

УДК 57.087.1

ГЛАЗНОЙ ИМАГИНАЛЬНЫЙ ДИСК ДРОЗОФИЛЫ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ИЗОБРАЖЕНИЙ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

© 2022 г. К.Н. Козлов*, Е.В. Голубкова**, Л.А. Мамон**, М.Г. Самсонова*, С.Ю. Суркова*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

**Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9

E-mail: surkova_syu@spbstu.ru

Поступила в редакцию 14.01.2022 г.

После доработки 14.01.2022 г.

Принята к публикации 21.01.2022 г.

Для получения точной информации по характеру экспрессии генов на основе конфокальных изображений нужно четко выявлять границы отдельных клеток. Помимо этого, анализ формы клеток необходим для понимания морфогенетических процессов, таких как растяжение, сжатие и формирование складок тканей. Показательной модельной системой, иллюстрирующей такие процессы, является имагинальный зачаток глаза (глазной имагинальный диск) плодовой мушки дрозофилы. В данной работе мы разработали ряд процедур количественного анализа клеточной структуры глазного диска на основе использования флуоресцентного меченя эпителиального слоя различными маркерами. Все методы обработки изображений реализованы в созданной авторами программе ProStack. Описанные в статье методы могут быть адаптированы для количественной оценки формы клеток и анализа экспрессии генов в других эпителиальных тканях.

Ключевые слова: обработка изображений, эпителиальные клетки, имагинальный глазной диск, дрозофила

DOI: 10.31857/S0006302922020119

Пласты эпителиальных клеток выстилают многие органы и полости тела. В частности, однослойный эпителий характерен для многих отделов пищеварительного тракта, почечных канальцев, протоков желез. Получение конфокальных изображений высокого разрешения позволяет выявить патологии, связанные с изменением экспрессии генов, а также детектировать нарушения формы, размеров и структуры клеток в ходе развития.

Для извлечения точной информации по характеру экспрессии генов нужно четко определять границы отдельных клеток, составляющих слой эпителия. Очень часто в ходе морфогенеза соседние клетки могут выполнять принципиально разные функции. При этом на клетки могут действовать одни и те же диффундирующие морфогены, однако в каждой клетке будут экспрессироваться свои транскрипционные факторы.

Показательной модельной системой, иллюстрирующей такие процессы, является имаги-

нальный зачаток глаза (глазной имагинальный диск) плодовой мушки дрозофилы. Глазной диск представляет собой эпителиальную структуру, состоящую из двух слоев. Интерес представляет слой, называемый disc proper [1]. Это однослойный столбчатый эпителий, который в ходе развития личинки дрозофилы третьего возраста преобразуется в четкую структуру будущих фоторецепторов посредством генных взаимодействий и морфологических преобразований [2, 3]. Спецификация фоторецепторов происходит в постериорно-антериорном направлении посредством прохождения морфогенетической борозды (МБ), эпителиального впячивания вдоль диска (рис. 1). Недифференцированные эпителиальные клетки в антериорной части диска после прохождения МБ дифференцируются в различные типы фоторецепторов и других клеток, составляющих омматидий – светочувствительную единицу глаза. В антериорной области перед фронтом МБ происходит апикальное сужение клеток, которое контролируется геном *hedgehog* (*hh*) [4]. Широкий градиент *hh* способствует движению МБ, а также дифференцировке будущих фоторецепторов.

Сокращения: МБ – морфогенетическая борозда, Fas III – фасцилин III, DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол.

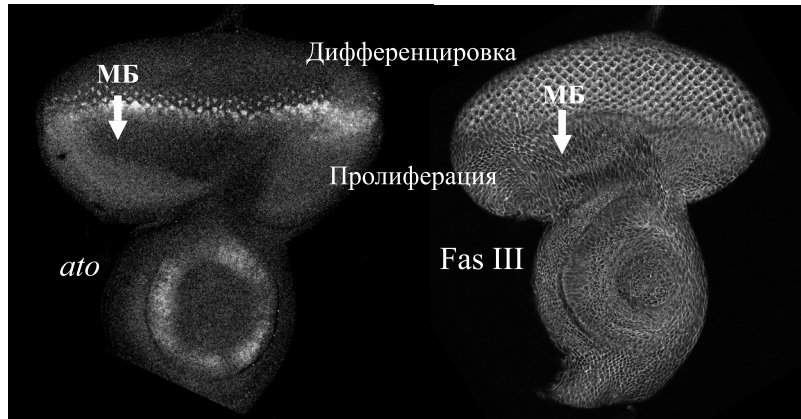


Рис. 1. Примеры конфокальных изображений экспрессии генов в глазном имагинальном диске. Показана экспрессия proneurального гена *ato* и маркера латеральных клеточных стенок Fas III. Направление, в котором проходит дифференцировка, показано белой стрелкой. МБ – морфогенетическая борозда, движущаяся в постериорно-антериорном направлении. На изображениях в области дифференцировки видно формирование структурированного паттерна фоторецепторов.

При этом лишь некоторые клетки экспрессируют proneurальный ген *atonal (ato)* – это будущие фоторецепторы R8 (рис. 1). Генная сеть, регулирующая ген *ato*, задает четкое пространственное расположение этих клеток, что в дальнейшем определяет упорядоченный паттерн сложного глаза [5].

В данной работе мы суммируем методы обработки изображений глазного диска дрозофилы, разработанные нами для решения различных задач. Как описано выше, в ходе дифференцировки глазного диска его клетки меняют форму и взаимное расположение. Для анализа механизмов спецификации фоторецепторов в глазном диске важно, во-первых, определить границы клеток и их форму, а также, во-вторых, определить значения уровней экспрессии генов в каждой клетке с высокой точностью. Все процедуры обработки изображений реализованы в разработанной авторами программе ProStack [6] и могут быть адаптированы для анализа морфогенеза других эпителиальных тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Флуоресцентное окрашивание белкового продукта фасцилин III (Fasciclin III, Fas III) проводили у личинок *D. melanogaster* третьего возраста методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью первичных антител anti-Fas III (Developmental Studies Hybridoma Bank, NIH, США) и вторичных антител Alexa Fluor 405 (Invitrogen, США). F-актин [7] метили с помощью фаллоидина, конъюгированного с FITC (Fluorescein Isothiocyanate labeled Phalloidin, Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Экспрессию генов на уровне

мРНК оценивали методом цепной реакции гибридизации *in situ* ([8], см. подробный протокол в работе [9]). После флуоресцентного мечения глазные имагинальные диски заключали на стекла в среду ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher). Для окрашивания ядер использовали ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Leica TSC SP5 (Leica Microsystems, Германия) и микроскопа Zeiss 700 (Carl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для извлечения количественной информации из наборов изображений развивающегося глаза дрозофилы был разработан ряд методов, включающих определение контуров и формы клеток, а также извлечение количественной информации по экспрессии генов в каждой клетке.

Обработку изображений проводили с помощью разработанной авторами программы ProStack, ранее применявшийся для обработки изображений эндоцитарных везикул в клетках HeLa и эмбриона дрозофилы на стадии бластодермы [6, 9–11].

Создание маски клеточной структуры на основе экспрессии различных маркеров. На первом этапе строилась бинарная маска всей области глазного диска для приведения всех изображений трехмерного набора к единой ориентации. Далее для определения точных границ и формы клеток осуществлялось построение масок клеточной структуры. Точные данные о границах клеток и их взаимном расположении позволяют правильно оценить уровни экспрессии генов в каждой клетке. Ниже описаны особенности сегментации изобра-

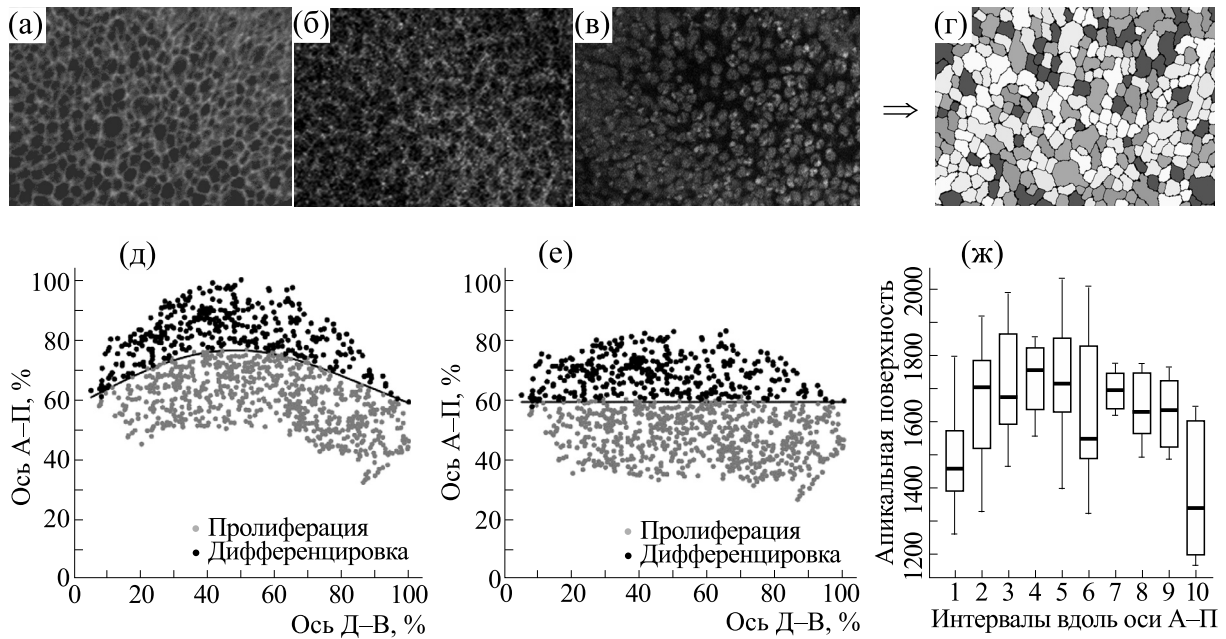


Рис. 2. Построение масок клеточной структуры и анализ формы клеток с помощью мечения глазного диска различными маркерами. Показаны примеры конфокальных изображений клеток глазных дисков, окрашенных Fas III (а), фаллоидином (б) и DAPI (в). В результате обработки в каждом случае получают изображения контуров клеток (г). Различные оттенки серого на рисунке (г) обозначают клетки, имеющие разную форму (разное число сторон). После анализа формы и положения каждой клетки в глазном диске производится аппроксимация морфогенетической борозды квадратичными сплайнами и пространственная регистрация всех полученных изображений (д, е). Для выявления степени апикального сужения клеток в зависимости от их пространственного положения относительно МБ данные вдоль anteriorno-постериорной оси разделены на десять интервалов и для каждого рассчитана средняя площадь поверхности клеток (ж).

жений эпителиальных клеток на основе мечения различными маркерами.

Мечение глазных дисков фасциклином III. Fas III — это мембранный гликопротеин, который в ходе развития личинки дрозофилы экспрессируется в нейронах и имгинальных дисках, где может служить маркером латеральных клеточных стенок [12, 13]. В глазном диске Fas III хорошо выявляет границы клеток [14] (рис. 1). Однако при таком методе окрашивания изображения области дифференцировки зачатка глаза (рис. 2а) различаются в апикально-базальном направлении. На апикальных оптических срезах лучше видны границы всего омматидия, а на базальных срезах — границы отдельных клеток, составляющих омматидий. При этом в области пролиферации границы клеток одинаково четко видны на всех срезах. В ходе обработки экспериментальные изображения в градациях серого подвергаются преобразованию выравнивания гистограммы, затем размер изображения увеличивается для более точного определения границ объектов. Метод морфологической реконструкции [15], применяется к исходному и инвертированному изображению, максимум между результирующими изображениями используется для определения границ объектов [11].

Мечение актинового цитоскелета при помощи фаллоидина. Данный тип окрашивания широко применяется в биологии и применительно к нашей задаче позволяет выявлять клетки глазного диска, однако их контуры обозначены нечетко (рис. 2б). В этом случае метод морфологической реконструкции, упомянутый выше, наиболее эффективен.

Использование ДНК-маркера 4',6-диамидино-2-фенилиндола. Этот тип окрашивания (рис. 2в) может быть успешно применен сразу по нескольким причинам. Во-первых, при анализе экспрессии генов на уровне белка транскрипционные факторы, такие как Ato, локализуются в клеточном ядре. Следовательно, 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) может дать наиболее четкое представление о характере локализации таких белков. Во-вторых, в случаях загибов и деформации клеточных стенок, обусловленных фиксацией и заключением препаратов глазных дисков в среду перед микроскопией, окрашивание ядер помогают разделить области соседних клеток. Помимо этого, мечение DAPI позволяет восстановить клеточную структуру в отсутствие других маркеров. В этом случае изображения ядер клеток подвергаются выравниванию интенсивности внутри объектов с помощью

медианной фильтрации и последовательности морфологических преобразований расширения и сужения с несколькими структурными элементами. Дальнейшее сглаживание включает локальное выравнивание гистограммы и морфологическое размыкание. Применение преобразования водоотлива позволяет восстановить границы областей, примыкающих к объектам-ядрам. Данные области после коррекции границ путем морфологической реконструкции инвертированного изображения определяются как клетки.

Гексагональная сетка. В случае невозможности определить границы клеток с использованием биологического маркера строится искусственная клеточная структура, отражающая биологически обусловленную гексагональную форму клеток [16]. С помощью наложения этой структуры на изображение глазного диска извлекается информация по уровням экспрессии каждого гена.

Анализ формы клеток. Одним из инструментов анализа клеточных перестроек в ходе морфогенеза является создание вершинных моделей (vertex models). Вершинные модели связывают изменения формы клеток, обусловленные внутриклеточными процессами, с растяжением, сжатием и формированием складок тканей, что в итоге определяет форму всего организма [17].

Имагинальные диски дрозофилы представляют собой удобную модельную систему для такого анализа [18]. В ходе спецификации фоторецепторов глазного диска основным морфогенетическим процессом является движение МБ вдоль эпителиального пласта. Для определения степени апикального сужения клеток в зоне МБ требуется выявлять точную площадь апикальной поверхности клеток и количество соседних клеток.

Был разработан алгоритм для определения количества сторон многоугольника, наилучшим образом описывающего форму клетки с заданной погрешностью. Из геометрического центра пикселей клетки с шагом в один градус проводили радиус-вектор до границы клетки, в результате чего получали табличную функцию с 360 отсчетами. Количество сторон многоугольника вычисляли как число максимумов этой функции, которое определяли как количество перемен знака ее конечно-разностной производной при условии отличия значения в найденной точке от соседних не меньше, чем на величину заданной погрешности. Таким образом, клетки были классифицированы как имеющие от трех до девяти сторон (рис. 2г).

Для выявления степени апикального сужения клеток в зависимости от их пространственного положения относительно МБ использовали набор количественных данных для выборки глазных дисков (на рис. 2ж показаны усредненные данные для семи дисков).

Вначале проводили пространственную регистрацию данных так, чтобы МБ, а также антериорные и постериорные полюса всех дисков совпадали по координате. Для этого МБ аппроксимировали квадратичными сплайнами (рис. 2д,е). Области пролиферации и дифференцировки разделяли на пять интервалов каждую, что составило по 10 интервалов на каждый диск. Интервал № 1 включал антериорный полюс диска, а интервал № 10 — постериорный полюс. Ось y на графиках показанных на рис. 2ж, соответствует антериорно-постериорной оси и перпендикулярна МБ. Соответственно каждый интервал включает клетки, y -координата центроида которых попадает в этот интервал. На этом этапе мы пренебрегаем x -координатой (вдоль дорсо-вентральной оси) и для каждого глазного диска получаем среднюю площадь апикальной поверхности клеток для каждого интервала. На рис. 2ж мы видим, что апикальная поверхность клеток сокращается в интервале № 6, что соответствует антериорной области перед МБ. Сужение в интервалах № 1 и № 10 обусловлено погрешностями экспериментальных изображений по краям дисков.

Извлечение количественных данных по экспрессии генов. Перед сегментацией изображений картин экспрессии генов на уровне мРНК вначале изображения, представленные в градациях серого, проходят несколько этапов улучшения, таких как удаление дробового шума, медианную фильтрацию с несколькими структурными элементами, локальное выравнивание гистограммы, морфологическое размыкание. Далее проводится детекция частиц, включающих одну или несколько молекул, путем определения контуров по методу Кэнни с последующим заполнением, разделением через преобразование расстояния и пороговую фильтрацию [16]. Особое внимание уделяется контролю качества сегментации, что включает цензурирование частиц по размеру и интенсивности, отслеживание частиц на нескольких срезах и определение уровня фонового сигнала.

Количественные данные по экспрессии генов на уровне мРНК получают путем анализа интенсивности, локализации и количества частиц в каждой клетке. Для изображений, полученных методом иммунофлуоресцентного окрашивания, рассчитывают средний уровень флуоресценции в каждой клетке и позицию ее центроида.

Положение МБ определяют на основе экспрессии маркеров клеточной структуры либо генов, ответственных за дифференцировку глазного диска (например, в позиции перекрывания областей экспрессии *hairy (h)* и *ato*). Форма МБ аппроксимируется сплайнами, при этом число степеней свободы и другие параметры подбирают так, чтобы кривая визуально совпадала с позицией МБ на изображениях. Для пространственной

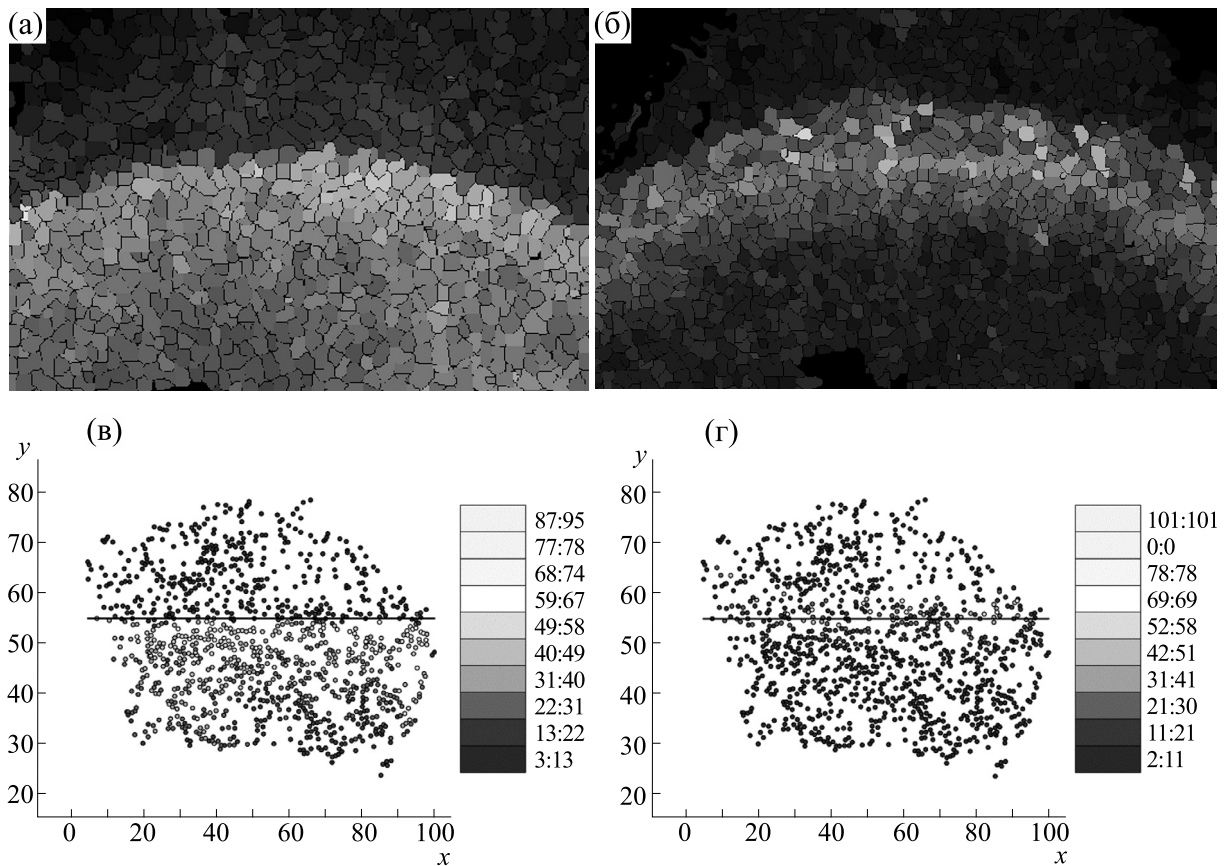


Рис. 3. Получение количественных данных по экспрессии генов. Показаны средние уровни экспрессии *h* (а,в) и *ato* (б,г) в каждой клетке, представленные в виде реконструированных изображений (а,б) и графиков (б,г).

регистрации наборов изображений всех глазных дисков производится выпрямление МБ путем аффинного преобразования (рис. 3).

На рис. 3 представлены количественные данные по экспрессии *h* (рис. 3а,в) и *ato* (рис. 3б,г), усредненные в каждой клетке, в виде реконструированных изображений (рис. 3а,б) и графиков (рис. 3б,г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие дрозофилы является широко используемой моделью для изучения процессов пролиферации и дифференцировки клеток. Этот модельный объект позволяет исследовать характер экспрессии генов как в фиксированных, так и в живых тканях. Как известно, многие ключевые регуляторы морфогенетических процессов, такие как Hedgehog и Notch, были впервые выявлены у дрозофилы.

В этой работе нами разработаны и реализованы процедуры анализа клеточной структуры эпителиальной ткани на примере динамического процесса дифференцировки фоторецепторов в

развивающемся имагинальном глазном диске дрозофилы.

Количественный анализ проводили с использованием ряда маркеров клеточных стенок и ядер. На основе этого оценивали форму и расположение клетки, а также извлекали точную информацию по уровням экспрессии генов. Так как экспрессия каждого из маркеров имеет свои особенности, наиболее точное построение масок клеточных структур достигается путем окрашивания глазных дисков одновременно и маркером клеточных стенок, и DAPI.

В публикациях, посвященных механизмам формирования паттерна в имагинальных дисках, методы обработки изображений нередко нацелены либо на получение данных по экспрессии генов высокого разрешения, либо на детальное изучение динамики клеточной структуры [16, 18]. Анализ формы клеток в сочетании с получением точных данных по экспрессии генов позволяет всесторонне исследовать механизмы формирования паттерна. Описанные в статье методы могут быть адаптированы для количественной оценки

клеточной структуры и анализа экспрессии генов в других эпителиальных тканях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изображения картин экспрессии генов были получены в Центре коллективного пользования «Хромас» СПбГУ (Санкт-Петербург, Россия) и в Центре микроскопии Университета Южной Калифорнии (Лос-Анджелес, США).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-01047-а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Smith-Bolton, *Adv. Wound Care* **5** (6), 251 (2016). DOI: 10.1089/wound.2014.0547
2. J. Y. Roignant and J. E. Treisman, *Int. J. Devel. Biol.* **53**, 795 (2009). DOI: 10.1387/ijdb.072483jr
3. J. E. Treisman, *WIREs Dev. Biol.* **2** (4), 545 (2013). DOI: 10.1002/wdev.100

4. D. Corrigan, R. F. Walther, L. Rodriguez, et al., *Devel. Cell* **13** (5), 730 (2007). DOI: 10.1016/j.devcel.2007.09.015
5. B. J. Frankfort and G. Mardon, *Development* **129**, 1295 (2002).
6. K. Kozlov, A. Pisarev, J. Kaandorp, et al., in *Abstr. Book of the 9th Int. Conf. Syst. Biol.* (Goteborg, 2008), p. 191.
7. V. DesMarais, R. J. Eddy, V. P. Sharma, et al., *Bio-Techniques* **66**, 113 (2019). DOI: 10.2144/btn-2018-0112
8. H. M. Choi, V. A. Beck, N. A. Pierce, et al., *ACS Nano* **8**, 4284 (2014). DOI: 10.1021/nn405717p
9. S. Surkova, A. Sokolkova, K. Kozlov, et al., *Devel. Biol.* **448**, 48 (2019). DOI: 10.1016/j.ydbio.2019.01.006
10. S. Surkova, E. Golubkova, Manu, et al., *Devel. Biol.* **376**, 99 (2013). DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.01.008
11. K. Kozlov, V. Kosheverova, R. Kamentseva, et al., *J. Bioinform. Comput. Biol.* **15**, 1750008 (2017). DOI: 10.1142/S0219720017500081
12. P. M. Snow, A. J. Bieber, and C. S. Goodman, *Cell* **59**, 313 (1989). DOI: 10.1016/0092-8674(89)90293-6
13. A. Gavish, A. Shwartz, A. Weizman, et al., *Nat. Commun.* **7**, 10461 (2016). DOI: 10.1038/ncomms10461
14. S. Surkova, J. Görne, S. Nuzhdin, et al., *Devel. Biol.* **476**, 41 (2021). DOI: 10.1016/j.ydbio.2021.03.005.
15. L. Vincent, *IEEE Trans. Image Process.* **2**, 176 (1993). DOI: 10.1109/83.217222
16. S. Ali, S. A. Signor, K. Kozlov, et al., *Evolution & Development* **21**, 157 (2019). DOI: 10.1111/ede.12283
17. S. Alt, P. Ganguly, and G. Salbreux, in *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B, Biological Sciences* **372**, 20150520 (2017). DOI: 10.1098/rstb.2015.0520
18. L. Sui, S. Alt, M. Weigert, et al., *Nature Commun.* **9**, 4620 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-06497-3

Drosophila Eye Imaginal Disc as a Model for Processing Epithelial Tissue Images

K.N. Kozlov*, E.V. Golubkova, L.A. Mamon**, M.G. Samsonova*, and S.Yu. Surkova***

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytekhnicheskaya ul. 29, St. Petersburg, 195251 Russia

**St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

Extraction of quantitative information on gene expression from confocal images requires the precise detection of boundaries of the individual cells. In addition, the cell shape analysis is essential for understanding morphogenetic processes such as tissue stretching, contraction and folding. *Drosophila* eye imaginal disc is a widely used model system illustrating such processes. In this work, we developed a number of methods for quantitative analysis of the eye disc cellular structure based on the fluorescent tissue labeling with different markers. All image processing procedures are implemented in the ProStack package developed by the authors. The methods described here can be adapted for cell shape quantification and gene expression analysis in other epithelial tissues.

Keywords: image processing, epithelial cells, eye imaginal disc, Drosophila