетки различаются между собой полярностью и белками, участвующими в поляризации. В нейробластах через поляризацию кортекса контролируется асимметричное деление. В клетках имагинальных дисков одной из целей поляризации кортекса является неслучайная ориентация анафазного веретена. Полученные нами данные о роли белка Dlg в реализации событий митоза и цитокинеза в имагинальных дисках указывают на тот же (или сходный) микротрубочковый путь поляризации кортекса, который, по данным литературы (Siegrist, Doe, 2005; Prehoda, 2009), отвечает за полярность кортекса в нейробластах.

Dlg является классическим неопластическим опухолевым супрессором, функционирующим в мозге и имагинальных дисках дрозофилы (Gateff, 1994). Участие белка в процессе асимметричного деления нейробластов (см. выше) обусловило интерес исследователей к изучению белка в контексте именно этого процесса. Исходя из того что белок определенно функционирует также и в имагинальных дисках, мы изучили эффект инактивирующей конструкции *UAS-RNAi-dlg* на деление клетки в крыловом имагинальном диске. На основании проведенного анализа мы полагаем, что одни и те же клеточные структуры являются «мишенями» действия белка для мозга и для имагинальных дисков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00256-а).

Список литературы

- Лебедева Л. И., Ахметьева Е. М., Омелянчук Л. В. 2010. Динамика пространственной организации хромосомного набора в клетках имагинальных дисков *Drosophila melanogaster* в норме и при действии опухолеродной мутации *Merlin*. Генетика. 46 (2) : 180—186.
- Лебедева Л. И., Дубатолова Т. Д., Омелянчук Л. В. 2011. Флуориметрические измерения позволяют выявить уровень упаковки хроматина, лежащий за пределами разрешения световой микроскопии. Цитология. 53(1) : 44—48.
- Омелянчук Л. В., Ноккала С., Маттила Я., Лебедева Л. И., Баймак Т. Ю., Ахметова К. А. 2007. Распределение

митозов в имагинальных дисках личинок *Drosophila melanogaster* третьего личиночного возраста. Генетика. 43 (7) : 1—7.

Bagasra O., Prilliman R. R. 2004. RNA interference: the molecular immune system. J. Mol. Histol. 35 : 545—553.

Bass B. L. 2000. Double-stranded RNA as template for gene silencing. Cell. 101 : 235—238.

D'Avino P. P., Savoian M. S., Glover D. M. 2005. Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy. J. Cell Sci. 118 : 1549—1558.

Dietzl G., Chen D., Schnorrer F., Su K. C., Barinova Y., Fellner M., Gasser B., Kinsey K., Oettel S., Scheiblaue S., Couto A., Massa V., Keleman K., Dickson B. J. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. Nature. 448 : 151—156.

Gateff E. 1994. Tumor suppressor genes *Drosophila melanogaster*: developmental aspects. Int. J. Develop. Biol. 38 : 565—590.

Gatti M., Giansanti M. G., Bonaccorsi S. 2000. Relationships between the central spindle and the contractile ring during cytokinesis in animal cells. Microsc. Res. Tech. 49 : 202—208.

Hariharan I. K., Bilder D. 2006. Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila*. Annu. Rev. Genet. 2006. 40 : 335—361.

Lebedeva L. I., Dubatolova T. D., Omelyanchuk L. V. 2011. Nuclear texture in mitotic cells. Cell Tissue. Biol. 5 : 568—572.

Michelotti E. F., Sanford S., Levens D. 1997. Marking of active genes on mitotic chromosomes. Nature. 388 : 895—899.

Paddison P. J., Caudy A. A., Bernstein E., Hannon G. J., Gonklon D. S. 2002. Short hairpin RNAs induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes Develop. 16 : 948—958.

Ploeger L. S., Dullens H. F. J., Huisman A., van Diest P. J. 2008. Fluorescent stains for quantification of DNA by confocal laser scanning microscopy in 3-D. Biotech. Histochem. 83 : 1—7.

Prehoda K. E. 2009. Polarization of *Drosophila* neuroblasts during asymmetric division. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1 : a001388.

Seudoux G. 2013. «Goldilocks»-suppressor screen identified web of polarity regulators. Nat. Cell Biol. 15 : 9—10.

Siegrist S. E., Doe C. Q. 2005. Microtubule-induced Pins/Gai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts. Cell. 123 : 1323—1335.

Siegrist S. E., Doe C. Q. 2007. Microtubule-induced cortical cell polarity. Genes Develop. 21 : 483—496.

Wang V. L. 2001. The mechanism of cytokinesis: reconsideration and reconciliation. Cell Struct. Funct. 26 : 633—638.

Xing H. W., Wilkerson D. C., Mayhew C. N., Libert E. J., Skaggs H. S., Googson M. L., Hong Y., Park-Sarge O. K., Sarge K. D. 2005. Mechanism of *hsp70i* gene bookmarking. Science. 307 : 421—423.

Zaidi S. K., Young D. W., Montecino M., van Wijnen A. J., Stein J. L., Lian J. B., Stein G. S. 2011. Bookmarking the genome: maintenance of epigenomic information. J. Biol. Chem. 286 : 18 355—18 361.

Поступила 28 I 2013

DROSOPHILA MELANOGASTER IMAGINAL DISCS MITOTIC ANOMALIES INDUCED BY TUMOR-SUPPRESSOR Dlg SILENCING CONSTRUCTION

L. I. Lebedeva,¹ T. D. Dubatolova,¹ L. V. Omelyanchuk^{1,2}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, and ² Novosibirsk State University; e-mail: ome@mcb.nsc.ru

Mitosis, cytokinesis and nuclear texture of wing imaginal discs cells silenced by *UAS-RNAi-dlg* construct induced by 1096-Gal4 driver were studied. The silencing construct contains coding region of *dlg* gene and the complementary region. Further, this RNA hairpin (Dietzl et al., 2007) is processed by endogenous protein Dicer and the resulting RNA fragments silence mRNA *dlg*. Tumor suppressor gene *dlg* is encoding for 21 transcripts. The construct *UAS-RNAi-dlg* inactivates 14 transcripts — RE, RH, RQ, RS, RG, RD, RL, RB, RK, RR, RT, RN, RA, RP — and does not silenced the other 7 (RO, RF, RI, RU, RJ, RC, RM). This permits to study functions of proteins containing guanilate-kinase domain IPR008145 at C-end of the protein. The most important consequences of the silencing are abnormal mitotic exit and the formation of binuclear cells. Quantitative fluorescence measurements of anti-H3-p histone and DAPI signals showed phase-specific changes in nuclear texture. The inactivation of cellular cortex polarization is the most likely target of *dlg* inactivation in mitosis.

Key words: Dlg, *UAS-RNAi-dlg*, 1086-Gal4 driver, confocal microscopy, mitosis, nuclear texture.