

УДК 577.218

Молекулярные механизмы гемопоэза дрозофилы

С. А. Синенко

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

E-mail: s.sinenko@incras.ru

Поступила в редакцию 05.04.2024

Принята к печати 31.05.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27410

РЕФЕРАТ Модельный организм – плодовая мушка *Drosophila melanogaster* – занял одно из ведущих мест в современных биологических исследованиях. Генетическая модельная система дрозофилы имеет ряд преимуществ, позволяющих ей лидировать в исследовании молекулярных механизмов процессов развития многоклеточных организмов. За последние два десятилетия достигнут существенный прогресс в изучении механизмов, регулирующих гемопоэз, или кроветворение у дрозофилы. В данном обзоре обсуждаются основные достижения в понимании молекулярных механизмов, участвующих в поддержании популяции мультипотентных прогениторных клеток и их дифференцировки в зрелые гемоциты, в гемопоэтическом органе личинки дрозофилы. Использование гемопоэтического органа дрозофилы в качестве модельной системы гемопоэза позволило охарактеризовать сложные взаимодействия между сигнальными путями и транскрипционными факторами в регуляции поддержания и дифференцировки прогениторных клеток посредством сигналов из гемопоэтической ниши, аутокринных и паракринных сигналов и сигналов, исходящих от дифференцированных клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гемопоэз, кроветворение, гемопоэтический орган, мультипотентность, гемопоэтические стволовые клетки, гемопоэтическая ниша, дрозофила, *Drosophila melanogaster*, гемоциты, дифференцировка, сигнальные пути, транскрипционные факторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГО – гемопоэтический орган (lymph glands); ДС – дорсальный сосуд (dorsal vessel); ППГ – препрогемоциты; ПГ – прогемоциты; ПроПГ – промежуточные прогемоциты; ЗСЦ – задний сигнальный центр (posterior signaling center); МЗ – медуллярная зона (medullary zone); КЗ – корковая зона (cortical zone); ПЗ – промежуточная зона (intermediate zone); ПЛ – плазматоциты (PL); КК – кристаллические клетки (CC); ЛМ – ламеллоциты (LM); АФК – активные формы кислорода; АМП – антимикробные пептиды; ВКМ – внеклеточный матрикс; UAS – активирующая последовательность (upstream activation sequence); scRNAseq – секвенирование РНК одиночных клеток (single-cell RNA sequencing); ГСК – гемопоэтические стволовые клетки; СК – стволовые клетки; АМГК – аортально-мезонефрально-гонадный комплекс; Odd – Odd-skipped; Crq – Croquemort; ТФ – транскрипционный фактор; Antp – Antennapedia; NimC1 – Nimrod C1; Col – Collier; Hth – Homothorax; Tin – Tinman; Pnr – Pannier; FGFR – рецептор фактора роста фибробластов; Htl – Heartless; Dpp – Decapentaplegic; Wg – Wingless; Hh – Hedgehog; Ser – Serrate; Dome – Domeless; E-кад – E-кадгерин; Vkg – Viking; Hml – Hemolletectin; PPO – профенолоксидаза; Lz – Lozenge; Hnt – Hindsight; Fz – Frizzled; Dot – Dorothy; Mad – mothers against dpp; Sd – Scalloped; Ptc – Patched; Ci – Cubitus interruptus; EGFR – рецептор эпидермального ростового фактора; TGF-beta – трансформирующий фактор роста бета; PCP – planar cell polarity; FGF – фактор роста фибробластов; Upd1–3 – Unpaired 1–3; FoxO – forkhead box protein O; Adgf-A – аденозиндезаминаза ростового фактора-A; AdoR – рецептор аденозина; PKA – протеинкиназа A.

ВВЕДЕНИЕ

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* является модельным организмом, который широко используется в генетических исследованиях в клеточной биологии, биологии развития и иммунологии. Более 100 лет прошло с того момента, когда Томас Хант Морган начал использовать эту модельную систе-

му в генетических исследованиях [1, 2]. При проведении генетических и биомедицинских исследований дрозофила имеет ряд преимуществ, в число которых входят (1) минимальный набор хромосом – всего четыре пары, три из которых (X/Y, II, III) содержат практически все гены данного организма. (2) Полностью секвенированный и аннотированный

геном дрозофилы состоит приблизительно из 13767 генов и характеризуется минимальным количеством дублированных генов и минимальной геной избыточностью. (3) Хорошо разработаны методы получения мутантных линий дрозофилы – с помощью химического, изотопного, транспозонного (P-элемент) и CRISPR/Cas9-опосредованного мутагенеза, UAS/Gal4-опосредованной системы условной инактивации экспрессии генов с помощью интерферирующих РНК (RNAi) и эктопической экспрессии генов, а также линий с визуализацией интересующих тканей [3–11]. Методы направленной инактивации гена позволяют использовать подходы обратной генетики, которые заключаются в инактивации интересующего гена с исследованием его фенотипа/функции в живом организме. На дрозофиле можно проводить обширные генетические скрининги с использованием методов прямой генетики: идентификации мутаций и функций гена после обнаружения интересующего фенотипа [12–14], и модифицированных генетических скринингов, направленных на определение генов, вовлеченных в интересующий процесс [15–17]. (4) Международные центры хранения обширных коллекций мутантных линий дрозофилы, включая коллекции генетических делеций, точечных мутаций и линий P-транспозонов, CRISPR/Cas9, промоторов-Gal4, UAS-RNAi и UAS-трансгенов. (5) Стабильная система поддержания мутаций с помощью балансирующих хромосом и комбинирование мутаций с использованием мейотической рекомбинации. (6) Возможность исследования фенотипа на уровне организма *in vivo*. (7) Мушка имеет короткий жизненный цикл (30 дней), удобные и относительно недорогие условия содержания и оборудования для поддержания и хранения мутантных линий дрозофилы. Недостатками данной модельной системы являются: (1) огромная эволюционная дистанция между насекомыми и млекопитающими и, соответственно, недостаточная гомология на генетическом и физиологическом уровнях; (2) малый размер организма и трудоемкость работы с тканями дрозофилы; (3) ограниченная возможность использования биохимических и иммунохимических методов.

В качестве модельной системы дрозофила интенсивно используется в течение последних 50 лет практически во всех областях современной биологии, начиная с расшифровки молекулярного механизма апоптоза и заканчивая механизмами старения [3, 18–23]. В свою очередь, данная система широко используется для исследования молекулярных механизмов кроветворения, или гемопоэза и гуморального и клеточного ответов врожденного

иммунитета. Термин кроветворение, или гемопоэз, обозначающий процесс образования, развития и созревания клеток крови, исторически относится к клеткам крови позвоночных животных. Гемопоэз позвоночных теплокровных животных поддерживается гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК), которые дают начало ряду мультипотентных и ограниченных гемопоэтических предшественников, дифференцирующихся во все виды клеток крови: эритроциты, тромбоциты, лейкоциты и лимфоциты. У беспозвоночных целомических организмов, к которым относится дрозофила, внутренняя полость тела содержит целомическую жидкость, или гемолимфу, содержащую гемоциты – аналоги клеток крови теплокровных организмов [24–27]. Гемопоэз дрозофилы – это процесс поддержания мультипотентных прогениторных клеток и их дифференцировки в три типа зрелых гемоцитов, происходящий в нескольких частях организма в течение стадий жизненного цикла. Важно отметить, что гемоциты насекомых функционально гомологичны миелоидным клеткам врожденного иммунитета позвоночных, параллельно возникшим в эволюции [28].

Двукрылые насекомые имеют четыре стадии жизненного цикла: эмбриональную, личиночную, стадии куколки и имаго. Основными биологическими функциями гемоцитов дрозофилы являются защитная, включающая неспецифические гуморальный и клеточный иммунные ответы, участие в регенеративных процессах, а также функция чистильщика от погибших клеток в процессе онтогенеза. У дрозофилы известны три линии зрелых клеток гемолимфы: плазматоциты, кристаллические клетки и ламеллоциты. На личиночной стадии наблюдается значительный рост и морфогенетические изменения организма, сопровождающиеся активной защитой от патогенных микроорганизмов. На этой стадии, которая широко используется для исследования гемопоэза, процесс гемопоэза происходит в гемопоэтическом органе (ГО), в котором можно наблюдать временную и пространственную динамику поддержания прогениторных клеток и их дифференцировки во все типы зрелых гемоцитов. Изучение гемопоэза дрозофилы показало, что механизм поддержания мультипотентных предшественников гемоцитов у дрозофилы и ГСК у млекопитающих существенно различается. Гемопоэтическая система дрозофилы не имеет (или пока не обнаружены) *bona fide* мультипотентных стволовых клеток, аналогичных клеткам позвоночных, у которых такие клетки поддерживаются на протяжении всей жизни. Использование преимуществ генетической модельной системы

дрозофилы позволило существенно продвинуться в расшифровке и понимании молекулярных механизмов гемопоэза. Исследования двух последних десятилетий показали, что молекулярные механизмы поддержания прогениторных клеток и их дифференцировки в различные линии гемоцитов имеют некоторую аналогию с путями регуляции процессов дифференцировки миелоидных клеток млекопитающих [27, 29]. На сегодняшний день опубликован ряд исчерпывающих обзорных статей, освещающих многие вопросы данной области исследования [27, 29–34]. В настоящем обзоре обсуждаются основные достижения в исследовании молекулярных механизмов кроветворения в гемопоэтическом органе дрозоды, что включает регуляцию поддержания мультипотентных прогениторных клеток и их дифференцировки с помощью транскрипционных факторов, сигнальных путей, метаболических и внешних факторов.

УЧАСТКИ ГЕМОПОЭЗА ДРОЗОФИЛЫ

Образование ранних клеток-предшественников, или препрогемоцитов, дрозоды происходит в двух независимых участках мезодермы эмбриона – в головной и дорсальной мезодерме. Соответственно, кроветворение у дрозоды происходит двумя независимыми путями или «волнами». В первом случае клетки головной мезодермы раннего эмбриона дают начало прогемоцитам эмбриона, которые далее поддерживаются и дифференцируются в зрелые линии гемоцитов, находящиеся в свободной циркуляции гемолимфы и называются циркулирующими гемоцитами [35–38]. Прогемоциты и их производные данного происхождения поддерживаются в циркулирующей гемолимфе на всех последующих стадиях жизненного цикла насекомого. Вторая волна гемопоэза происходит в дорсальной мезодерме, где формируется дорсальный «кровеносный» сосуд, или «аорта» (ДС, dorsal vessel), и гемопоэтический орган (первоначально названный lymph gland) (рис. 1), однако термин ГО наиболее точно соответствует данному органу [39–41]. ГО представлен парным тканевым образованием, состоящим из гемоцитов и их предшественников, ограниченных оболочкой внеклеточного матрикса. На личиночной стадии ГО является главным местом поддержания прогемоцитов и их дифференцировки в зрелые гемоциты. При этом гемоциты не покидают ГО до начала стадии куколки. Параллельно в гемолимфе на протяжении всех личиночных стадий находятся все типы циркулирующих гемоцитов. ГО распадается на начальной стадии куколки и высвободившиеся из него гемоциты смешиваются с циркулирующими гемо-

цитами. Таким образом, прогемоциты и гемоциты, происходящие из обеих участков мезодермы, существуют на постличиночных стадиях жизненного цикла дрозоды [36, 38, 42, 43].

ГЕМОЦИТЫ ДРОЗОФИЛЫ

Зрелые гемоциты дрозоды представлены тремя морфологически различными типами. Плазматоциты (ПЛ) – фагоцитарные клетки, осуществляющие защитные, антимикробные и регуляторные функции, составляют примерно 90–95% гемоцитов. Кристаллические клетки (КК) – нефагоцитирующие клетки, составляющие 2–5% гемоцитов, принимают участие в процессах заживления ран, реакциях врожденного иммунитета и гипоксии. Третий тип гемоцитов – ламеллоциты (ЛМ) – гигантские специализированные клетки, которые дифференцируются только в ответ на внедрение паразитарных организмов или в ответ на повреждение тканей (рис. 1Б'). Эти типы клеток были выявлены в результате ультраструктурных исследований, а затем подтверждены по функциональной активности и молекулярным маркерам. На основании обширных исследований определены сигнальные пути и транскрипционные факторы, обеспечивающие спецификацию, дифференцировку и поддержание данных клеточных линий (см. обзоры [27, 29, 32]). Кроме того, с помощью метода секвенирования РНК единичных клеток (single-cell RNA sequencing, scRNAseq) обнаружено большое разнообразие подгрупп циркулирующих гемоцитов. С помощью нескольких экспериментальных подходов определены восемь подгрупп гемоцитов, выполняющих различные функции [44–47]. В ГО были идентифицированы также ранее не описанные типы клеток: ранние предшественники, или препрогемоциты (ППГ), и подтип плазматоцитов – адипогемоциты [43]. Однако на сегодняшний день многие недавно идентифицированные подгруппы гемоцитов остаются недостаточно охарактеризованными, и их молекулярные и функциональные особенности нуждаются в дальнейшем изучении.

Плазматоциты

Плазматоциты – основной тип клеток крови дрозоды, осуществляющих защитные, иммунные и гомеостатические функции. Эти клетки представляют собой фагоциты, они участвуют в инактивации патогенных микроорганизмов и утилизации апоптотических клеток в процессе развития организма [26, 48–50]. Плазматоциты осуществляют фагоцитоз посредством рецепторов Croquemort (Crq), Eater и Nimrod C1 (NimC1) [51–54] и выпол-

няют защитные функции, секретируя антимикробные пептиды (АМП) (рис. 1Б', табл. 1) [55–57]. Данные клетки секретируют белки внеклеточного матрикса (ВКМ), коллаген IV, перлекан и ламинин А, способствуя формированию тканей [58, 59], а также фермент пероксидазин (Peroxidasin, Pxn) [60], удаляющий свободные радикалы. Отсутствие плазматоцитов в процессе эмбриогенеза вызывает дефекты органогенеза, ведущие к снижению жизнеспособности эмбрионов [61–64]. Идентификация с помощью scRNAseq молекулярных маркеров позволила выделить четыре подтипа плазматоцитов: PL1–4 (рис. 1Б') [43].

Кристаллические клетки

Кристаллические клетки содержат, как следует из их названия, кристаллы профенолоксидаз 1 и 2 (PPO1 и 2), которые участвуют в реакции меланизации. Эти клетки вовлечены в защитные реакции при повреждении тканей, а также во врожденном иммунном ответе, в первую очередь, за счет активации биохимического каскада меланизации [65–68], функционально схожего с каскадом тромбообразования у млекопитающих. При меланизации наблюдается потемнение и отверждение поврежденных тканей, что сопряжено с продукцией активных форм кислорода (АФК), способствующих нейтрализации патогенов и заживлению поврежденных тканей (рис. 1Б') [55, 65, 66, 69]. Подавление меланизации задерживает заживление поврежденных тканей [70–72] и снижает восприимчивость к микробным инфекциям [65, 66]. КК не обладают фагоцитирующей активностью, они экспрессируют специфические молекулярные маркеры и пролиферируют под действием определенных сигналов (см. далее, рис. 1Б', табл. 1). С помощью scRNAseq выявлены два подтипа кристаллических клеток: CC1 и 2 [43].

Ламеллоциты

Ламеллоциты – это большие плоские клетки, дифференцировка которых индуцируется вследствие сигналов, вызванных внедрением паразитарных организмов или при повреждении тканей. Клеточный иммунный ответ у дрозофилы опосредуется именно ламеллоцитами и в основном направлен на инактивацию яиц паразитических ос (*Leptopilina bouvardi*) посредством их инкапсуляции [73, 74]. Плазматоциты прикрепляются к поверхности инородного объекта, а затем дифференцируются в ламеллоциты [75]. Зрелые ламеллоциты экспрессируют специфические молекулярные маркеры, они не способны делиться и фагоцитировать (рис. 1Б', табл. 1) [13, 26, 30, 51, 55, 66, 75–81]. При помощи

scRNAseq в ГО выявлены два подтипа ламеллоцитов: LM1 и 2 [43].

Особенности стволовых клеток гемопоэтической системы дрозофилы: прогемоциты

Гемопоэтические стволовые клетки млекопитающих являются мультипотентными стволовыми клетками взрослого организма, способными к самообновлению и дифференцировке во все типы клеток крови. ГСК находятся в митотически покоящемся состоянии в гемопоэтических нишах, в костном мозге и других участках кроветворения, где под действием внешних факторов происходит их асимметричное деление, дальнейшее самообновление и дифференцировка [82–85]. ГСК способны к повторному заселению ниш и восполнению всего репертуара клеток крови. У дрозофилы к стволовым клеткам, способным к самообновлению на протяжении всей жизни, относятся мужские и женские стволовые клетки зародышевой линии, стволовые клетки кишечника и нейрональные стволовые клетки [86–89]. На сегодняшний день у дрозофилы не выявлены *bona fide* ГСК, но определены ранние мультипотентные прогениторные клетки или препрогемоциты, которые поддерживаются посредством сигналов из гемопоэтической ниши ГО и клеток ДС. Эти клетки активно пролиферируют и дают начало более дифференцированным клеткам: прогемоцитам. Прогемоциты находятся в митотически спокойном состоянии, они способны дифференцироваться во все типы гемоцитов [32, 38, 43, 90, 91]. Не установлено, способны ли препрогемоциты или прогемоциты к асимметричному делению [92, 93], в результате которого образуются стволовая и дифференцирующаяся дочерние клетки. Короткая продолжительность жизни дрозофилы и отсутствие необходимости поддержания и возобновления большого количества клеток крови говорят в пользу того, что механизм поддержания гемопоэтических прогениторных клеток у этого организма принципиально отличается от механизма у ГСК позвоночных.

ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЙ ОРГАН ДРОЗОФИЛЫ: ЗОНЫ, КЛЕТКИ И МАРКЕРЫ

Генез гемопоэтического органа

С помощью клонального анализа установлено, что клетки-предшественники ГО и ДС образуются из общих клеток-предшественников, или так называемых гемангиобластов. В результате деления этих клеток образуются две дочерние клетки, одна из которых предшественник клеток сердечно-сосудистой системы (кардиобласты), диффе-

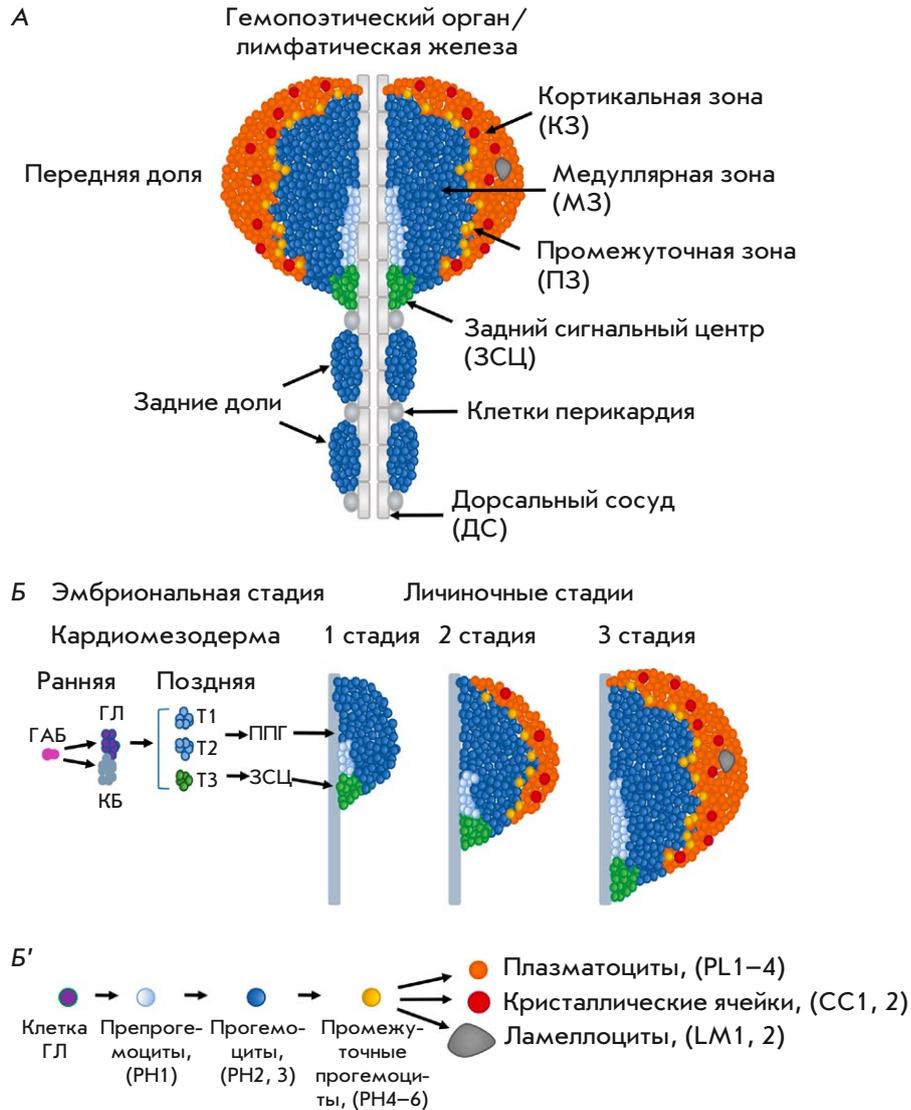


Рис. 1. А – схема строения гемопозитического органа или лимфатических желез (lymph gland) третьей личиночной стадии дрозофилы. ГО состоит из парных передних долей и парных задних долей, прикрепленных и взаимодействующих с клетками дорсального сосуда и клетками перикардия. Передние доли ГО являются модельной системой исследования гемопоза дрозофилы. Передняя доля ГО состоит из популяции клеток заднего сигнального центра (ЗСЦ) или гемопозитической ниши; медуллярной зоны, состоящей из популяций препрогемоцитов (ППГ) и прогемоцитов (ПГ); кортикальной зоны, состоящей из дифференцированных гемоцитов: плазматоцитов (ПЛ), кристаллических клеток (КК) и ламеллоцитов (ЛМ); и популяции промежуточных прогемоцитов (ПроПГ) промежуточной зоны (ПЗ). Б – схема генеза гемопозитического органа. На ранней эмбриональной стадии клетки кардио-генной мезодермы, или гемангиобласты (ГАБ), дают начало клеткам гемопозитической линии (ГЛ) и клеткам-предшественникам сердечно-сосудистой системы – кардиобластам (КБ). На последующих стадиях эмбриогенеза клетки гемопозитической линии кардио-генной мезодермы формируют три пары грудных сегментов (thoracic segments). Передние два сегмента сливаются и дают начало препрогемоцитам (ППГ) и всем гемоцитам передней доли ГО, тогда как третий задний сегмент дает начало клеткам гемопозитической ниши ЗСЦ (выделено зеленым). На первой личиночной стадии передние доли ГО содержат препрогемоциты, прогемоциты и клетки ЗСЦ. На второй личиночной стадии начинается дифференцировка прогемоцитов в промежуточные прогемоциты, которые дифференцируются в плазматоциты и кристаллические клетки, формируя кортикальную зону ГО (цветами выделены соответствующие линии гемоцитов как отмечено на панели Б'). На третьей личиночной стадии продолжается процесс дифференцировки ППГ в терминально дифференцированные линии гемоцитов, соответственно сопровождающийся ростом кортикальной зоны ГО. При этом прогемоциты МЗ поддерживаются в митотически покоящемся состоянии. Б' – схема гемопоза, происходящего в гемопозитическом органе дрозофилы. Указаны гемопозитические прогениторные клетки и линии дифференцированных гемоцитов, в скобках указаны аббревиатуры подтипов соответствующих линий гемоцитов, обнаруженных с помощью метода scRNAseq.

ренцирующихся в клетки ДС, а другая – предшественник клеток гемопоэтической линии, дающих начало гемоцитам [94]. Аналогичный механизм, вероятно, наблюдается у гемангиобластов аортально-мезонефрально-гонадного комплекса (АМГК) позвоночных, дающих начало клеткам гемопоэтической и сосудистой систем [95]. ГО образуется из трех грудных сегментов T1–T3, экспрессирующих ТФ Odd-skipped (Odd) и фактор GATA Serpent (Srp) (рис. 1, табл. 1) [94]. При этом под действием фактора Antennapedia (Antp) клетки сегмента T3 формируют так называемый задний сигнальный центр (ЗСЦ, posterior signaling center, PSC), состоящий примерно из 30–40 клеток (рис. 1B) [96]. Эти клетки являются гемопоэтической нишей, контролирующей гемопоэз в ГО личинок [97]. В поддержании клеток ЗСЦ также участвует ТФ Collier (Col), который контролируется Antp [96, 97]. Сегменты T1–T2 формируют первичные доли ГО под действием кофактора Homothorax (Hth) (рис. 1B) [96]. Для формирования клеток ГО необходимы гены факторов транскрипции Tinman (Tin) и GATA Pannier (Pnr), лиганд морфогена Decapentaplegic (Dpp) и рецептор фактора роста фибробластов Heartless (Htl). Кроме того, сигнальный путь Wnt/Wingless (Wnt/Wg) положительно регулирует спецификацию кардиогенной мезодермы [94].

СТРОЕНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ОРГАНА

ГО – это парный орган, состоящий из четырех долей, расположенных вдоль аорты (рис. 1A). Основной является наибольшая передняя, или первичная доля. В ней происходят координированные процессы поддержания препрогемоцитов, прогемоцитов и их пролиферация и дифференцировка. Наименее изучены вторичные, третичные и четвертичные доли, они в несколько раз меньше и служат дополнительным источником гемоцитов при активации клеточного иммунного ответа [98]. Передняя доля ГО – наиболее структурированная часть органа, ее используют в качестве модели или основного объекта для изучения молекулярных механизмов гемопоэза у дрозофилы [41], и она, в частности, носит название ГО.

В передней доле ГО выделяют несколько зон, каждая из которых содержит функционально разные типы клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки: (1) ЗСЦ, функционирующая как ниша для регуляции самообновления и дифференцировки прогемоцитов; (2) медиально расположенная медуллярная или внутренняя зона (МЗ, medullary zone), состоящая из препрогемоцитов и прогемоцитов; (3) дистально расположенная

корковая зона (КЗ, cortical zone), непосредственно в которой происходит дифференцировка и накопление зрелых гемоцитов (рис. 1) [41]; (4) промежуточная зона (ПЗ, intermediate zone), расположенная между медуллярной и кортикальными зонами, которая содержит промежуточные прогемоциты (ПроПО), экспрессирующие как маркеры прогемоцитов, так и маркеры зрелых гемоцитов (рис. 1 и 2, табл. 1) [43, 93, 99, 100].

Как отмечено выше, первой зоной, возникающей как отдельная клеточная популяция, является ЗСЦ. Клетки ЗСЦ регулируют поддержание и дифференцировку прогемоцитов в первичной доле ГО на протяжении личиночных стадий. Эти клетки выполняют только сигнальные функции и не дифференцируются в гемоциты [43, 91, 96, 101–104]. Клетки ЗСЦ экспрессируют следующие молекулярные маркеры: Antp, Col, лиганд сигнального пути Hedgehog (Hh), лиганд рецептора Serrate (Ser) сигнального пути Notch (N), лиганд Wg сигнального пути Wg/Wnt (рис. 2, табл. 1) [96, 97, 99, 105].

До середины второй личиночной стадии в передней доле ГО представлены только прогемоциты *Dome*⁺, экспрессирующие репортер *Domeless-Gal4* (*Dome-Gal4*), и популяция препрогемоцитов, не экспрессирующих данный репортер *Dome*⁻ (см. далее). Прогемоциты *Dome*⁺ поддерживаются на второй и третьей личиночных стадиях и дифференцируются в зрелые гемоциты, формируя КЗ [6, 41, 90, 91, 99, 106]. Определенная популяция прогемоцитов ГО способна самообновляться, одновременно продуцируя зрелые гемоциты [90]. С помощью клонального анализа показано, что в непосредственной близости к ЗСЦ могут находиться гемопоэтические «стволовые» клетки дрозофилы [90, 91]. Присутствие данной клеточной популяции, именуемой препрогемоциты, или PH1, подтверждено с помощью анализа scRNAseq [43]. Однако, как уже ранее указывалось, у «стволовых» клеток дрозофилы не описана функция самообновления и асимметричного деления, характерного для ГСК млекопитающих [92, 93, 107]. На первой личиночной стадии препрогемоциты *Dome*⁻ находятся в непосредственном соприкосновении с дорсальной аортой и ЗСЦ. Предполагается, что эти клетки дают начало прогемоцитам *Dome*⁺ [41, 43, 90, 91]. На первой и ранней второй личиночной стадиях происходит активный рост и деление прогемоцитов *Dome*⁺ [41, 91]. С использованием scRNAseq показано, что прогемоциты *Dome*⁺ являются гетерогенной популяцией, состоящей из двух подтипов клеток (PH2,3), что, вероятно, отражает иерархию их дифференцировки [43].

Таблица 1. Молекулярные маркеры и гены, вовлеченные в спецификацию и поддержание линий гемоцитов в процессе гемопоэза дрозофилы

Клетки гемопоэтической системы ГО дрозофилы	Молекулярные маркеры типов гемоцитов	Гены человека, гомологичные генам маркеров гемоцитов	Гены, участвующие в спецификации и поддержании типов гемоцитов	Гены человека, гомологичные генам дрозофилы
Гемангиобласты эмбриона	Odd-skipped (Odd) Serpent (Srp)	<i>OSR2</i> <i>GATA1</i>	<i>Odd</i> <i>Srp</i>	<i>OSR2</i> <i>GATA1</i>
Клетки гемопоэтической ниши ЗСЦ (производные сегмента Т3 эмбриона)	Antennapedia (Antp) Collier (Col) Hedgehog (Hh) Serrate (Ser) Wingless (Wg) Spitz (Spi) Pvf1	<i>HOXA7</i> <i>EBF1</i> <i>SHH</i> <i>JAG1</i> <i>WNT1</i> <i>EPGN</i> <i>FLT1,4</i>	<i>Antp</i> <i>Col</i> <i>Wg</i> <i>Fz2</i> <i>Myc</i> <i>Robo1,2</i> <i>Dpp</i> <i>Dad</i> <i>Mad</i>	<i>HOXA7</i> <i>EBF1</i> <i>WNT1</i> <i>FZD5</i> <i>MYC</i> <i>ROBO1,2,3</i> <i>BMP2</i> <i>SMAD6</i> <i>SMAD1</i>
Гемопоэтическая линия – препрогемоциты сегментов Т1– 2 эмбриона	Homothorax (Hth)	<i>MEIS1</i>	<i>Homothorax (Hth)</i> <i>Decapentaplegic (Dpp)</i> <i>Tinman (Tin)</i> <i>Pannier (Pnr)</i> <i>Heartless (Htl)</i> <i>Wingless/Wg</i>	<i>MEIS1</i> <i>BMP2</i> <i>NKX2-2</i> <i>GATA4</i> <i>FGFR3</i> <i>WNT1</i>
Препрогемоциты	<i>Dome</i> ⁻ / <i>Pvf2</i> <i>Notch-GAL4</i> <i>Su(H)-lacZ</i> <i>E(spl)mβ</i> <i>Hand</i>	<i>VEGF A-D</i> <i>NOTCH1</i> <i>RBPJ</i> <i>HES2</i> <i>HAND1,2</i>	<i>Odd</i> <i>Pvf2/Pvr</i> <i>Notch</i> <i>Dpp</i> <i>Mad</i> <i>Scalloped (Sd)</i>	<i>OSR2</i> <i>VEGF A-D</i> <i>NOTCH1</i> <i>BMP2</i> <i>SMAD1</i> <i>TEAD1</i>
Прогемоциты	<i>Dome</i> ⁺ Е-кадгерин <i>Upd3</i> <i>Wg</i>	<i>PTPRQ</i> <i>CELSR1</i> - <i>WNT1</i>	<i>Patched (Ptc)</i> <i>Cubitus interruptus (Ci)</i> <i>Wg</i> <i>Wnt6</i> <i>β-кактенин</i> <i>Fz2</i> <i>Col</i> <i>Stat92E</i> <i>AdoR</i> <i>Pka-C</i> <i>EGFR</i>	<i>PTCH1</i> <i>GLI3</i> <i>WNT1</i> <i>WNT6</i> <i>CTNNB1</i> <i>FZD5</i> <i>EBF1</i> <i>STAT5A</i> <i>ADORA2A</i> <i>PRKACB</i> <i>EGFR</i>
Промежуточные прогемоциты	<i>Dome</i> ⁺ / <i>Pxn</i> ⁺ <i>Dome</i> ⁺ / <i>Hml</i> ⁺		<i>EGFR</i> <i>Pointed (Pnt)</i>	<i>EGFR</i> <i>ETS1</i>
Плазматоциты	Peroxidasin (Pxn) <i>Hemolletctin (Hml)</i> Nimrod (NimC) Eater <i>Pvr</i>	<i>PXDN</i> <i>MUC5AC</i> <i>SCARF1</i> <i>MEGF10</i> <i>FLT1,4</i>	<i>Thisbe (Ths)</i> <i>Heartless (Htl)</i> <i>Pointed (Pnt)</i> <i>u-shaped (Ush)</i> <i>Srp</i> <i>FoxO</i> <i>Pvr</i>	<i>FGF8</i> <i>FGFR3</i> <i>ETS1</i> <i>ZFPM1</i> <i>GATA1</i> <i>FOXO3</i> <i>FLT1,4</i>
Кристаллические клетки	Lozenge (Lz) Hindsight (Hnt) Sima/Hif-α Frizzled2 (Fz2) PPO1 и PPO2	<i>RUNX1,3</i> <i>RREB1</i> <i>HIF1A</i> <i>FZD5</i> -	<i>Notch</i> <i>Serrate (Ser)</i> <i>FoxO</i> <i>Fz2</i>	<i>NOTCH1</i> <i>JAG1</i> <i>FOXO3</i> <i>FZD5</i>
Ламеллоциты	L1/Atilla Misshapen Myospheroid	- <i>MINK1</i> <i>ITGB1</i>	<i>EGFR</i> <i>FoxO</i> <i>Ph-p</i> <i>E(Pc)</i> <i>Col</i>	<i>EGFR</i> <i>FOXO3</i> <i>PHC3</i> <i>EPC1</i> <i>EBF1</i>

Примечание. В столбцах 3 и 5 указаны гены человека, гомологичные соответствующим генам дрозофилы, указанным в столбцах 2 и 4. Синим отмечены гены, кодирующие негативные регуляторы соответствующих процессов гемопоэза.

Пролиферация прогемоцитов *Dome*⁺ значительно снижается к середине второй личиночной стадии. При этом клетки на дистальном крае МЗ начинают дифференцироваться, что сопровождается снижением пролиферации, повышением гранулярности и отсутствием экспрессии Е-кадгерина (Е-кад). Клетки МЗ, или прогемоциты *Dome*⁺, характеризуются высоким уровнем экспрессии лиганда *Upd3* (сигнальный путь JAK/STAT), лиганда *Wg*, Е-кад и АФК [41, 99, 100, 108] и низким уровнем экспрессии *Col* [102, 109, 110]. Белки внеклеточного матрикса (ВКМ), в том числе коллаген типа IV (*Viking*, *Vkg*) и перлекан *Trol*, имеют повышенную локализацию между клетками МЗ [106, 111].

Плазматоциты в КЗ экспрессируют следующие маркеры: *Rxn*, гемолектин (*Hemollectin*, *Hml*), *Eater*, антиген *P1* или *Nimrod-C* (*NimC*) (рис. 1Б', табл. 1) [41, 56, 81, 99, 112, 113]. С помощью scRNA-seq в кортикальной зоне ГО идентифицированы четыре подтипа плазматоцитов [43]. Кристаллические клетки экспрессируют такие факторы транскрипции, как *Lozenge* (*Lz*) с *Runt*-доменом, *Hindsight* (*Hnt*), *Sima/Hif-α*, рецептор *Frizzled2* (*Fz2*), *PPO1* и *PPO2* [65, 78, 114–116]. В норме без воздействия патогенных факторов ламеллоциты практически не образуются в КЗ. В ГО дифференцируются два подтипа ламеллоцитов, экспрессирующих *L1/Atilla*, *Misshapen*, интегрин α -*PS4* и его партнер *Myospheroid* (рис. 1Б', табл. 1) [10, 43, 51, 55, 77, 80, 117].

Между прогемоцитами *Dome*⁺ и дифференцирующимися клетками *Rxn*⁺ медуллярной и кортикальных зон находится популяция клеток, которые одновременно экспрессируют маркеры обеих зон – это промежуточные прогемоциты (ПроПГ), которые представляют так называемую промежуточную зону (рис. 1, табл. 1) [34, 93, 99, 100, 118]. ПроПГ экспрессируют ранние маркеры дифференцировки *Hml* и *Rxn*, однако не экспрессируют зрелые маркеры плазматоцитов (*P1*) и кристаллических клеток (*PPO1* и *2*) [106], а также перестают экспрессировать Е-кадгерин. Последние исследования, проведенные методом scRNAseq, позволили более подробно охарактеризовать данную зону, в которую включили четыре стадии промежуточных прогемоцитов (*PH4–6*), ранние плазматоциты (*PL1*) и ранние кристаллические клетки (*CC1*) [43]. Показано также, что клетки популяции ПроПГ, характеризующиеся активацией митоза, дифференцируются в плазматоциты и КК под действием активации сигнальных путей: *Ras/Raf* или *Ser/Notch* соответственно [118]. Молекулярные механизмы, регулирующие данную популяцию, наименее охарактеризованы и требуют дальнейшего изучения.

СИГНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ПОДДЕРЖАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПРЕПРОГЕМОЦИТОВ

В начале первой личиночной стадии в ГО находится популяция мультипотентных препрогемоцитов, представляющих собой самую раннюю постэмбриональную популяцию гемопоэтических предпредшественников, которые, вероятнее всего, исчезают позднее первой личиночной стадии [91]. Для данных клеток характерно отсутствие экспрессии маркера прогемоцитов *Dome*, низкий уровень экспрессии маркера *Dorothy* (*Dot*) и активация сигнального пути *Notch* (*Notch-GAL4*, *Su(H)-lacZ*) и его целевого гена *enhancer of split mβ* (*E(spl)mβ*) (рис. 1, табл. 1) [43, 91]. Показано, что, помимо *Notch*, поддержание данных клеток регулируется лигандом-морфогеном *Dpp*, который секретируется клетками ниши ЗСЦ. Инактивация *Dpp* в ЗСЦ или подавление функции ТФ *mothers against dpp* (*Mad*) в препрогемоцитах *Notch*⁺ вызывает существенное уменьшение размера ГО к 3-й личиночной стадии. Таким образом, активация сигнальных путей *Notch* и *Dpp* необходима для пролиферации препрогемоцитов. Далее на 2-й и 3-й личиночных стадиях *Dome*⁺ препрогемоциты начинают экспрессировать ТФ *Hand* и *Scalloped* (*Sd*) [119]. Обнаружено, что эти клетки также экспрессируют лиганд *Pvf2* рецептора *Pvr* (гомолог рецепторов PDGF/VEGF человека), и его экспрессия зависит от активности *Sd*. Инактивация *Pvf2* в данных клетках ведет к подавлению их пролиферации и к существенному последующему снижению размера ГО. При этом эктопическая экспрессия *Pvf2* в этих клетках восстанавливает пролиферативный дефект в ГО, частично утративших функцию *Sd* [119].

Показано также, что в поддержании ранних прогемоцитов *Dome*⁺ участвует кальций/кальмодулиновый сигнальный путь, который активируется через ионотропный рецептор γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-рецептор, *GABABR*). *GABABR* экспрессируется в клетках ЗСЦ. Кальций/кальмодулиновый путь в ЗСЦ участвует в регуляции пролиферации препрогемоцитов на ранних личиночных стадиях, не влияя на дифференцировку гемоцитов на третьей личиночной стадии. Нарушение кальций/кальмодулинового сигнального пути в клетках ЗСЦ вызывает значительное снижение пролиферации препрогемоцитов [120]. Таким образом, эти данные указывают, что в поддержании и пролиферации ранних препрогемоцитов *Dome*⁺ участвуют несколько сигнальных путей: сигнальные пути *Notch*, *Dpp*, *Pvf2/Pvr* (рис. 2). Интересно, что вовлеченность сразу нескольких сигнальных путей в регуляцию одного процесса может указывать на сложную си-

стему регуляции и возможность взаимной компенсации разных сигнальных путей. Следует отметить, что технические сложности работы с ГО на первой личиночной стадии и недостаток маркеров затрудняют изучение популяций клеток *Dome^{Sd}⁺* и *Dome^{Notch}⁺* [91].

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ПОДДЕРЖАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПРОГЕМОЦИТОВ

Как уже отмечалось, прогемоциты являются мультипотентными предшественниками всех типов гемоцитов. Поддержание мультипотентности и митотического покоя данных прогемоцитов контролируется множеством сигналов, происходящих из трех разных источников (рис. 2). Сигналы первого типа – это сигналы цитокинов и ростовых факторов, секретируемых клетками сигнальной ниши ЗСЦ. Второй тип сигналов – это аутокринные или паракринные сигналы, возникающие и принимаемые одной и той же популяцией клеток в МЗ ГО. Третий тип – сигналы от дифференцированных клеток кортикальной зоны ГО, направленные на поддержание и дифференцировку прогемоцитов МЗ. К четвертому типу можно отнести системные сигналы, исходящие от различных тканей вне гемопоэтического органа, которые образуются в ответ на воздействия внешней среды и воспринимаются через нишу ЗСЦ.

Характерной особенностью прогемоцитов МЗ является строго скоординированный контроль их пролиферации. На первой и ранней второй личиночной стадии практически все клетки ГО, включая препрогемоциты и клетки ниши ЗСЦ, являются прогемоцитами *Dome⁺* (рис. 1Б). На этих стадиях данные клетки интенсивно пролиферируют асинхронно. Затем, с началом появления дифференцированных клеток в поздней фазе второй личиночной стадии пролиферация прогемоцитов резко замедляется. Далее при формировании КЗ прогемоциты *Dome⁺* практически перестают пролиферировать, в то время как клетки ПЗ и КЗ имеют более высокую скорость пролиферации на протяжении всей третьей личиночной стадии [41]. Таким образом, низкая скорость пролиферации и ее контроль коррелируют с поддержанием мультипотентного состояния прогемоцитов. Как уже отмечалось, известны четыре типа сигналов, необходимых для поддержания прогемоцитов дрозофилы: аутокринный сигнал, сигналы, исходящие из ниши ЗСЦ и от дифференцирующихся клеток, а также сигналы от других тканей организма. Потеря любого из этих сигналов ведет к потере мультипотентности прогемоцитов, вызывая их пролиферацию и, как следствие, дифференцировку [96, 103]. Важной

особенностью прогемоцитов является корреляция между их пролиферацией и дифференцировкой. На сегодняшний день появляется все больше данных, указывающих, что только пролиферирующие прогемоциты способны принимать сигналы дифференцировки, в то время как покоящиеся прогемоциты не воспринимают данные сигналы. Исследование механизмов, регулирующих пролиферативную активность промежуточных прогемоцитов, должно способствовать большему пониманию данного вопроса.

СИГНАЛЫ, ИСХОДЯЩИЕ ИЗ НИШИ ЗАДНЕГО СИГНАЛЬНОГО ЦЕНТРА, РЕГУЛИРУЮТ ПОДДЕРЖАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПРОГЕМОЦИТОВ

Центральная роль сигнального пути Hh/Ptc/Ci в поддержании мультипотентного состояния прогемоцитов

Клетки ЗСЦ выполняют роль гемопоэтической ниши в ГО, они секретируют ряд сигнальных лигандов или ростовых факторов, при этом практически не экспрессируют соответствующие рецепторы. В то же время рецепторы данных лигандов экспрессируются в прогемоцитах, и инактивация соответствующих лигандов в клетках ЗСЦ подавляет поддержание прогемоцитов МЗ, вызывая их дифференцировку.

Лиганд Hh, связываясь со своим рецептором Patched (Ptc), вызывает активацию ТФ Cubitus interruptus (Ci). Hh экспрессируется исключительно в клетках ЗСЦ в ходе второй и третьей личиночных стадий (рис. 1, табл. 1). В то время как в прогемоцитах *Dome⁺* на высоком уровне экспрессируется Ptc и активированный Ci, инактивация Hh не влияет на клетки ЗСЦ, но стимулирует дифференцировку прогемоцитов *Dome⁺* во все три типа гемоцитов [96, 97, 102–104, 121–124]. Кроме того, подавление функции Ci вызывает дифференцировку прогемоцитов, подобно инактивации Hh в клетках ЗСЦ (рис. 2) [96, 121]. Этот процесс осуществляется в том числе за счет морфологических особенностей клеток ЗСЦ, протяженные псевдоподии которых проходят через несколько слоев прогемоцитов, что позволяет доставить лиганд глубоко внутрь медуллярной зоны [96, 102]. Показано также, что абляция клеток ЗСЦ с помощью индукции апоптоза не вызывает ожидаемой дифференцировки прогемоцитов, наблюдаемой при инактивации Hh [109, 110, 121]. Однако установлено, что популяция прогемоцитов *Dome⁺* гетерогенна. Часть клеток *Dome⁺* (*Odd⁺* *Col⁻*) отвечает на сигнал Hh, тогда как клетки *Odd⁺* *Col⁺* не чувствительны к данному

сигналу [110, 121]. В связи с этим предполагается, что абляция клеток ЗСЦ не затрагивает отдельные прогемоциты. Возможно, что клетки Col⁺ являются отдельной популяцией прогемоцитов, которая контролируется сигналами из клеток дорсального сосуда [91, 119]. Установлено также, что ДС выполняет функцию дополнительной ниши. Так, лиганд Branchless (Bnl) (гомологичный фактору роста фибробластов, FGF), продуцируемый клетками ДС, активирует сигнальный путь FGF в прогемоцитах. Активация этого пути регулирует уровень внутриклеточного кальция и способствует поддержанию прогемоцитов в недифференцированном состоянии [125].

Подавление функции гена *Roundabout (Robo)* увеличивает количество клеток ЗСЦ, а также вызывает их распространение вглубь гемопоэтического органа. Эти события коррелируют со снижением дифференцировки плазматоцитов и кристаллических клеток [126]. При этом в ответ на патогенное вмешательство в клетках ЗСЦ происходит подавление активности фактора NF- κ B Relish сигнального пути Imd. Инактивация Relish проявляется нарушением цитоскелета клеток ЗСЦ в результате активации киназы Jun, что приводит к удерживанию лиганда Hh, тем самым нарушая поддержание прогемоцитов, вызывая их преждевременную дифференцировку и активацию клеточного иммунного ответа [127]. Показано также, что подавление передачи сигналов Ca²⁺ или нарушение межклеточных контактов между клетками ЗСЦ влияет на функции данных клеток и вызывает преждевременную дифференцировку прогемоцитов [128].

АФК регулирует дифференцировку ламеллоцитов через активацию сигнальных путей Spitz/EGFR и Toll/Dif в нише ЗСЦ

Помимо регуляции гемопоэза в ГО, клетки ЗСЦ регулируют дифференцировку ламеллоцитов внутри и вне ГО. Так, абляция клеток PSC при инактивации Col или индукции апоптоза предотвращает дифференцировку ламеллоцитов в ответ на заражение паразитическими осами [97, 109]. С помощью генетических методов установлено, что такое заражение приводит к существенному повышению уровня АФК в ЗСЦ и именно АФК являются ключевым сигналом, вызывающим дифференцировку ламеллоцитов [129]. В клетках ЗСЦ АФК в норме не детектируются, однако при заражении паразитическими осами уровень АФК в них резко возрастает. Искусственное повышение уровня АФК в клетках ЗСЦ за счет подавления работы дыхательной цепи митохондрий также приводит к масштабному

увеличению количества ламеллоцитов в циркуляции и ГО [129]. При этом в обоих случаях удаление АФК с помощью митохондриальной супероксиддисмутазы 2 (SOD2) или каталазы подавляет образование ламеллоцитов в ГО и циркуляции. Кроме того, активация сигнального пути киназа Akt (Akt1)/FoxO в клетках ЗСЦ, усиливающего антиоксидантный ответ, также отменяет генерацию ламеллоцитов. Показано, что АФК активирует сигнальный путь рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), обеспечивая дифференцировку ламеллоцитов. Инактивация Spitz (лиганд EGFR) в клетках ЗСЦ или функции EGFR в гемоцитах подавляет образование ламеллоцитов (рис. 2) [129]. Функции белков Star и Rhomboid, непосредственно участвующих в переносе, расщеплении и активации лиганда Spitz (переводят его в растворимую форму), необходимы для индукции ламеллоцитов. Помимо этого, высокий уровень АФК активирует сигнальный путь Toll в клетках ЗСЦ, что также способствует индукции ламеллоцитов в ответ на воздействие паразитических ос [130]. Потеря компонентов сигнального пути Toll посредством инактивации Dif и pelle нарушает образование ламеллоцитов. Наряду со множеством вопросов о природе генерации АФК в клетках ЗСЦ и сигналов в ответ на инвазию паразитарных организмов, нерешенным остается и вопрос взаимодействия сигнальных путей Spitz/EGFR и Toll/Dif в клетках ЗСЦ в регуляции дифференцировки ламеллоцитов.

ЛОКАЛЬНЫЕ СИГНАЛЫ, ПОДДЕРЖИВАЮЩИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРОГЕМОЦИТОВ

Сигнальный путь Wg/Wnt/ β -катенин поддерживает прогемоциты в мультипотентном состоянии

Одним из важных сигнальных путей, участвующих в поддержании мультипотентности и самообновлении гемопоэтических стволовых клеток млекопитающих, является сигнальный путь Wnt/ β -катенин. Сигналы лигандов Wnt действуют как аутокринным, так и паракринным способом. В последнем случае лиганды секретируются из клеток гемопоэтической ниши и способствуют поддержанию идентичности ГСК. У дрозофилы, как и у млекопитающих, известно несколько генов, кодирующих лиганды Wnt (Wg, Wnt-2, -3/5, -4, -6, -8, -10), и два гена, кодирующих их рецепторы Fz и Fz2. Лиганды, связываясь с рецепторами, вызывают активацию или канонического пути через активацию ТФ β -катенина (Armadillo, Arm), или неканонического сигнального пути планарной клеточной полярности (англ. planar cell polarity), который вызывает активацию транс-

крипции посредством JNK. Канонический сигнальный путь Wg/Wnt/ β -катенин участвует в поддержании мультипотентного состояния прогеомоцитов (рис. 2, табл. 1) [99]. Так, рецептор Fz2, который передает сигнал по каноническому пути, экспрессируется на высоком уровне в прогеомоцитах *Dome*⁺. Усиленная активация сигнального пути Wg/Wnt/ β -катенина в прогеомоцитах *Dome*⁺, обусловленная сверхэкспрессией лиганда Wg или конститутивно активной формы β -катенина, не позволяет данным клеткам дифференцироваться, стимулируя их поддержание в недифференцированном состоянии [99]. В свою очередь, ингибирование данного сигнального пути с помощью комбинации доминантно-негативных форм рецепторов Fz и Fz2 в прогеомоцитах *Dome*⁺ вызывает нарушение зональности ГО, то есть кластеры дифференцированных клеток «перемешиваются» с кластерами прогеомоцитов (рис. 2). Одновременная экспрессия доминантно-негативных форм Fz и Fz2 увеличивает количество промежуточных прогеомоцитов ПЗ [99]. При этом подавляется экспрессия белка ЭКМ Е-кадгерина, который непосредственно вовлечен в поддержание прогеомоцитов. Подавление экспрессии Е-кадгерина в прогеомоцитах вызывает их дифференцировку, в то время как сверхэкспрессия Е-кадгерина способствует поддержанию прогеомоцитов [41, 131]. Показано также, что активация сигнального пути Wg/Wnt/ β -катенин в клетках *Hml*⁺ кортикальной зоны подавляет экспрессию белка ЭКМ Tig и влияет на созревание плазматоцитов [132, 133], что дополнительно указывает на функцию этого сигнального пути в клетках промежуточной зоны. Недавние исследования показали, что в прогеомоцитах экспрессируется также лиганд Wnt6, экспрессия которого контролируется сигнальным путем Hh [134]. Важно отметить, что Wnt6 передает сигналы через новый неканонический Wnt-путь, опосредуемый рецептором LRP6 и подавляющим активность β -катенина. Взаимодействие цитозольного β -катенина с Е-кадгеринном подавляет сигнальный путь EGFR в прогеомоцитах. Таким образом, активация сигнального пути Wnt6/LRP6 ведет к задержке клеточного цикла в фазе G2, тем самым не позволяя прогеомоцитам отвечать на сигналы к дифференцировке [134]. Однако активация сигнального пути EGFR в промежуточных прогеомоцитах ПЗ снимает блокаду клеточного цикла путем активации бета-катенина и позволяет клеткам дифференцироваться посредством активации ТФ Pointed (Pnt) [134]. Таким образом, активация сигнальных путей: канонического Wg/бета-катенин и неканонического Wnt6 важна для поддержания прогеомоцитов в мультипотентном состоянии, возможно, и в различных по-

пуляциях прогеомоцитов, в том числе в популяции промежуточных прогеомоцитов ПЗ.

Сигнальный путь кальций/кальмодулин участвует в поддержании прогеомоцитов

Сигнальный путь кальций/кальмодулин участвует не только в ЗСЦ-зависимой регуляции пролиферации препрогеомоцитов, но также и в поддержании прогеомоцитов *Dome*⁺ (рис. 2). Подавление передачи сигналов кальция в прогеомоцитах ГО приводит к увеличению количества дифференцированных гемоцитов. Напротив, активация сигналов кальция в прогеомоцитах способствует их поддержанию и пролиферации, при этом образуется значительно меньше зрелых гемоцитов [120].

Активность фактора Collier важна для поддержания прогеомоцитов

Транскрипционный фактор Col экспрессируется в прогеомоцитах *Dome*⁺, а его инактивация в клетках приводит к дифференцировке данных клеток в плазматоциты и кристаллические клетки (табл. 1) [109, 110]. Экспрессия данного ТФ в прогеомоцитах не контролируется сигналами из ЗСЦ. При этом Col негативно регулирует также дифференцировку ламеллоцитов. Понижение уровня Col наблюдается при усиленной дифференцировке ламеллоцитов, в то время как его эктопическая экспрессия в прогеомоцитах предотвращает образование данных клеток. Остается не ясным, под действием какого сигнального пути активируется функция Col в прогеомоцитах.

Сигнальные пути FGF и Gbb/TGF-beta способствуют дифференцировке прогеомоцитов

В отличие от Wnt, активация сигнального пути FGF в прогеомоцитах *Dome*⁺ вызывает их дифференцировку в зрелые гемоциты всех трех типов. Ингибирование сигнального пути FGF вызывает значительный рост прогеомоцитов, при этом наблюдается подавление их дифференцировки. Интересно, что лиганд FGF Thisbe (Ths) и рецептор Htl экспрессируются в прогеомоцитах и некоторых, вероятно, промежуточных прогеомоцитах, экспрессирующих пероксидазин. Эктопическая экспрессия целевых для FGF транскрипционных факторов Pnt и Ush способствует дифференцировке прогеомоцитов [135]. Таким образом, передача сигнала FGF через Htl, Ras/MAPK, Pnt и Ush способствует дифференцировке прогеомоцитов (рис. 2). Показано также, что сигнальный путь TGF-beta через лиганд Glass bottom boat (Gbb) участвует в негативной регуляции дифференцировки ламеллоцитов и плазматоцитов КЗ за счет подавления сигнальных путей EGFR и JNK [136].

Сигнальный путь JAK/STAT участвует в поддержании прогеомоцитов

Цитокины Unpaired 1–3 (Upd1–3), действуя через рецептор Dome, активируют киназу JAK и далее ТФ Stat92E, индуцируя транскрипцию целевых генов [102, 137]. Показано, что сигнальный путь JAK/STAT активирован в прогеомоцитах *Dome*⁺ и участвует в поддержании их идентичности, предотвращая дифференцировку [41, 119, 137]. Активность ТФ Stat92E в прогеомоцитах значительно ниже, чем в дифференцированных гемоцитах КЗ [138]. Однако функция ТФ Stat92E необходима для поддержания прогеомоцитов. Инактивация Stat92E с помощью температурочувствительной мутации приводит к дифференцировке прогеомоцитов [102]. При этом инактивация компонентов сигнального пути JAK/STAT, таких, как Dome или киназы JAK (hopscotch, hop), или Stat92E в прогеомоцитах МЗ, не влияет на их поддержание [103, 139]. Показано, что ТФ Ush, регулируемый сигналами JAK/STAT, способствует экспрессии E-кадгерина и Ptc в прогеомоцитах, участвуя тем самым в их поддержании и подавлении дифференцировки [131, 140]. Белок переноса эндосом Arj (Arj) участвует в фосфорилировании и активации STAT. Инактивация Arj частично фенотипирует температурочувствительный аллель Stat92E – подавляет поддержание прогеомоцитов, вызывая их дифференцировку [141, 142]. Кроме того, сигнальный путь JAK/STAT положительно регулирует дифференцировку прогеомоцитов в ламеллоциты при индукции клеточного иммунного ответа (рис. 2, табл. 1) [137].

Активные формы кислорода участвуют в поддержании прогеомоцитов

Основными источниками АФК в клетке являются дыхательная цепь митохондрии и мембранные NADPH-оксидазы (NOX). Эти системы генерируют супероксидный анион-радикал, который далее под действием супероксиддисмутаза превращается в пероксид водорода. Главными формами АФК в клетке являются пероксид водорода и супероксидный анион-радикал. АФК являются мощными окислителями, в высоких концентрациях, а также при нарушении антиоксидантной системы клетки они вызывают необратимые изменения макромолекул, приводящие к старению и гибели клетки. Однако сублетальные, физиологические концентрации АФК служат важными сигнальными посредниками, участвующими в посттрансляционных модификациях белков сигнальных путей и транскрипционных факторов, тем самым регулируя различные процессы в клетке [143, 144].

Неожиданно оказалось, что в норме в прогеомоцитах *Dome*⁺ поддерживаются повышенные уровни АФК по сравнению с дифференцированными гемоцитами кортикальной зоны (рис. 2, табл. 1) [100]. Прогеомоциты находятся в митотическом покое. По аналогии с покоящимися (quiescent) ГСК млекопитающих можно предположить, что эти клетки имеют низкую митохондриальную/дыхательную активность и, соответственно, низкие уровни АФК. Однако известно, что в миелоидных предшественниках млекопитающих уровень АФК существенно выше, чем в ГСК, и также повышается при дифференцировке клеток миелоидной линии. Неясным остается механизм генерации повышенных уровней АФК в прогеомоцитах. Однако показано, что АФК функционируют как сигнальные молекулы в процессе дифференцировки прогеомоцитов. Снижение базального уровня АФК в прогеомоцитах *Dome*⁺ путем экспрессии антиоксидантных ферментов подавляет формирование зрелых гемоцитов. В то же время искусственная индукция избытка АФК и ослабление окислительного фосфорилирования посредством инактивации комплекса-1 дыхательной цепи митохондрий в прогеомоцитах через активацию сигнального пути JNK приводят к их дифференцировке во все три типа зрелых гемоцитов [100]. Увеличение уровня АФК в прогеомоцитах приводит также к снижению экспрессии E-кадгерина посредством активации сигнального пути JNK и ТФ Srp [145]. Эктопическая экспрессия ТФ FoxO сигнального пути JNK в прогеомоцитах вызывает их дифференцировку в плазматоциты и кристаллические клетки [100, 145]. При этом одновременная активация FoxO и инактивация белков хроматина Polyhomeotic proximal (Ph-p) и Enhancer of polycomb (E(Pc)) вызывает дифференцировку прогеомоцитов в ламеллоциты (рис. 2, табл. 1). Таким образом, умеренно высокий, но физиологически контролируемый уровень АФК необходим для поддержания прогеомоцитов. Однако повышенная продукция митохондриальных АФК в прогеомоцитах вызывает их дифференцировку через активацию сигнального пути JNK/FoxO. Важно отметить, что в данном контексте функция FoxO не опосредует регуляцию антиоксидантных генов. Обнаружено также, что предполагаемые прогеомоциты, циркулирующие в целоме личинки дрозофилы вне гемопоэтического органа, также характеризуются высокой продукцией АФК. Эти прогеомоциты недостаточно охарактеризованы, они отнесены к предшественникам по аналогии с прогеомоцитами ГО, которые экспрессируют повышенные уровни АФК и лиганд Wg [17]. Эти клетки образуются в большом избытке в результа-

те активности онкогенного химерного белка AML1-ETO, экспрессируемого в гемоцитах *Hml*⁺. Высокие уровни АФК в таких циркулирующих прогемоцитах способствуют их поддержанию и повышенной пролиферации. Так, эктопическая экспрессия антиоксидантных ферментов SOD2 или каталазы (Catalase, Cat), а также ТФ FoxO, активирующего их экспрессию, подавляет генерацию и избыточную пролиферацию гемоцитов и их предшественников, вызванную онкогеном AML1-ETO [17]. В данном случае наиболее вероятно, что сигнальный путь Akt1/FoxO канонически регулирует экспрессию антиоксидантных генов. Таким образом, наблюдается как сходство, так и значительные различия в регуляции поддержания прогемоцитов ГО и циркулирующих прогемоцитов под действием АФК.

Синтаза оксида азота (Nos), как недавно показано, специфически экспрессируется в прогемоцитах и через продукцию оксида азота (NO) участвует в посттрансляционном S-нитрозилировании белков по остаткам цистеина [146]. S-нитрозилирование белков совместно с цитозольным кальцием активирует Ire1-Xbp1-опосредованную реакцию на развернутый белок (unfolded protein response, UPR), необходимую для поддержания прогемоцитов в митотически неактивном состоянии путем их остановки в фазе G2 клеточного цикла [146]. Как уже отмечалось, такая блокировка клеточного цикла делает прогемоциты невосприимчивыми к паракринным факторам, вызывающим дифференцировку. Показано также, что S-нитрозилирование EGFR временно инактивирует данный рецептор и таким образом делает прогемоциты невосприимчивыми к соответствующим сигналам. Важно отметить, что Nos, экспрессирующаяся в прогемоцитах, не содержит редуктазного домена, но при этом способна генерировать NO [146]. В свою очередь, поскольку эти клетки имеют высокие уровни АФК, данная форма Nos может использовать АФК для синтеза NO. Таким образом, предполагается, что взаимодействие между АФК и NO может участвовать в поддержании соответствующих уровней АФК, генерировать NO и тем самым защищать прогемоциты от избыточной продукции АФК.

В целом, очевидно сложная сеть регуляции поддержания и дифференцировки прогемоцитов в ГО. В локальной регуляции данных процессов участвуют несколько сигнальных путей. При этом, вероятно, существует сложная сеть взаимодействий между компонентами данных сигнальных путей в определенных временных интервалах гемопоэза дрозофилы. При этом различные сигнальные пути способны вызывать дифференцировку клеток, что может указывать на повышенную пластичность

клеток-предшественников дрозофилы. Помимо данных сигналов и сигналов из ниши ЗСЦ, поддержание прогемоцитов контролируется сигналами дифференцированных клеток, о чем будет сказано в следующем разделе.

РАВНОВЕСНЫЕ СИГНАЛЫ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ НИШИ ЗСЦ И ЗРЕЛЫМИ ГЕМОЦИТАМИ КОРТИКАЛЬНОЙ ЗОНЫ РЕГУЛИРУЮТ ПОДДЕРЖАНИЕ ПРОГЕМОЦИТОВ

С использованием генетической системы дрозофилы обнаружен уникальный механизм регуляции поддержания прогениторных клеток. Установлено, что поддержание и дифференцировка прогемоцитов контролируются «равновесно» двумя механизмами: (1) непосредственно сигналом из клеток гемопоэтической ниши ЗСЦ и (2) сигналом дочерних дифференцированных клеток, который также контролируется дополнительным сигналом, исходящим из той же гемопоэтической ниши. Клетки ЗСЦ регулируют не только поддержание мультипотентного состояния прогемоцитов, но также поддержание и дифференцировку гемоцитов кортикальной зоны (рис. 2). Этот процесс регулируется сигнальным путем Pvf1/Pvr [103]. Лиганд Pvf1 секретируется в клетках ЗСЦ, в то время как рецептор Pvr экспрессируется на высоком уровне в клетках кортикальной зоны. Инактивация Pvf1 в клетках ЗСЦ не влияет на пролиферацию и количество клеток ЗСЦ, однако приводит к подавлению поддержания прогемоцитов, вызывая их дифференцировку. Аналогичный эффект наблюдается и в результате подавления функции рецептора Pvr в дифференцированных гемоцитах кортикальной зоны, вызывающей обширную дифференцировку прогемоцитов [103, 119]. Важно отметить, что лиганд Pvf1 переносится на большие расстояния через несколько клеток посредством транспортных везикул, включающих связанные, но не сигнализирующие комплексы Pvf1 и Pvr на поверхности прогемоцитов.

Далее с помощью генетических методов было показано, что Pvf1, взаимодействуя с Pvr гемоцитов кортикальной зоны, активирует STAT-зависимую экспрессию секретируемой аденозиндезаминазы ростового фактора-A (Adgf-A) (рис. 2). Этот фермент осуществляет дезаминирование аденозина, превращая внеклеточную сигнальную молекулу аденозина в инертный инозин [147, 148]. Удаление аденозина посредством Adgf-A в гемоцитах КЗ приводит к подавлению соответствующего сигнального пути через рецептор аденозина (AdoR), находящийся в прогемоцитах. В результате снижается активность cAMP-зависимой протеинкиназы A (PKA), что, в свою очередь, активирует транскрипционный

взаимодействия данных сигнальных путей в регуляции пролиферации и функционирования клеток ЗСЦ требуются дальнейшие исследования.

Показано, что развитая сеть белков внеклеточно-матрикса между клетками ЗСЦ и прогемоцитами важна для регуляции передачи сигналов Dpp и Wg в процессе гемопоэза в ГО и ответа на стрессовые воздействия [151]. Обнаружено, что септированные контакты между клетками ЗСЦ разрушаются при активации сигнальных путей Toll или Imd или в ответ на бактериальную инфекцию. В норме кластер клеток ЗСЦ непроницаем для крупномолекулярных красителей. Однако инактивация белков плотных септированных межклеточных контактов Coracle (Cora) или нейрексина IV (Neurexin IV, NrxIV) приводит к проницаемости клеток ЗСЦ. Повышенная проницаемость способствует увеличению числа клеток ЗСЦ, уменьшению количества прогемоцитов и способствует дифференцировке плазматоцитов и кристаллических клеток. Потеря такого барьера нарушает передачу сигналов лигандов Wg и Dpp [151] как внутри ниши, так и сигналов прогемоцитам. Показано также, что в регуляции секреции Hg участвуют щелевые контакты (gap junctions, GJ), а также Ca²⁺-сигнальный путь [128].

В дополнение к этому показано, что сигналы от соседствующих с ЗСЦ клеток ДС регулируют пролиферацию, функционирование и локализацию клеток ЗСЦ. Так, гликопротеин Slit секретируется клетками дорсального сосуда. Рецепторы данного белка Roundabout 1 и 2 (Robo 1 и 2) экспрессируются на клетках ЗСЦ. Взаимодействие Slit с Robo 1 и 2 регулирует пролиферацию и локализацию клеток ЗСЦ [33, 126, 152]. Подавление функции Robo в ЗСЦ или экспрессии Slit в клетках дорсального сосуда увеличивает количество клеток ЗСЦ и вызывает их распространение вглубь гемопоэтического органа, в том числе посредством подавления экспрессии E-кад [126]. В свою очередь, Robo активирует сигнальный путь Dpp/TGF-beta, что приводит к подавлению экспрессии ТФ Мус и пролиферации клеток ЗСЦ (рис. 2) [33, 123, 126].

Важным открытием стало то, что сигналы извне, а именно от нервной и гуморальной систем, непосредственно влияют на состояние и функцию клеток гемопоэтической ниши ЗСЦ. Инсулиноподобные пептиды, экспрессирующиеся в нейронах, клетках глии и жирового тела [153], регулируют пролиферацию и рост клеток ЗСЦ посредством активации инсулинового сигнального пути [31, 32, 104, 122, 154]. Ингибирование данного сигнального пути в результате инактивации различных его компонентов: инсулинового рецептора (InR) или Akt1, или фосфоинозитид-зависимой киназы 1 (Pdk1),

или фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), уменьшает количество клеток ЗСЦ. Кроме того, показано, что в этом процессе участвует активация сигнального пути рапамицина. Дальнейшие исследования позволят более детально установить взаимодействия между обнаруженными сигнальными путями в регуляции поддержания и функционирования клеток гемопоэтической ниши, которая является центром, регулирующим гемопоэз в ГО дрозофилы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 20 лет был достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов, регулирующих гемопоэз дрозофилы. Генетически наиболее совершенная модельная система дрозофилы позволила охарактеризовать сложные взаимодействия между сигнальными путями и транскрипционными факторами, участвующими в регуляции поддержания и дифференцировки мультипотентных клеток предшественников гемоцитов: препрогемоцитов и прогемоцитов. Данные клетки дифференцируются в процессе развития личинки в три типа зрелых гемоцитов: плазматоциты, кристаллические клетки и ламеллоциты. Показано, что у насекомых, как и у млекопитающих, в поддержании и регуляции дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников главную роль играет гемопоэтическая ниша – клетки ЗСЦ. Детерминация судьбы клеток гемопоэтической ниши происходит параллельно со спецификацией гемопоэтических предшественников в гемопоэтическом органе. На протяжении личиночных стадий клетки ЗСЦ координируют поддержание и дифференцировку прогемоцитов с помощью секретируемых лигандов: Hh, Pvf1, Ser, Wg/Wnt, активируя соответствующие сигнальные пути в предшественниках гемоцитов. Эти сигналы участвуют в том числе в поддержании аутокринных и паракринных сигналов (Wnt/ бета-катенин, кальциевая сигнализация, АФК, Stat92E) в прогемоцитах, активируя или подавляя поддержание прогемоцитов в недифференцированном состоянии. Прогемоциты находятся в митотически покоящемся состоянии в медуллярной зоне гемопоэтического органа. Помимо этого, показана двусторонняя, равновесная регуляция поддержания прогемоцитов с помощью сигналов от дифференцированных клеток (Pvr, Adgf-A, AdoR, PKA) и клеток гемопоэтической ниши (Hh, Pvf1). Недавние исследования с использованием секвенирования транскриптома единичных клеток показали наличие промежуточных стадий дифференцировки прогемоцитов и неохарактеризованных популяций зрелых гемоцитов. Дифференцировка прогемоцитов происходит в так называемой промежуточной зоне, где клетки

начинают делиться и становятся восприимчивыми к сигналам дифференцировки. Однако данный механизм требует дальнейшей расшифровки. Кроме того, недавние исследования показали, что клетки дорсального сосуда также служат своего рода гемопоэтической нишей, участвуя в поддержании прогемотитов. До настоящего времени у дрозофилы не выявлены гемопоэтические стволовые клетки, способные самообновляться с помощью асимметрического деления. Однако определена наиболее наивная популяция препрогемотитов, клетки которой регулируются клетками гемопоэтической ниши с помощью активации сигнальных путей Notch, Dpp, Pvf2/Pvr. Показано также, что, помимо поддержания предшественников гемотитов, клетки гемопоэтической ниши участвуют в регуляции кле-

точного иммунного ответа и клеток, опосредующих меланизацию и инактивацию патогенных объектов с помощью сигнальных путей Spi/EGFR, Toll и Ser/Notch. На основании результатов рассмотренных исследований получена уникальная картина взаимодействия молекулярных механизмов, регулирующих гемопоэз одного из представителей артропод. Генетическая система дрозофилы позволила и позволяет с высоким разрешением, по некоторым параметрам опережая модельную систему мыши, расшифровать молекулярные события, регулирующие гемопоэз. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке Соглашения № 075-15-2021-1075 с Минобрнауки от 28-09-2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morgan T.H. // *Sci. Mon.* 1935. V. 41. № 1. P. 5–18.
- Morgan T.H. // *Am. Nat.* 1917. V. 51. № 609. P. 513–544.
- Nefedova L.N. // *Russ. J. Dev. Biol.* 2020. V. 51. № 4. P. 201–211.
- Osadchiy I.S., Kamalyan S.O., Tumashova K.Y., Georgiev P.G., Maksimenko O.G. // *Acta Naturae.* 2023. V. 15. № 2. P. 70–74.
- Brand A.H., Perrimon N. // *Development.* 1993. V. 118. № 2. P. 401–415.
- 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. // *Nat. Meth.* 2009. V. 6. № 8. P. 603–605.
- Hu Y., Comjean A., Rodiger J., Liu Y., Gao Y., Chung V., Zirin J., Perrimon N., Mohr S.E. // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. № D1. P. D908–D915.
- Cooley L., Kelley R., Spradling A. // *Science.* 1988. V. 239. № 4844. P. 1121–1128.
- Bokel C. // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 420. P. 119–138.
- Braun A., Lemaitre B., Lanot R., Zachary D., Meister M. // *Genetics.* 1997. V. 147. № 2. P. 623–634.
- Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 3. P. 19–40.
- Friedman A., Perrimon N. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004. V. 14. № 5. P. 470–476.
- Sinenko S.A., Kim E.K., Wynn R., Manfrulli P., Ando I., Wharton K.A., Perrimon N., Mathey-Prevot B. // *Dev. Biol.* 2004. V. 273. № 1. P. 48–62.
- Kaufman T.C. // *Genetics.* 2017. V. 206. № 2. P. 665–689.
- St Johnston D. // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. № 3. P. 176–188.
- Reitman Z.J., Sinenko S.A., Spana E.P., Yan H. // *Blood.* 2015. V. 125. № 2. P. 336–345.
- Sinenko S.A., Hung T., Moroz T., Tran Q.M., Sidhu S., Cheney M.D., Speck N.A., Banerjee U. // *Blood.* 2010. V. 116. № 22. P. 4612–4620.
- Hales K.G., Korey C.A., Larracuenta A.M., Roberts D.M. // *Genetics.* 2015. V. 201. № 3. P. 815–842.
- Schneider D. // *Nat. Rev. Genet.* 2000. V. 1. № 3. P. 218–226.
- Perrimon N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 17. P. 9716–9717.
- Celniker S.E., Rubin G.M. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2003. V. 4. P. 89–117.
- Sinenko S.A. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 41. P. 70452–70462.
- Yang C.S., Sinenko S.A., Thomenius M.J., Robeson A.C., Freel C.D., Horn S.R., Kornbluth S. // *Cell Death Differ.* 2014. V. 21. № 4. P. 604–611.
- Shrestha R., Gateff E. // *Dev. Growth. Differ.* 1982. V. 24. № 1. P. 65–82.
- Mathey-Prevot B., Perrimon N. // *Cell.* 1998. V. 92. № 6. P. 697–700.
- Lanot R., Zachary D., Holder F., Meister M. // *Dev. Biol.* 2001. V. 230. № 2. P. 243–257.
- Evans C.J., Hartenstein V., Banerjee U. // *Dev. Cell.* 2003. V. 5. № 5. P. 673–690.
- Millar D.A., Ratcliffe N.A. // *Endeavour.* 1989. V. 13. № 2. P. 72–77.
- Evans C.J., Sinenko S.A., Mandal L., Martinez-Agosto J.A., Hartenstein V., Banerjee U., Rolf B. Genetic Dissection of Hematopoiesis Using *Drosophila* as a Model System // *Advances in Developmental Biology.* Elsevier, 2007. P. 259.
- Honti V., Csordas G., Kurucz E., Markus R., Ando I. // *Dev. Comp. Immunol.* 2014. V. 42. № 1. P. 47–56.
- Koranteng F., Cho B., Shim J. // *Mol. Cells.* 2022. V. 45. № 3. P. 101–108.
- Banerjee U., Girard J.R., Goins L.M., Spratford C.M. // *Genetics.* 2019. V. 211. № 2. P. 367–417.
- Morin-Poulard I., Tian Y., Vanzo N., Crozatier M. // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 719349.
- Kharrat B., Csordas G., Honti V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 14. P. 7767.
- Tepass U., Fessler L.I., Aziz A., Hartenstein V. // *Development.* 1994. V. 120. № 7. P. 1829–1837.
- Holz A., Bossinger B., Strasser T., Janning W., Klapper R. // *Development.* 2003. V. 130. № 20. P. 4955–4962.
- Honti V., Csordas G., Markus R., Kurucz E., Jankovics F., Ando I. // *Mol. Immunol.* 2010. V. 47. № 11–12. P. 1997–2004.
- Ghosh S., Singh A., Mandal S., Mandal L. // *Dev. Cell.* 2015. V. 33. № 4. P. 478–488.
- Srdić Ž., Reinhardt C. // *Science.* 1980. V. 207. № 4437. P. 1375–1377.
- Gateff E. // *Science.* 1978. V. 200. № 4349. P. 1448–1459.
- Jung S.H., Evans C.J., Uemura C., Banerjee U. // *Development.* 2005. V. 132. № 11. P. 2521–2533.
- Rugendorff A., Younossi-Hartenstein A., Hartenstein V. //

- Roux Arch. Dev. Biol. 1994. V. 203. № 5. P. 266–280.
43. Cho B., Yoon S.H., Lee D., Koranteng F., Tattikota S.G., Cha N., Shin M., Do H., Hu Y., Oh S. Y., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 4483.
44. Cattenoz P.B., Monticelli S., Pavlidaki A., Giangrande A. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 643712.
45. Fu Y., Huang X., Zhang P., van de Leemput J., Han Z. // *J. Genet. Genomics.* 2020. V. 47. № 4. P. 175–186.
46. Cattenoz P.B., Sakr R., Pavlidaki A., Delaporte C., Riba A., Molina N., Hariharan N., Mukherjee T., Giangrande A. // *EMBO J.* 2020. V. 39. № 12. P. e104486.
47. Tattikota S.G., Cho B., Liu Y., Hu Y., Barrera V., Steinbaugh M.J., Yoon S.H., Comjean A., Li F., Dervis F., et al. // *Elife.* 2020. V. 9. P. e54818.
48. Russo J., Dupas S., Frey F., Carton Y., Brehelin M. // *Parasitology.* 1996. V. 112 (Pt 1). P. 135–142.
49. Brehelin M. // *Cell Tissue. Res.* 1982. V. 221. № 3. P. 607–615.
50. Charroux B., Royet J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 24. P. 9797–9802.
51. Kurucz E., Vaczi B., Markus R., Laurinyecz B., Vilmos P., Zsomboki J., Csorba K., Gateff E., Hultmark D., Ando I. // *Acta Biol. Hung.* 2007. V. 58 Suppl. P. 95–111.
52. Franc N.C., Heitzler P., Ezekowitz R.A., White K. // *Science.* 1999. V. 284. № 5422. P. 1991–1994.
53. Kocks C., Cho J. H., Nehme N., Ulvila J., Pearson A. M., Meister M., Strom C., Conto S. L., Hetru C., Stuart L. M., et al. // *Cell.* 2005. V. 123. № 2. P. 335–346.
54. Bretscher A.J., Honti V., Binggeli O., Burri O., Poidevin M., Kurucz E., Zsomboki J., Ando I., Lemaitre B. // *Biol. Open.* 2015. V. 4. № 3. P. 355–363.
55. Irving P., Ubada J.M., Doucet D., Troxler L., Lagueux M., Zachary D., Hoffmann J.A., Hetru C., Meister M. // *Cell. Microbiol.* 2005. V. 7. № 3. P. 335–350.
56. Kurucz E., Markus R., Zsomboki J., Folkl-Medzihradzsky K., Darula Z., Vilmos P., Udvardy A., Krausz I., Lukacsovich T., Gateff E., et al. // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 7. P. 649–654.
57. Баландин С.В., Овчинникова Т.В. // *Биооргани. химия.* 2016. V. 42. № 3. С. 255–275.
58. Olofsson B., Page D.T. // *Dev. Biol.* 2005. V. 279. № 1. P. 233–243.
59. Bunt S., Hooley C., Hu N., Scahill C., Weavers H., Skaer H. // *Dev. Cell.* 2010. V. 19. № 2. P. 296–306.
60. Nelson R.E., Fessler L.I., Takagi Y., Blumberg B., Keene D.R., Olson P.F., Parker C.G., Fessler J.H. // *EMBO J.* 1994. V. 13. № 15. P. 3438–3447.
61. Defaye A., Evans I., Crozatier M., Wood W., Lemaitre B., Leulier F. // *J. Innate Immun.* 2009. V. 1. № 4. P. 322–334.
62. Sears H.C., Kennedy C.J., Garrity P.A. // *Development.* 2003. V. 130. № 15. P. 3557–3565.
63. Guillou A., Troha K., Wang H., Franc N.C., Buchon N. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. № 10. P. e1005961.
64. Shia A.K., Glittenberg M., Thompson G., Weber A.N., Reichhart J.M., Ligoxygakis P. // *J. Cell Sci.* 2009. V. 122. № 24. P. 4505–4515.
65. Binggeli O., Neyen C., Poidevin M., Lemaitre B. // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. № 5. P. e1004067.
66. Dudzic J.P., Kondo S., Ueda R., Bergman C.M., Lemaitre B. // *BMC Biol.* 2015. V. 13. P. 81.
67. Tang H., Kambris Z., Lemaitre B., Hashimoto C. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 38. P. 28097–28104.
68. Nam H.J., Jang I.H., You H., Lee K.A., Lee W.J. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 5. P. 1253–1265.
69. Nappi A.J., Vass E., Frey F., Carton Y. // *Eur. J. Cell. Biol.* 1995. V. 68. № 4. P. 450–456.
70. Ramet M., Manfrulli P., Pearson A., Mathey-Prevot B., Ezekowitz R.A. // *Nature.* 2002. V. 416. № 6881. P. 644–648.
71. Galko M.J., Krasnow M.A. // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. № 8. P. E239.
72. Neyen C., Binggeli O., Roversi P., Bertin L., Sleiman M.B., Lemaitre B. // *Dev. Comp. Immunol.* 2015. V. 50. № 2. P. 166–174.
73. Rizki T.M., Rizki R.M. // *Dev. Comp. Immunol.* 1992. V. 16. № 2–3. P. 103–110.
74. Shrestha R., Gateff E. // *Development, Growth and Differentiation.* 1982. V. 24. № 1. P. 83–98.
75. Anderl I., Vesala L., Ihalainen T.O., Vanha-Aho L.M., Ando I., Ramet M., Hultmark D. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. № 7. P. e1005746.
76. Nam H.J., Jang I.H., Asano T., Lee W.J. // *Mol. Cells.* 2008. V. 26. № 6. P. 606–610.
77. Honti V., Kurucz E., Csordas G., Laurinyecz B., Markus R., Ando I. // *Immunol. Lett.* 2009. V. 126. № 1–2. P. 83–84.
78. Tokusumi T., Shoue D.A., Tokusumi Y., Stoller J.R., Schulz R.A. // *Genesis.* 2009. V. 47. № 11. P. 771–774.
79. Evans C.J., Liu T., Banerjee U. // *Methods.* 2014. V. 68. № 1. P. 242–251.
80. Rus F., Kurucz E., Markus R., Sinenko S.A., Laurinyecz B., Pataki C., Gausz J., Hegedus Z., Udvardy A., Hultmark D., et al. // *Gene Expr. Patterns.* 2006. V. 6. № 8. P. 928–934.
81. Sinenko S.A., Mathey-Prevot B. // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 56. P. 9120–9128.
82. Semenova N.Y., Bessmel'tsev S.S., Rugal' V.I. // *Klin. Onkogematol.* 2014. V. 7. № 4. P. 501–510.
83. Charbord P., Pouget C., Binder H., Dumont F., Stik G., Levy P., Allain F., Marchal C., Richter J., Uzan B., et al. // *Cell Stem Cell.* 2014. V. 15. № 3. P. 376–391.
84. Belyavsky A., Petinati N., Drize N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 17. P. 9231.
85. Comazzetto S., Shen B., Morrison S. J. // *Dev. Cell.* 2021. V. 56. № 13. P. 1848–1860.
86. Morrison S.J., Spradling A.C. // *Cell.* 2008. V. 132. № 4. P. 598–611.
87. Fuller M.T., Spradling A.C. // *Science.* 2007. V. 316. № 5823. P. 402–404.
88. Homem C.C., Knoblich J.A. // *Development.* 2012. V. 139. № 23. P. 4297–4310.
89. Micchelli C.A., Perrimon N. // *Nature.* 2006. V. 439. № 7075. P. 475–479.
90. Minakhina S., Steward R. // *Development.* 2010. V. 137. № 1. P. 27–31.
91. Dey N.S., Ramesh P., Chugh M., Mandal S., Mandal L. // *Elife.* 2016. V. 5. P. e18295.
92. Ho K.Y.L., Carr R.L., Dvoskin A.D., Tanentzapf G. // *Elife.* 2023. V. 12. P. e84085.
93. Girard J.R., Goins L.M., Vuu D.M., Sharpley M.S., Spratford C.M., Mantri S.R., Banerjee U. // *Elife.* 2021. V. 10. P. e67516.
94. Mandal L., Banerjee U., Hartenstein V. // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. № 9. P. 1019–1023.
95. Medvinsky A., Dzierzak E. // *Cell.* 1996. V. 86. № 6. P. 897–906.
96. Mandal L., Martinez-Agosto J.A., Evans C.J., Hartenstein V., Banerjee U. // *Nature.* 2007. V. 446. № 7133. P. 320–324.
97. Crozatier M., Ubada J.M., Vincent A., Meister M. // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. № 8. P. E196.
98. Rodrigues D., Renaud Y., VijayRaghavan K., Waltzer L., Inamdar M. S. // *Elife.* 2021. V. 10. P. e61409.
99. Sinenko S.A., Mandal L., Martinez-Agosto J.A., Banerjee U. // *Dev. Cell.* 2009. V. 16. № 5. P. 756–763.
100. Owusu-Ansah E., Banerjee U. // *Nature.* 2009. V. 461.

- № 7263. P. 537–541.
101. Crozatier M., Meister M. // *Cell. Microbiol.* 2007. V. 9. № 5. P. 1117–1126.
 102. Krzemien J., Dubois L., Makki R., Meister M., Vincent A., Crozatier M. // *Nature.* 2007. V. 446. № 7133. P. 325–328.
 103. Mondal B.C., Mukherjee T., Mandal L., Evans C.J., Sinenko S.A., Martinez-Agosto J. A., Banerjee U. // *Cell.* 2011. V. 147. № 7. P. 1589–1600.
 104. Tokusumi Y., Tokusumi T., Shoue D.A., Schulz R.A. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 7. P. e41604.
 105. Lebestky T., Jung S.H., Banerjee U. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 3. P. 348–353.
 106. Krzemien J., Oyallon J., Crozatier M., Vincent A. // *Dev. Biol.* 2010. V. 346. № 2. P. 310–319.
 107. Mohammad K., Dakik P., Medkour Y., Mitrofanova D., Titorenko V.I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 9. P. 2158.
 108. Hombria J.C., Brown S., Hader S., Zeidler M.P. // *Dev. Biol.* 2005. V. 288. № 2. P. 420–433.
 109. Benmimoun B., Polesello C., Haenlin M., Waltzer L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 29. P. 9052–9057.
 110. Oyallon J., Vanzo N., Krzemien J., Morin-Poulard I., Vincent A., Crozatier M. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 2. P. e0148978.
 111. Grigorian M., Liu T., Banerjee U., Hartenstein V. // *Dev. Biol.* 2013. V. 384. № 2. P. 301–312.
 112. Makhijani K., Alexander B., Tanaka T., Rulifson E., Bruckner K. // *Development.* 2011. V. 138. № 24. P. 5379–5391.
 113. Goto A., Kadowaki T., Kitagawa Y. // *Dev. Biol.* 2003. V. 264. № 2. P. 582–591.
 114. Mukherjee T., Kim W. S., Mandal L., Banerjee U. // *Science.* 2011. V. 332. № 6034. P. 1210–1213.
 115. Terriente-Felix A., Li J., Collins S., Mulligan A., Reekie I., Bernard F., Krejci A., Bray S. // *Development.* 2013. V. 140. № 4. P. 926–937.
 116. Lebestky T., Chang T., Hartenstein V., Banerjee U. // *Science.* 2000. V. 288. № 5463. P. 146–149.
 117. Tokusumi T., Sorrentino R.P., Russell M., Ferrarese R., Govind S., Schulz R. A. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 7. P. e6429.
 118. Spratford C.M., Goins L.M., Chi F., Girard J.R., Macias S.N., Ho V.W., Banerjee U. // *Development.* 2021. V. 148. № 24. P. 200216.
 119. Ferguson G.B., Martinez-Agosto J.A. // *Dev. Biol.* 2017. V. 425. № 1. P. 21–32.
 120. Shim J., Mukherjee T., Mondal B.C., Liu T., Young G.C., Wijewarnasuriya D.P., Banerjee U. // *Cell.* 2013. V. 155. № 5. P. 1141–1153.
 121. Baldeosingh R., Gao H., Wu X., Fossett N. // *Dev. Biol.* 2018. V. 441. № 1. P. 132–145.
 122. Benmimoun B., Polesello C., Waltzer L., Haenlin M. // *Development.* 2012. V. 139. № 10. P. 1713–1717.
 123. Pannetier D., Oyallon J., Morin-Poulard I., Dejean S., Vincent A., Crozatier M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 9. P. 3389–3394.
 124. Khadilkar R.J., Rodrigues D., Mote R.D., Sinha A.R., Kulkarni V., Magadi S.S., Inamdar M.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 13. P. 4898–4903.
 125. Destalminil-Letourneau M., Morin-Poulard I., Tian Y., Vanzo N., Crozatier M. // *Elife.* 2021. V. 10. P. e64672.
 126. Morin-Poulard I., Sharma A., Louradour I., Vanzo N., Vincent A., Crozatier M. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11634.
 127. Ramesh P., Dey N. S., Kanwal A., Mandal S., Mandal L. // *Elife.* 2021. V. 10. P. e67158.
 128. Ho K.Y.L., An K., Carr R.L., Dvoskin A.D., Ou A.Y.J., Vogl W., Tanentzapf G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2023. V. 120. № 45. P. e2303018120.
 129. Sinenko S.A., Shim J., Banerjee U. // *EMBO Rep.* 2012. V. 13. № 1. P. 83–89.
 130. Louradour I., Sharma A., Morin-Poulard I., Letourneau M., Vincent A., Crozatier M., Vanzo N. // *Elife.* 2017. V. 6. P. e25496.
 131. Gao H., Wu X., Fossett N. // *Molecular and Cellular Biology.* 2009. V. 29. № 22. P. 6086–6096.
 132. Zhang C.U., Cadigan K.M. // *Development.* 2017. V. 144. № 13. P. 2415–2427.
 133. Zhang C.U., Blauwkamp T.A., Burby P.E., Cadigan K.M. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 8. P. e1004509.
 134. Goins L.M., Girard J.R., Mondal B.C., Buran S., Su C.C., Tang R., Biswas T., Banerjee U. // *bioRxiv.* 2023. 10.1101/2023.06.29.547151. P. 2023.2006.2029.547151.
 135. Dragojlovic-Munther M., Martinez-Agosto J.A. // *Dev. Biol.* 2013. V. 384. № 2. P. 313–330.
 136. Zhang W., Wang D., Si J., Jin L. H., Hao Y. // *Cells.* 2023. V. 12. № 4. P. 661.
 137. Makki R., Meister M., Pannetier D., Ubeda J.M., Braun A., Daburon V., Krzemien J., Bourbon H.M., Zhou R., Vincent A., et al. // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. № 8. P. e1000441.
 138. Flaherty M.S., Salis P., Evans C. J., Ekas L. A., Marouf A., Zavadil J., Banerjee U., Bach E.A. // *Dev. Cell.* 2010. V. 18. № 4. P. 556–568.
 139. Minakhina S., Tan W., Steward R. // *Dev. Biol.* 2011. V. 352. № 2. P. 308–316.
 140. Gao H., Wu X., Fossett N. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 9. P. e74684.
 141. Kulkarni V., Khadilkar R.J., Magadi S.S., Inamdar M.S. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 11. P. e27667.
 142. Sinha A., Khadilkar R.J., S V.K., Roychowdhury Sinha A., Inamdar M. S. // *Cell Rep.* 2013. V. 4. № 4. P. 649–658.
 143. Sinenko S.A., Starkova T.Y., Kuzmin A.A., Tomilin A.N. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 714370.
 144. Lennicke C., Cocheme H.M. // *Mol. Cell.* 2021. V. 81. № 18. P. 3691–3707.
 145. Gao H., Wu X., Simon L., Fossett N. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 9. P. e107768.
 146. Cho B., Shin M., Chang E., Son S., Shin I., Shim J. // *Dev. Cell.* 2024. V. 59. № 8. P. 1075–1090.
 147. Dolezal T., Dolezelova E., Zurovec M., Bryant P. J. // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 7. P. e201.
 148. Bajgar A., Dolezal T. // *PLoS Pathog.* 2018. V. 14. № 4. P. e1007022.
 149. Belenkaya T.Y., Han C., Yan D., Opoka R.J., Khoudoun M., Liu H., Lin X. // *Cell.* 2004. V. 119. № 2. P. 231–244.
 150. Hao Y., Jin L.H. // *Elife.* 2017. V. 6. P. e25094.
 151. Khadilkar R.J., Vogl W., Goodwin K., Tanentzapf G. // *Elife.* 2017. V. 6. P. e28081.
 152. Labrosse C., Eslin P., Doury G., Drezen J.M., Poirie M. // *J. Insect Physiol.* 2005. V. 51. № 2. P. 161–170.
 153. Nassel D.R., Liu Y., Luo J. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015. V. 221. P. 255–266.
 154. Dragojlovic-Munther M., Martinez-Agosto J.A. // *Development.* 2012. V. 139. № 20. P. 3752–3763.