

УДК 591

## NO-СИНТАЗА УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ПОЛЯРИЗАЦИИ И ДВИЖЕНИЯ КЛЕТОК В МОРФОГЕНЕЗЕ *Drosophila melanogaster*<sup>1</sup>

© 2009 г. М. С. Слезингер, Б. А. Кузин

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

E-mail: tender02.idb@bk.ru

Поступила в редакцию 28.04.08 г.  
Окончательный вариант получен 23.06.08 г.

Исследовали влияние экспрессии фермента, продуцирующего окись азота, на морфогенез *Drosophila melanogaster*. Для этого использовали эктопическую экспрессию усеченной сплайс-формы фермента, негативно-доминантно подавляющей активность полноразмерной формы фермента. Показано, что подавление экспрессии фермента вызывает нарушение поляризации и движения клеток, а также плана строения органов в процессе развития *Drosophila*. Выявлено влияние продукции окиси азота на межклеточное распределение важных факторов поляризации клеток – белковых продуктов генов *Strabismus* и *Prospero*.

**Ключевые слова:** NO-синтаза, пролиферация клеток, план строения органов, поляризация клеток, движение клеток, морфогенез.

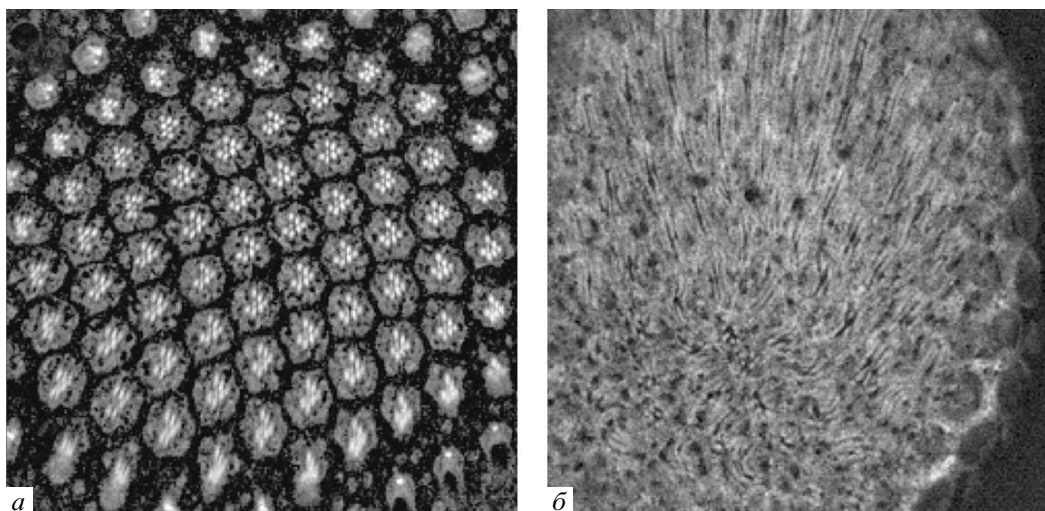
В предыдущих работах мы показали участие фермента, продуцирующего окись азота (NO) – NO-синтазы, в регуляции пролиферации клеток в процессе морфогенеза *Drosophila* (Kuzin et al., 1996, 2000; Stasiv et al., 2001, 2004). В этих публикациях было описано семейство сплайс-форм NO-синтазы и доказано, что экспрессия полноразмерной формы NO-синтазы оказывает негативное влияние на пролиферацию клеток. В то же время экспрессия усеченной сплайс-формы NO-синтазы активирует пролиферацию клеток. Был выявлен дополнительный механизм регуляции развития органов *Drosophila*, включающий уникальное взаимодействие полноразмерной формы NO-синтазы и усеченных сплайс-форм фермента на пролиферацию клеток. Важной особенностью этого механизма является регионспецифическое формирование паттерна экспрессии полноразмерных и усеченных форм NO-синтазы. Вместе с тем анализ влияния эктопической экспрессии усеченной формы NO-синтазы в процессе развития структур глаза *Drosophila* позволил предположить участие NO-синтазы не только в регуляции клеточного цикла, но и ее вовлеченность в сигнальные пути регуляции поляризации клеток и их движения в процессе реализации плана построения органов. Основанием для таких предположений явились результаты исследований на *Xenopus*, показавших

влияние NO на межклеточное распределение такого важного фактора поляризации клеток, как белок Dishevelled, и уровень активности одного из ключевых факторов движения клеток – малой ГТФазы RhoA (Peunova et al., 2007). Очевидное сходство фенотипического проявления последствий эктопической экспрессии усеченной формы NO-синтазы и RhoA (Hariharan et al., 1995; Uchida et al., 2002; Stasiv et al., 2004) в развивающихся глазных структурах *Drosophila* также послужило основанием для проверки этого предположения, результаты которого мы представляем ниже.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Линии мух.** Для эктопической экспрессии усеченной формы NO-синтазы (NOS<sub>4</sub>) в глазных имажинальных дисках, формирующих глазные структуры *Drosophila*, использовали линию мух GMR NOS<sub>4</sub>. Ее получение описано ранее (Stasiv et al., 2004). Эктопическую экспрессию в крыловых и антенных имажинальных дисках мух вызывали путем скрещивания линии UAS NOS<sub>4</sub> с линиями GAL4 Apter, GAL4 vg и GAL4 Dll. 12 трансгенных линий UAS NOS<sub>4</sub> получены с использованием процедур, описанных для линии мух GMR NOS<sub>4</sub> (Stasiv et al., 2004), а линии мух GAL4 Apter, GAL4 vg и GAL4 Dll получены из Университета Индианы (*Drosophila* stock center Indiana University).

<sup>1</sup> Работа поддержана Программой Президиума РАН “Биоразнообразие и динамика генофондов” (подпрограмма “Динамика генофондов”).



**Рис. 1.** Конфокальные изображения тангенциального гистологического среза сетчатки у *Drosophila* дикого типа WT (а) и GMR NOS<sub>4</sub> (б). В сетчатке мух WT видна строго организованная рядность омматидиев и трапециевидно построенные группы фоторецепторных клеток, точечная проекция последних свидетельствует о апикально-базальной ориентации клеточных структур. В сетчатке мух GMR NOS<sub>4</sub> большинство фоторецепторных клеток представлены в виде извилистых прерванных линий, что свидетельствует об их неправильной апикально-базальной ориентации.

*Гистология и иммуногистохимия.* Структуры крыльев и антенн анализировали при помощи светового микроскопа DM RXA2 (“Leica”, Германия). Срезы глазных структур получали по описанной ранее методике (Carthew, Rubin, 1990), а затем анализировали автофлуоресцентное свечение при помощи конфокального микроскопа DM IRBE (“Leica”, Германия). F-актин выявляли при помощи фаллоидина, связанного с флуоресцентно-меченым антителом, как описано (Hariharan et al., 1995), и анализировали при помощи конфокального микроскопа. Иммуногистохимическое окрашивание глазных имажинальных дисков выполняли по стандартной процедуре и также анализировали с помощью конфокального микроскопа. Использовали антитела к антигенам *Sibm* (предоставлены Т. Wolff), *Baz* (предоставлены А. Wodarz) и *Flam*, *Prospero* (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, США).

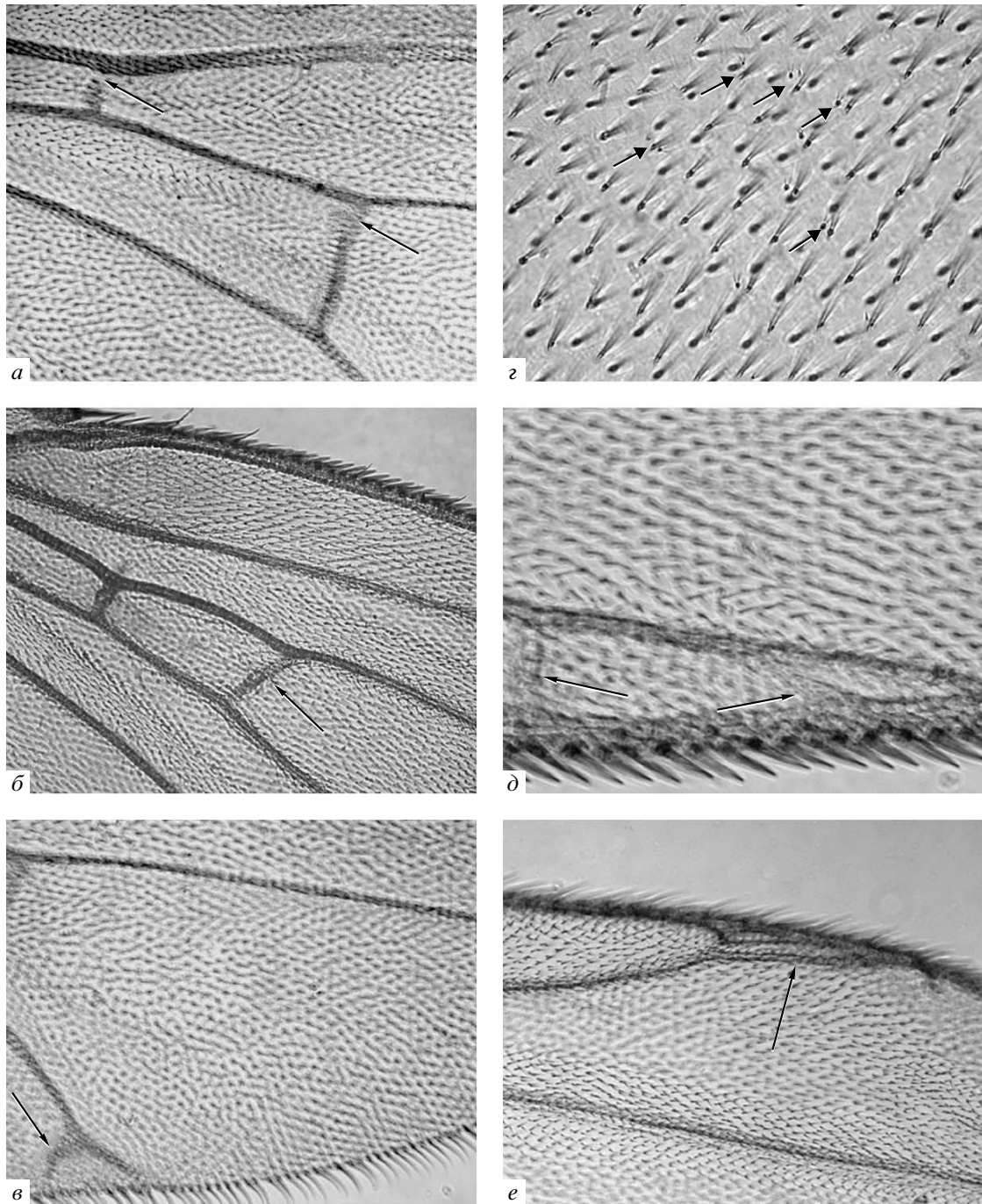
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Описанные нами ранее фенотипические проявления эктопической экспрессии NOS<sub>4</sub> (Stasiv et al., 2004) свидетельствовали не только о нарушении клеточного цикла у трансгенных мух, но и о нарушении движения клеток, формирующих глазные структуры *Drosophila*. В связи с этим мы проанализировали гистологические срезы глаза имаго у трансгенных мух линии GMR NOS<sub>4</sub>. У мух этой линии под влиянием промотора GMR в глазном имажинальном диске позади морфогенетической бо-

розды экспрессируется NOS<sub>4</sub>. Анализ полученных срезов выявил драматические нарушения архитектуры глаза (рис. 1): сетчатка у таких мух заметно тоньше, чем у особей дикого типа WT. Решетка, формируемая пигментными клетками, отсутствует. Пигментные клетки видны только в апикальной зоне сетчатки. Рецепторные клетки извилистые. Обнаруживаемые фенотипические особенности архитектуры глазных структур трансгенных мух GMR NOS<sub>4</sub> являются свидетельством нарушения полярности и движения клеток.

Свидетельства нарушения полярности клеток и плана строения других органов *Drosophila* мы обнаружили и у мух, полученных в системе экспрессии UAS/GAL4. У особей GAL4 Apter/UAS NOS<sub>4</sub> и GAL4 vg/UAS NOS<sub>4</sub> мы наблюдали различные нарушения плана строения крыла, среди которых прежде всего нужно отметить появление эктопических вен и клеток, имеющих два–три первичных волоска или сателлитные зачатки волосков (рис. 2).

У имаго GAL4 Dll/UAS NOS<sub>4</sub> мы наблюдали нарушения плана строения дистальных структур антенны – отсутствие проксимального членика аристы. Он трансформировался в конический вырост третьего членика антенны (Ant III) (рис. 3). Его поверхность, покрытая волосками, полностью соответствует Ant III. Нарушение развития структуры аристы у куколки GAL4 Dll/UAS NOS<sub>4</sub> обнаруживается уже через 22 ч после формирования пупария (ПФП). Аристальный вырост Ant III

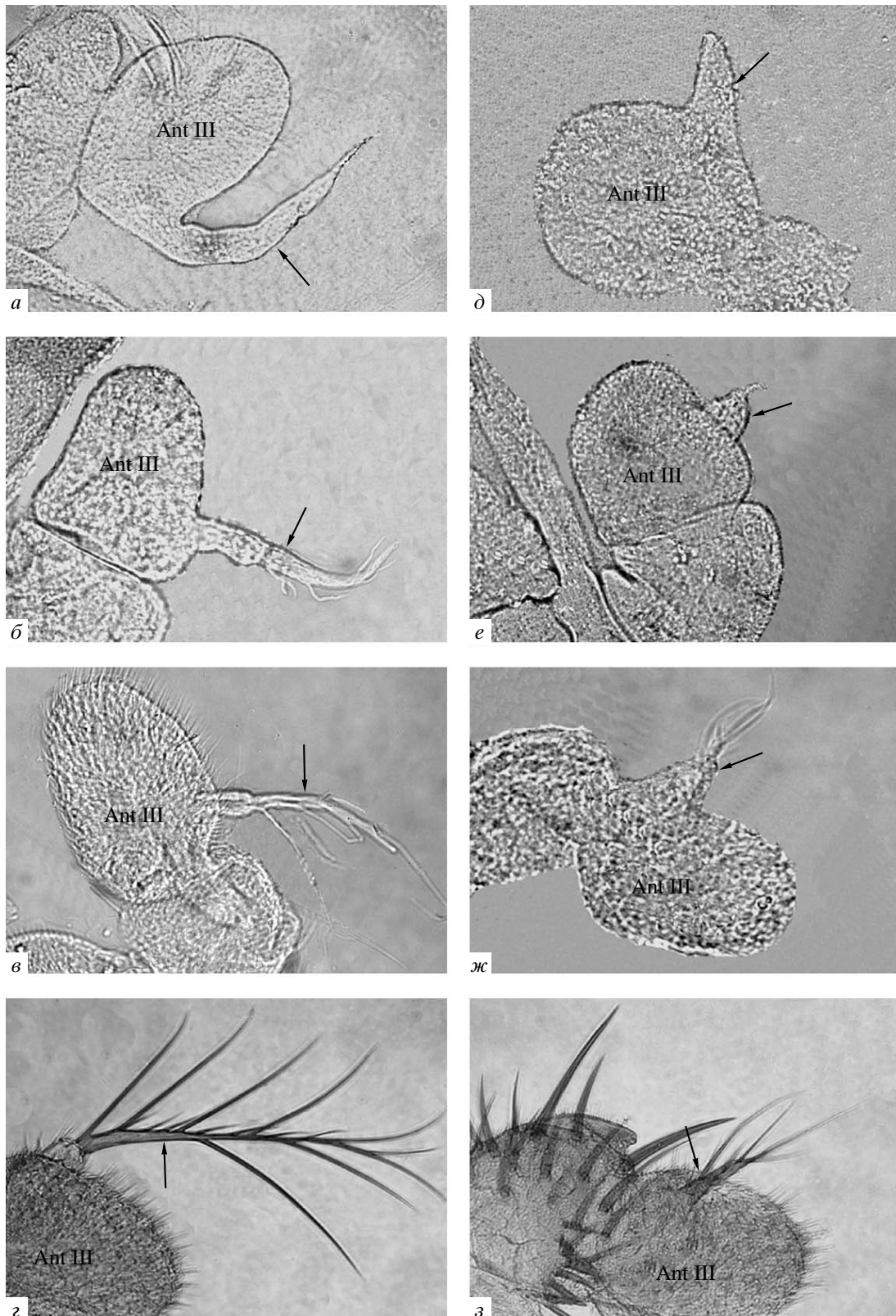


**Рис. 2.** Крыловые структуры мух  $GAL4 Apter/UAS NOS_4$  (a, в–e) и  $GAL4 vg/UAS NOS_4$  (б).

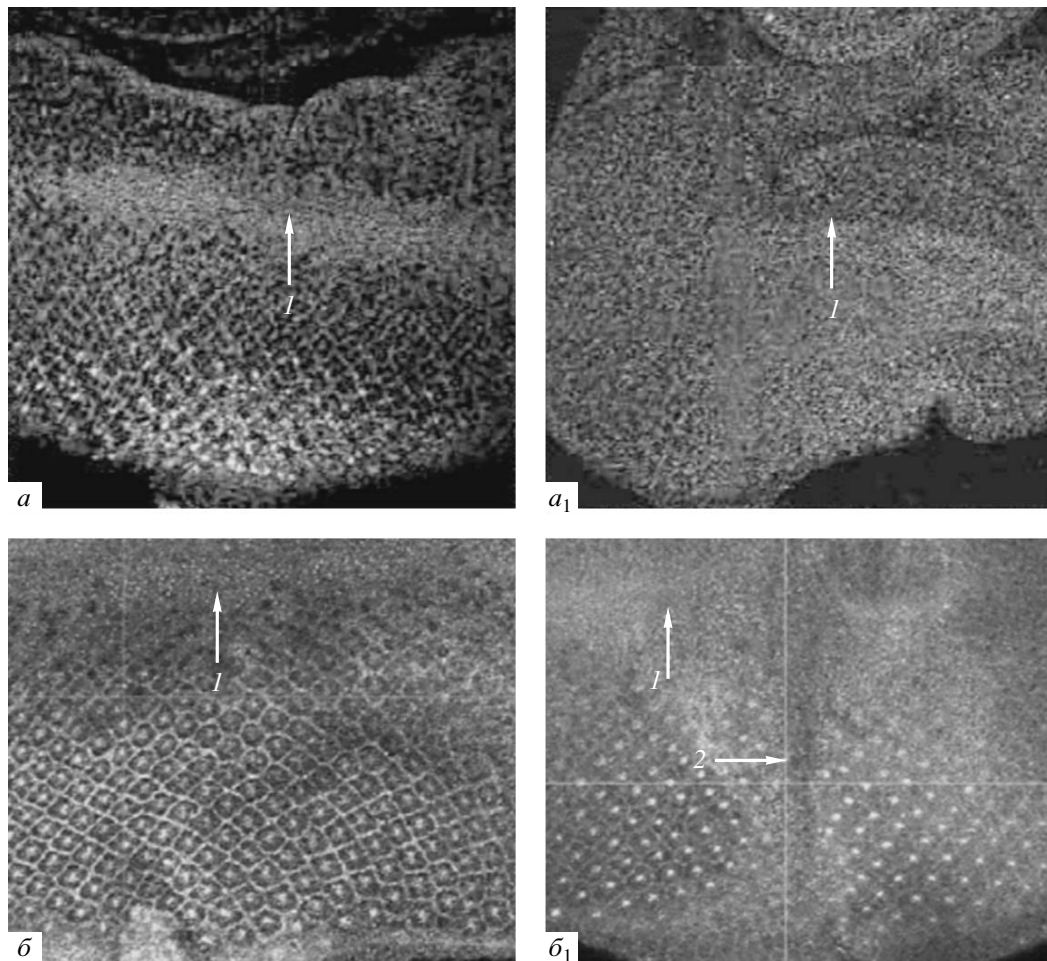
( $\longrightarrow$ ) – эктопические венозные структуры (б, в, д, e) и недостаточность венозных структур (a); ( $\longrightarrow$ ) – клетки с удвоенными или утроенными волосками (z).

у куколок дикого типа WT вытягивается существенно длиннее, чем у  $GAL4 Dll/UAS NOS_4$ , и в нем отчетливо видно разделение на проксимальный и дистальный сегменты. У  $GAL4 Dll/UAS$

$NOS_4$  в аристалном выросте Ant III через 22 ч ПФП отсутствуют признаки сегментации. У мух дикого типа WT через 32 ч ПФП на дистальной стороне аристалного выроста появляются при-



**Рис. 3.** Структуры аристы (→) на разных стадиях развития мух дикого типа WT (a–z) и GAL4 DII/UAS NOS<sub>4</sub> (д–з). Стадии развития куколки: a, д – 22; б, e – 32; в, ж – 44 ч после формирования пупария; z, з – имаго. Ant III – третий членик антенны.



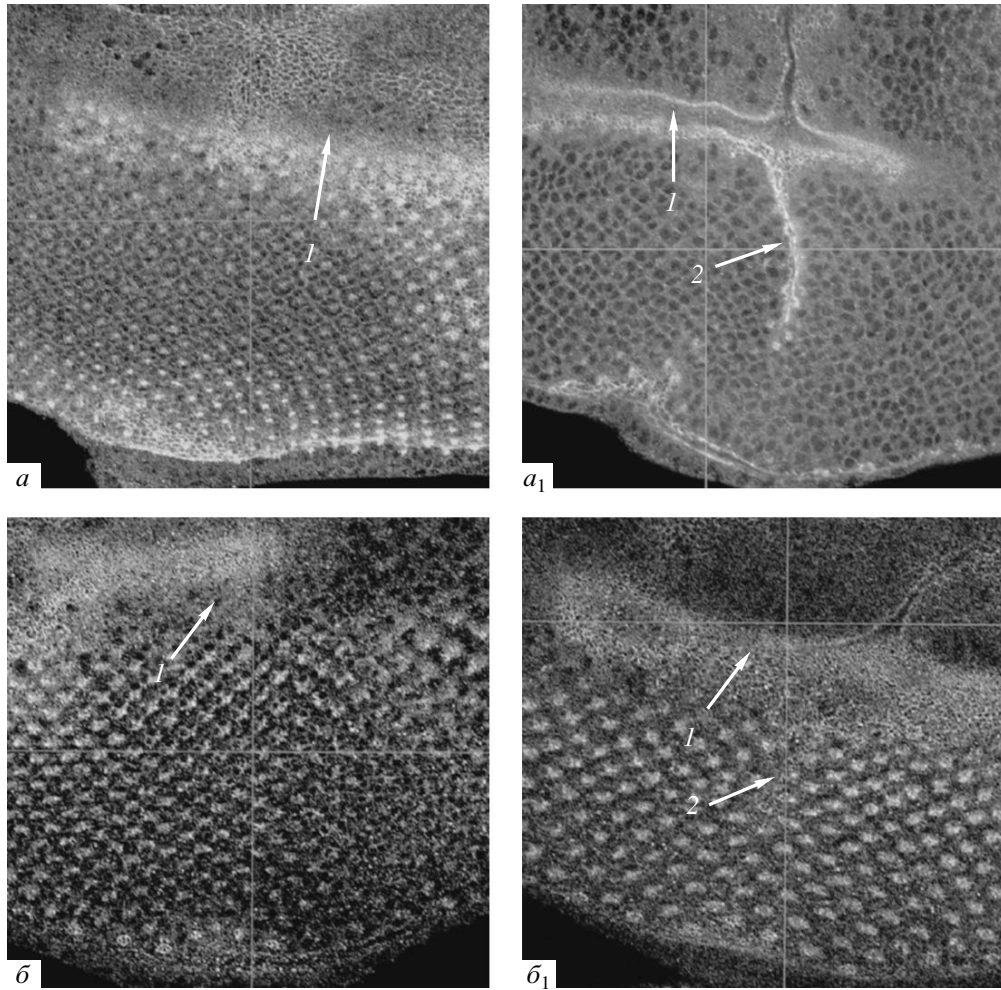
**Рис. 4.** Конфокальные оптические срезы глазных имагинальных дисков личинок дикого типа WT (*a, б*) и GMR NOS<sub>4</sub> (*a<sub>1</sub>, б<sub>1</sub>*), иммуногистохимическое окрашивание антителами к антигенам *Prospero* (*a, a<sub>1</sub>*) и *Strabismus* (*б, б<sub>1</sub>*). 1 – морфогенетическая борозда, 2 – структурные нарушения в экваториальной области глазных имагинальных дисков.

знаки ветвления, а у особей GAL4 DII/UAS NOS<sub>4</sub> этого возраста в аристалльном выросте признаки ветвления отсутствуют. К 44 ч ПФП структурные отличия аристалльных выростов у мух WT и GAL4 DII/UAS NOS<sub>4</sub> соответствуют тому, что наблюдается у имаго. Аристалльные выросты у особей WT этого возраста имеют ветви не только на дистальной стороне, но и в среднем, и в проксимальном отделах. Аристалльные же выросты у мух GAL4 DII/UAS NOS<sub>4</sub> этого возраста, так же как и у имаго, не сегментированы, но имеют пучок ветвей аристы на дистальном конце Ant III (рис. 3).

Изложенные выше фенотипические проявления эктопической экспрессии конструкции UAS NOS<sub>4</sub> являются свидетельством нарушения поляризации и движения клеток в органогенезе *Drosophila*, последствием чего становится нарушение плана строения органов. В связи с этим возникла

необходимость проверки действия в процессе органогенеза хотя бы некоторых из основных факторов регуляции поляризации клеток. Для этого мы использовали иммуногистохимическое окрашивание глазных имагинальных дисков антителами к антигенам *Stbm*, *Baz*, *Flam*, *Prospero*. Анализ конфокальных оптических срезов глазных имагинальных дисков GMR NOS<sub>4</sub>, окрашенных иммуногистохимически при помощи перечисленных антител, выявил некоторые нарушения в их распределении. Такие нарушения можно считать предвестниками драматических нарушений структур глаза, которые продемонстрированы на рис. 1. Результаты иммуногистохимического окрашивания глазных имагинальных дисков особей WT и GMR NOS<sub>4</sub> антителами к антигенам *Stbm*, *Baz*, *Flam* и *Prospero*, представленные на рис. 4, показали, что предвестник этих нарушений можно обнаружить уже в 3-м личиночном периоде. Окраска анти-





**Рис. 5.** Конфокальные оптические срезы глазных имагинальных дисков личинок дикого типа WT (*a, б*) и GMR NOS<sub>4</sub> (*a<sub>1</sub>, б<sub>1</sub>*), иммуногистохимическое окрашивание антителами к антигенам *Baz* (*a, a<sub>1</sub>*) и *Flam* (*б, б<sub>1</sub>*). *1* – морфогенетическая борозда, *2* – структурные нарушения в экваториальной области глазных имагинальных дисков.

телями *Stbm* и *Prospero* показала, что нарушено их распределение внутри клеток глазных имагинальных дисков GMR NOS<sub>4</sub> (рис. 4). В имагинальных дисках WT антитела *Stbm* привязаны к апикальной стороне клеточной мембраны, а в глазных имагинальных дисках GMR NOS<sub>4</sub> они распределены по всей площади клеток. Сходные нарушения внутриклеточного распределения в глазных имагинальных дисках GMR NOS<sub>4</sub> обнаружены и с помощью антител к *Prospero*. Окраска антителами *Baz* и *Flam*, а также фаллоидином, хотя и не показала нарушений в распределении антигенов внутри клеток, но выявила в экваториальной области глазных имагинальных дисков GMR NOS<sub>4</sub>, позади морфогенетической борозды, область клеток с нарушением рядности. Яркое проявление этих нарушений в морфологии клеток и характере рас-

пределения антител в них мы демонстрируем на примере окраски антителами *Baz* (рис. 4, 5). Окраска клеток антителами *Baz* в этой области соответствует тому, что наблюдается в клетках, находящихся внутри морфогенетической борозды.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Совокупность выявленных нарушений полярности клеток и плана строения органов свидетельствует о вовлеченности NOS в сигнальные пути регуляции не только клеточных делений, но и движения клеток и их полярности. К этому выводу мы приходим при изучении результатов анализа фенотипических нарушений, вызванных эктопической экспрессией NOS<sub>4</sub>. Характер нарушения формирования волосков и вен в крыловых

имагинальных дисках в результате эктопической экспрессии NOS<sub>4</sub> сходен с последствиями нарушения экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию процессов поляризации клеток и их движения в процессе морфогенеза – *Drok* (Winter et al., 2001), *fz* (Krasnow, Adler, 1994) и *four-jointed* (Zeidler et al., 2000). Описываемые нами нарушения глазных структур, вызванные эктопической экспрессией NOS<sub>4</sub>, сходны также с описанными последствиями эктопической экспрессии гена *RhoA* (Hariharan et al., 1995). Особо нужно отметить выявленные нарушения клеточных рядов в экваториальной области глазного имагинального диска: у мух WT по мере удаления от морфогенетической полосы происходит их функциональная идентификация в соответствии с планом построения глаза в этой области. В глазных имагинальных дисках GMR NOS<sub>4</sub> этот процесс явно нарушается, чему свидетельством служит изменение паттерна распределения антител к антигенам *Stbm*, *Baz*, *Flam* и *Prospero* в экваториальной области. Можно предположить, что одной из причин демонстрируемых нами изменений полярности клеток и плана строения органов *Drosophila* является нарушение процессинга белков *Stbm* и *Prospero*. Наблюдаемое нарушение внутриклеточного распределения антител к этим белкам, по-видимому, является следствием потери ими способности вовлекаться в функциональные комплексы. Вероятно, активность NOS является необходимым фактором их функционального созревания. Учитывая то, что NOS-активность необходима также для функционального созревания белка *Dsh* (Peunova et al., 2007), можно оценивать ее как фактор регуляции сигнальных путей RhoA-ROCK и Ras-МАРК, контролирующих не только деления клеток в процессе морфогенеза высших животных, но и их поляризацию и миграцию.

Продемонстрированные результаты расширяют наши представления о степени вовлеченности NOS в функциональное созревание белков, контролирующих процессы поляризации клеток и их миграцию, что усиливает ее значение как фактора влияния на морфогенетические процессы.

*Авторы благодарны Ю. Стасиву и А. Кузину за помощь в получении трансгенных линий мух, Е. Цитрину и Д. Гуляеву – за помощь в микроскопических исследованиях, Н. Пеуновой и Г. Ениколопову – за творческое обсуждение работы на всех этапах ее выполнения.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Carthew R., Rubin G.* *seven in absentia*, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila eye* // *Cell*. 1990. V. 63. P. 561–577.
- Hariharan I., Kang-Quan Hu, Asha H. et al.* Characterization of rho GTPase family homologues in *Drosophila melanogaster*: overexpressing Rho1 in retinal cells causes a late developmental defect // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 292–302.
- Krasnow R., Adler P.* A single *frizzled* protein has a dual function in tissue polarity // *Development*. 1994. V. 120. P. 1883–1893.
- Kuzin B., Roberts I., Peunova N., Enikolopov G.* Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development // *Cell*. 1996. V. 87. P. 639–649.
- Kuzin B., Regulski M., Stasiv Y. et al.* Nitric oxide intersects with retinoblastoma pathway to control eye development in *Drosophila* // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. P. 459–462.
- Peunova N., Sheinker V., Ravi K., Enikolopov G.* Nitric oxide coordinates cell proliferation and cell movements during early development of *Xenopus* // *Cell Cycle*. 2007. V. 6. P. 3132–3144.
- Stasiv Y., Regulski M., Kuzin B. et al.* The *Drosophila* nitric oxide synthase gene (*dNOS*) encodes a family of proteins that can modulate NOS activity by acting as dominant negative regulators // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 42241–42251.
- Stasiv Y., Kuzin B., Regulski M. et al.* Regulation of mRNAs via truncated isoforms: a novel mechanism to control nitric oxide signaling // *Genes Devel.* 2004. V. 18. P. 1812–1823.
- Uchida M., Hanai S., Uematsu N. et al.* Overexpression of poly(ADP-ribose) polymerase disrupts organization of cytoskeletal F-actin and tissue polarity in *Drosophila* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 6696–6702.
- Winter C., Wang B., Ballew A. et al.* *Drosophila* Rho-associated kinase (*Drok*) links Frizzled-mediated planar polarity signaling to the actin cytoskeleton // *Cell*. 2001. V. 105. P. 81–91.
- Zeidler M., Perrimon N., Strutt D.* Multiple roles for *four-jointed* in planar polarity and limb patterning // *Devel. Biol.* 2000. V. 228. P. 181–196.

## Nitric Oxide Synthase Mediates Regulation of Cell Polarity and Movement during *Drosophila melanogaster* Morphogenesis

M. S. Slezinger and B. A. Kuzin

*Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia  
e-mail: tender02.idb@bk.ru*

**Abstract**—The effect of expression of the enzyme producing nitric oxide on *Drosophila melanogaster* morphogenesis was studied using ectopic expression of a truncated splice form of the enzyme that has a dominant negative effect on the full-length enzyme form. The suppressed enzyme expression was shown to affect the cell polarity and movement as well as the structural pattern of organs during *Drosophila* development. The effect of nitric oxide production on the intercellular distribution of significant factors of cell polarity, protein products of the *Strabismus* and *Prospero* genes, has been revealed.

*Key words:* NO synthase, cell proliferation, structural pattern of organs, cell polarity, cell movement, morphogenesis.