

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Санкт-Петербургский государственный политехнический университет»

На правах рукописи

Суркова Светлана Юрьевна

**АНАЛИЗ ДИНАМИКИ И ВАРИАБЕЛЬНОСТИ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕГМЕНТАЦИИ У ЭМБРИОНОВ
ДРОЗОФИЛЫ ДИКОГО ТИПА И МУТАНТНЫХ
ПО ГЕНАМ GAP**

Генетика 03.02.07

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Мария Георгиевна Самсонова

Санкт-Петербург
2014

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Особенности дрософилы как модельного организма по изучению генетического контроля детерминации сегментов	13
1.2 Раннее эмбриональное развитие дрософилы	14
1.3 Каскад экспрессии генов сегментации	16
1.4 Необходимость получения количественных данных по экспрессии генов	22
1.5 Изменение характера экспрессии генов сегментации у мутантов по генам <i>Kr</i> и <i>kni</i>	23
1.6 Теория позиционной информации и концепция морфогенетического поля	25
1.7 Сегментация у дрософилы как предмет исследования устойчивости раннего развития	29
1.8 Заключение по обзору литературы	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1 Получение изображений картин экспрессии генов	34
2.1.1 Мутантные линии дрософилы	34
2.1.2 Сбор эмбрионов дрософилы и иммунофлуоресцентное маркирование	34
2.1.3 Количественная конфокальная микроскопия	35
2.2 Получение и обработка количественных данных	36
2.2.1 Сегментация изображений	36
2.2.2 Классификация эмбрионов по времени развития	38
2.2.3 Удаление фонового сигнала	41
2.2.4 Регистрация картин экспрессии генов	42
2.2.5 Построение интегрированного набора данных	44
2.3 Выделение характерных черт картин экспрессии и статистический анализ данных	45
2.4 Заключение к главе 2	47
ГЛАВА 3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ ПО ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕГМЕНТАЦИИ У ЭМБРИОНОВ ДИКОГО ТИПА И МУТАНТНЫХ ПО ГЕНАМ GAP	48
3.1 Характеристика набора данных	48
3.2 Материнские координатные гены	49
3.2.1 <i>bicoid</i>	49
3.2.2 <i>caudal</i>	49

3.3	Гены <i>gap</i>	52
3.3.1	<i>knirps</i>	52
3.3.2	<i>giant</i>	54
3.3.3	<i>Krüppel</i>	58
3.3.4	<i>hunchback</i>	60
3.3.5	<i>tailless</i>	62
3.4	Гены <i>pair-rule</i>	63
3.4.1	<i>even skipped</i>	64
3.4.2	<i>fushi tarazu</i>	69
3.4.3	<i>hairy</i>	72
3.4.4	<i>runt</i>	74
3.4.5	<i>odd skipped</i>	75
3.4.6	<i>paired</i>	76
3.4.7	<i>sloppy-paired</i>	77
3.5	Заключение по главе 3	78
3.5.1	Количественная экспрессия генов сегментации	78
3.5.2	Особенности экспрессии <i>eve</i> у нуль-мутантов и гетерозигот в сравнении с таковой у эмбрионов дикого типа	80
3.5.3	Динамическое уменьшение уровней экспрессии генов у эмбрионов дикого типа и мутантов	83

ГЛАВА 4. ДИНАМИЧЕСКИЕ СДВИГИ ПОЗИЦИЙ ОБЛАСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ ЗИГОТИЧЕСКИХ ГЕНОВ У МУТАНТНЫХ ЭМБРИОНОВ В СРАВНЕНИИ С ЭМБРИОНАМИ ДИКОГО ТИПА **85**

4.1	Пространственные сдвиги областей экспрессии генов <i>gap</i>	86
4.2	Пространственные сдвиги полос экспрессии генов <i>pair-rule</i>	90
4.3	Заключение по главе 4	92

ГЛАВА 5. ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕГМЕНТАЦИИ **96**

5.1	Вариабельность уровней экспрессии генов у эмбрионов дикого типа	96
5.2	Вариабельность времени формирования областей экспрессии у эмбрионов дикого типа	96
5.3	Вариабельность последовательности и типа формирования областей экспрессии у эмбрионов дикого типа	98
5.4	Вариабельность формы картин экспрессии гена <i>eve</i> у эмбрионов, мутантных по <i>Kr</i>	99
5.5	Пространственная вариабельность областей экспрессии генов у эмбрионов дикого типа	100
5.6	Пространственная вариабельность экспрессии генов у мутантов по генам <i>gap</i>	106

5.7	Заключение по главе 5	110
5.7.1	Динамическое уменьшение вариабельности экспрессии генов у эмбрионов дикого типа в процессе развития . .	110
5.7.2	Повышенная вариабельность экспрессии генов сегментации у мутантов по генам <i>gar</i>	111
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
	ВЫВОДЫ	122
	Список цитированной литературы	124
	Список публикаций по теме диссертации	139

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Фундаментальным понятием биологии является морфогенетическое поле - область, представляющая собой совокупность клеток, способных отвечать на локализованные биохимические сигналы, что в результате приводит к формированию специфических морфологических структур или органов (Gilbert et al., 1996). Ключевым вопросом развития является выявление всех детерминант, определяющих судьбы клеток в морфогенетических полях. В ранних классических работах (Driesch, 1914) ставилась под сомнение возможность понимания природы субстанций, ответственных за детерминацию.

Развитие высокоточных методов биологического анализа в последнее время привело к небывалому скачку в изучении геномов, транскриптомов и протеомов, что в свою очередь предполагает необходимость изучения 'морфомов', включающих полный набор детерминант морфогенетического поля. Информация о морфоме должна иметь пространственное разрешение в одну клетку, включать в себя уровни экспрессии всех генов, кодирующих детерминанты судеб клеток, и иметь разрешение по времени, не превышающее период, за который могут произойти существенные изменения уровней концентраций этих детерминант.

Детерминация сегментов у эмбриона дрозофилы происходит на стадии бластодермы посредством действия регуляторного каскада материнских и зиготических генов сегментации (Akam, 1987, Ingham, 1988), экспрессия которых на каждом уровне имеет все более четкую пространственную локализацию. Материнские гены образуют градиенты экспрессии вдоль главной антериорно-постериорной (А-П) оси эмбриона, зиготические гены *gap* экспрессируются в виде одной-трех широких областей, и, наконец, экспрессия генов *pair-rule* в виде семи полос инициирует формирование полос генов *segment-polarity* шириной всего лишь в одну клетку. Эти полосы детерминируют положение эмбриональных парасегментов, первых метамерных структур тела насекомого.

Таким образом, гены сегментации являются типичным примером детерминант морфогенетического поля (Gilbert et al., 1996). В отличие от ранних работ, основанных на визуальной оценке картин экспрессии (см. обзор литературы), современные методы конфокальной микроскопии и обработки изображений позволяют получить высокоточные количественные данные о концентрациях всех детерминант поля сегментации с хорошим пространственным и временным разрешением. Это расширяет возможности применения, по сути, хорошо описанной системы к исследованию таких важных биологических вопросов, как устойчивость развития и природа позиционной информации в морфогенетическом поле. Изучение этих проблем и явилось основной целью данной работы.

Одной из важнейших проблем генетики развития является исследование устойчивости развития организмов относительно воздействий окружающей среды и возможных мутаций. В 40-х годах XX века Конрад Уоддингтон ввел понятие канализации развития для объяснения того факта, что в отличие от мутантов, организмы дикого типа имеют способность подавлять фенотипическую вариабельность, вызванную генетическими или внешними факторами (Waddington, 1942). Он предположил, что если судьба каждой клетки определяется дискретным числом решений, то число возможных траекторий развития тоже должно быть конечным, и каждая из таких траекторий должна быть устойчивой относительно небольших возмущений.

Проявление феномена канализации на молекулярном уровне было выявлено в системе генов сегментации и проявлялось в снижении высокого уровня пространственной вариабельности градиента экспрессии материнского гена *bcd* на уровне регулируемого им зиготического гена *hb* у эмбрионов дикого типа (Houchmandzadeh et al., 2002, Spirov and Holloway, 2003, Gregor et al., 2007b). Эти работы показали, что в данной системе регуляторные и корректирующие свойства морфогенетического поля можно изучать, не подвергая организм хирургическому вмешательству, как это делалось в классических опытах по изучению регенерации, но и путем сравнения уровней вариабельности экспрессии генов в группах индивидуальных эмбрионов.

Актуальной задачей данной работы было исследовать, применима ли концепция канализации развития К. Уоддингтона ко всей системе генов сегментации, в особенности, к экспрессии генов *pair-rule*, ответственных за определение позиций будущих парасегментов. Для этого требовалось всестороннее изучение всех видов variability экспрессии генов у эмбрионов дикого типа, а именно, variability уровней экспрессии, времени, скорости и типа формирования областей экспрессии генов, а также пространственной variability областей экспрессии.

Особенный интерес представила задача анализа variability экспрессии генов сегментации у *null*-мутантов по генам *gap*. Гены *gap* играют важную роль в процессе детерминации сегментов, так как являются первыми генами данного регуляторного каскада, экспрессирующимися в виде пространственно-локализованных областей. Известно, что кутикулярные фенотипы личинок, гомозиготных по мутации в гене *Kr*, имеют существенные дефекты, выражающиеся в отсутствии всех грудных сегментов и части брюшных сегментов. При этом морфология мутантных личинок, в отличие от личинок дикого типа, отличается сильной variability (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980, Wieschaus et al., 1984). Целью исследования было понять, насколько эта variability проявляет себя на уровне экспрессии генов в раннем эмбриональном развитии.

Еще одним важным вопросом явилось изучение характера интерпретации позиционной информации. В соответствии с теорией позиционной информации, пространственные координаты клеток в морфогенетическом поле устанавливаются путем пассивного считывания пороговых концентраций градиента белка – морфогена (Wolpert, 1969). Градиент материнского гена *bcd* – первый морфогенетический градиент, который удалось увидеть в эксперименте. Показано, что пороговые уровни его концентрации определяют позиции областей экспрессии зиготических генов-мишеней вдоль А–П оси эмбриона (Driever and Nusslein-Volhard, 1988a,b).

Однако было выявлено, что у эмбрионов дрозофилы дикого типа большинство областей экспрессии зиготических генов динамически сдвигаются

в ходе развития эмбриона (Jaeger et al., 2004a, Surkova et al., 2008a, Самсонова, 2008). Таким образом, можно говорить не о пассивном считывании позиционной информации, заложенной в морфогенетических градиентах, а о ее динамической интерпретации зиготическими генами–мишенями. Следовало ожидать, что мутации окажут влияние на характер интерпретации позиционной информации. Как уже упоминалось, нуль–мутации в генах *gap* в значительной мере нарушают процесс сегментации и важным было исследовать влияние таких мутаций на пространственную динамику экспрессии зиготических генов.

Помимо вышеперечисленного, актуальным явилось описание интегрированных количественных данных по экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа и мутантных с особым акцентом на динамику уровней экспрессии генов. Это в значительной мере корректирует существовавшие ранее представления о характере экспрессии генов, по большей части основанные на визуальном анализе изображений. Количественные данные по экспрессии генов сегментации представляют большой интерес для научного сообщества, активно использующего эту систему для построения математических моделей регуляторных взаимодействий генов.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы является анализ характера экспрессии генов сегментации у эмбрионов дрозофилы, мутантных по генам *gap*, в сравнении с эмбрионами дикого типа и использование полученных результатов для исследования таких важных биологических вопросов, как устойчивость развития и влияние мутаций на характер интерпретации позиционной информации в раннем эмбрионе.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Получить количественные данные по экспрессии генов сегментации у эмбрионов, мутантных по генам *gap*;
2. Детально описать экспрессию генов сегментации у эмбрионов дикого

- типа и мутантных по генам *gar* на основе количественных данных;
3. Исследовать пространственную динамику экспрессии генов у мутантных эмбрионов в сравнении с эмбрионами дикого типа;
 4. Проанализировать все типы вариабельности, существующие в системе генов сегментации у эмбрионов дикого типа и эмбрионов, мутантных по генам *gar*.

Научная новизна работы

Впервые:

– Получены количественные данные по экспрессии генов сегментации у эмбрионов, мутантных по генам *gar*. Известные ранее данные были разрозненными, и их описание проводилось путем визуальной оценки флуоресцентных изображений, что привносило ошибки в интерпретацию регуляторных взаимодействий генов.

– Показано, что все типы вариабельности экспрессии в системе генов сегментации у эмбрионов дикого типа динамически уменьшаются, или канализируются, в процессе развития.

– Оценена пространственная вариабельность и вариабельность формы картин экспрессии генов у эмбрионов, мутантных по генам *Kr*, *kni* и *Kr;kni*. Выявлено, что, в отличие от эмбрионов дикого типа, у эмбрионов с одиночной нуль-мутацией вариабельность экспрессии генов в процессе развития не снижается в некоторых частях эмбриона, а у эмбрионов с двойной нуль-мутацией – во всем эмбрионе;

– Изучено влияние нуль-мутаций в генах *gar* на интерпретацию позиционной информации в раннем эмбрионе дрозофилы. Показано, что несмотря на серьезные нарушения процесса сегментации у таких мутантов, характер позиционной динамики экспрессии зиготических генов в раннем развитии остается сходным с таковым у эмбрионов дикого типа.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость результатов, полученных в диссертационной работе, состоит в

том, что впервые на молекулярном уровне была подтверждена концепция канализации развития К. Уоддингтона и показано снижение вариабельности экспрессии генов к моменту детерминации сегментов у эмбрионов дрозофилы дикого типа, но не у мутантных. Также впервые выявлено, что нуль-мутации в генах *gar*, в значительной мере нарушающие процесс сегментации, не оказывают влияния на характер интерпретации позиционной информации в раннем эмбрионе дрозофилы. Важно, что подобные выводы сделаны для относительно простой системы, где отсутствуют межклеточные взаимодействия и рост тканей. Знание этих закономерностей может помочь при анализе более сложных и многокомпонентных развивающихся систем.

Результаты анализа, проведенного в работе, были успешно использованы для математического моделирования, что позволило объяснить регуляторные механизмы, определяющие снижение позиционной вариабельности градиента экспрессии материнского гена *bcd* на уровне экспрессии зиготических генов *gar* у эмбрионов дикого типа (Manu et al., 2009a), а также пространственные сдвиги постериорных областей экспрессии генов *gar* и снижение уровней их экспрессии у нуль-мутантов по гену *Kr* (Kozlov et al., 2012).

Экспериментальные данные, а именно, изображения картин экспрессии генов у эмбрионов, мутантных по гену *Kr*, включены в состав базы данных FlyEx (<http://urchin.spbcas.ru/flyex/mutant/apt.jsp?htmt=mutant2.htmt>) (Pisarev et al., 2009) и используются научным сообществом.

Результаты диссертационной работы включены в образовательный процесс Санкт-Петербургского государственного университета на кафедре генетики и биотехнологии биолого-почвенного факультета в форме дополнения к курсу лекций «Генетика развития животных», а также в курс лекций кафедры прикладной математики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета «Нелинейная теория волн и паттернов».

Положения, выносимые на защиту:

1. Нуль-мутации в генах *gar*, приводящие к существенным изменениям

экспрессии зиготических генов сегментации в эмбрионе дрозофилы, не меняют направление и локализацию пространственных сдвигов областей экспрессии этих генов, что предполагает наличие сходных регуляторных механизмов интерпретации позиционной информации у эмбрионов дикого типа и мутантных;

2. Особенности экспрессии генов сегментации у эмбрионов дрозофилы дикого типа и нуль-мутантов по генам *gar* подтверждают на молекулярном уровне концепцию канализации развития К. Уоддингтона, в основе которой лежит идея о подавлении варибельности у организмов дикого типа, но не у мутантных.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на межлабораторных и межинститутских семинарах и следующих международных научных конференциях: Конференциях по биоинформатике, структуре и регуляции генома (BGRS'2004, BGRS'2008), г. Новосибирск, 2004 и 2008 г.; International Workshop on NanoBiotechnologies, Saint-Petersburg, November 27–29, 2006; The 3rd EMBL Biennial Symposium: From Functional Genomics to Systems Biology, October 14 - 17, 2006, Heidelberg, Germany; 2nd Meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology, July 27–August 1 2008, Ghent, Belgium; Конференции «Молекулярная и структурная биология» в рамках Политехнического симпозиума 01-07 декабря 2008 г.; 16th International Society of Developmental Biologists Congress, Edinburgh, 6–10 September 2009; Международном симпозиуме «SysPatho–Системная биология и медицина», 11–14 сентября 2012 г., Санкт-Петербург (Царское Село), Всероссийской конференции с международным участием «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция» 22–24 октября 2013 г., Санкт-Петербург, и других.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ в рецензируемых научных изданиях и 8 тезисов докладов в сборниках трудов конференций.

Структура работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов работы, заключения, выводов, списка литературы (148 наименований), а также списка использованных в работе сокращений. Материал изложен на 141 странице, содержит 28 рисунков и 11 таблиц.

Личный вклад автора. Анализ данных осуществлялся лично автором. Автором были получены экспериментальные данные по экспрессии 8-ми генов сегментации для 237 нуль-мутантов и 89 гетерозигот по гену *Kr*, осуществлены все этапы обработки изображений и извлечения характерных черт паттернов экспрессии генов. Конфокальные изображения картин экспрессии генов у эмбрионов *kni*⁻ и *Kr;kni*⁻ были предоставлены Ману, Л. Панок и Дж. Райницем, количественная обработка этих данных выполнена автором (Surkova et al., 2013). Изображения и количественные данные по экспрессии генов у эмбрионов дикого типа взяты из базы данных FlyEx (<http://urchin.spbcas.ru/flyex/>) (Pisarev et al., 2009), а характерные черты картин экспрессии были предоставлены М.Г. Самсоновой (Самсонова, 2008).

Благодарности. Выражаю благодарность моему руководителю М.Г. Самсоновой за помощь на всех этапах работы; Е.В. Голубковой за помощь в проведении экспериментов; Ману, Л. Панок и Дж. Райницу за предоставление изображений картин экспрессии генов у эмбрионов *kni*⁻, *Kr;kni*⁻; К.Н. Козлову и Е.М. Мясниковой за помощь при обработке данных; Л.А. Мамон, Д.П. Фурман и В.А. Скобеевой за важные замечания и предложения при обсуждении данной работы; лаборатории генетики животных СПбГУ, ЦКП ХРОМАС СПбГУ и Центру генетики развития (Университет Стони Брук) за предоставление оборудования для экспериментальной работы.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

А–П - антериорно-постериорный;

Д–В - дорсально-вентральный;

ДЭ - длина эмбриона;

ИФ - интенсивность флуоресценции;

CF - головная борозда (cephalic furrow);

ДИК - дифференциально-интерференционный контраст;

SD - стандартное отклонение (standard deviation);

Названия генов:

bicoid (bcd); caudal (cad); nanos (nos); oscar (osc); torso (tor); hunchback (hb); Kruppel (Kr); giant (gt); knirps (kni); tailless (tll); huckebein (hkb); even skipped (eve); runt (run); hairy (h); fushi tarazu (ftz); odd skipped (odd); sloppy-paired (slp); paired (prd); engrailed (en); wingless (wg)

1 ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Особенности дрософилы как модельного организма по изучению генетического контроля детерминации сегментов

Сегментация тела является свойством развития многих двусторонне – симметричных организмов, таких, как членистоногие, кольчатые черви и хордовые (Tautz, 2004). Наилучшим образом процесс сегментации тела изучен у позвоночных и насекомых. У большей части этих организмов в начале происходит образование anteriорных сегментов, а формирование более постериорных сегментов осуществляется последовательно после начала гастрюляции. Этот процесс у позвоночных носит название “часы сегментации” и контролируется сигнальным каскадом Delta-Notch. У насекомых область эмбриона, дающая начало сегментированным участкам тела, называется презумптивной зародышевой полоской. Большинство насекомых имеют тип развития с короткой зародышевой полоской, при этом сегменты формируются последовательно в постериорной области посредством роста и последующего деления зародышевой полоски после гастрюляции (Tautz and Sommer 1995, Davis and Patel, 2002).

Дрософила принадлежит к насекомым, которые в процессе эволюции выработали тип развития с длинной зародышевой полоской. У таких насекомых, в отличие от позвоночных и насекомых с короткой зародышевой полоской, детерминация сегментов осуществляется одновременно вдоль всей А–П оси эмбриона посредством действия регуляторного каскада генов сегментации на стадии бластодермы.

Эта регуляторная система имеет ряд важных особенностей. Во-первых, она функционирует еще до того, как происходит формирование клеточных мембран и регуляторные взаимодействия могут происходить путем диффузии транскрипционных факторов без подключения межклеточных сигнальных путей. Во-вторых, на стадии бластодермы система генов сегментации, в целом, является независимой от структурных генов, так как процесс де-

терминации сегментов не сопровождается ростом тканей и у мутантов по генам сегментации морфологические дефекты наблюдаются уже после начала гаструляции.

Вышеизложенные причины, а также хорошая изученность основных механизмов функционирования каскада генов сегментации делают дрософилу и в настоящее время незаменимым модельным объектом исследования особенностей генетической детерминации процесса формирования морфологических структур. В последующих двух разделах будут более подробно изложены основные характеристики раннего развития дрософилы, а также существующие на сегодняшний момент знания о регуляторной сети генов сегментации.

1.2 Раннее эмбриональное развитие дрософилы

Эмбриональное развитие дрософилы от момента откладки яйца до вылупления личинки первого возраста длится примерно 24 часа.

После момента оплодотворения в эмбрионе дрософилы происходит девять быстрых синхронных делений ядер. Во время этих циклов деления ядра расположены в центральной области эмбриона. После 7-го цикла деления ядра начинают мигрировать к поверхности эмбриона в кортикальную цитоплазму. Большинство ядер достигают периферии к началу интерфазы цикла 10. Некоторые ядра остаются в центре эмбриона в области, богатой желтком, перестают делиться и становятся полиплоидными. В цикле деления 9 ядра, мигрирующие к заднему полюсу эмбриона, обособляются клеточными мембранами и образуют полярные клетки, которые дают начало половым клеткам (Гилберт, 1994, Gilbert, 2003, Campos-Ortega and Hartenstein, 1985).

Все оставшиеся ядра на поверхности эмбриона находятся в общей кортикальной цитоплазме и какие-либо плазматические мембраны, кроме мембраны самого эмбриона, отсутствуют. Эта стадия развития называется синцитиальной бластодермой. После того, как ядра достигают периферии, вре-

мя, необходимое для осуществления каждого из четырех последующих делений, постепенно увеличивается с 10 до 15-20 минут. Хотя ядра первоначально делятся в общей цитоплазме, это не означает, что цитоплазма сама по себе однородна. Каждое ядро синцитиальной бластодермы заключено в собственную небольшую территорию цитоскелетных белков, эти островки цитоплазмы называются энергидами.

После момента образования полярных клеток плазматическая мембрана яйца начинает образовывать впячивания, которые углубляются между ядрами. С начала цикла 14А начинается постепенное формирование клеточных мембран, заканчивающееся обособлением каждого ядра в отдельной клетке перед гастрულიей. Цикл 14А характеризуется долгой интерфазой продолжительностью 50 минут. В результате образования клеточных мембран возникает клеточная бластодерма, клетки которой одним слоем покрывают богатую желтком сердцевину эмбриона (Foe and Alberts, 1983). У дрозофилы этот слой состоит приблизительно из 5000 клеток и формируется в первые 3 часа после оплодотворения. На стадии бластодермы эмбрионы дрозофилы имеют форму близкую к эллипсоиду и размер примерно 500 мкм вдоль оси А-П и примерно 230 мкм вдоль оси Д-В.

Данная работа охватывает период развития с цикла деления ядер 9 до начала гастрულიи, т.е. до окончания цикла деления 14А. Тем не менее, далее приводится краткое описание морфологических явлений, происходящих после гастрულიи, и характерных для развития насекомых с длинной зародышевой полоской. Подобная характеристика более позднего развития эмбриона дрозофилы позволяет оценить время появления морфологически различимых границ парасегментов и сегментов, детерминация которых происходит на стадии бластодермы.

После формирования клеточных мембран происходит замедление ядерных делений и ускорение синтеза РНК, деления происходят асинхронно. Начинается гастрულიя, сопровождающаяся существенными перестройками эмбриональных тканей. Презумптивные мезодерма и энтодерма инвагируют для образования трех зародышевых листков.

После этого происходит перемещение примерно 1 тысячи оставшихся на поверхности эмбриона клеток к вентральной срединной линии. Это скопление клеток носит название зародышевой полоски. Эта полоска перемещается к заднему полюсу, огибает его, и продолжает двигаться по дорсальной стороне к переднему полюсу эмбриона, в результате чего презумптивные структуры задних отделов личинки на дорсальной стороне оказываются рядом с презумптивными головными структурами. Этот процесс носит название стадии удлинения зародышевой полоски и продолжается до 5.5 часов с момента начала развития. На этой стадии у эмбриона дрозофилы присутствуют парасегментные борозды, делящие зародышевую полосу на метамерные единицы. Эти борозды появляются в середине каждого будущего сегмента (Гилберт, 1994, Gilbert, 2003). В дальнейшем развитии дрозофилы, перед началом сокращения зародышевой полоски, парасегментная организация полностью заменяется на сегментную и исключение составляет только структура вентральной нервной цепочки.

После 7 часов развития зародышевая полоска сокращается и это приводит к восстановлению ее исходной топологии. К 16-ти часам развития происходит спинное замыкание и инволюция головы, после этого поверхность эмбриона достигает конечной личиночной морфологии (Gilbert 1991, Gilbert, 2003).

1.3 Каскад экспрессии генов сегментации

Детерминация сегментов у дрозофилы происходит посредством действия иерархического каскада взаимодействий транскрипционных факторов, кодируемых генами сегментации. Задачей этого каскада является обеспечить быстрое подразделение тела дрозофилы на метамерные участки, из которых в дальнейшем разовьются сегменты. Экспрессия генов сегментации приводит к делению А–П оси эмбриона на все более пространственно четкие области в течение первых 3-х часов развития эмбриона (Рис. 1А–С), (Гилберт, 1994, Жимулев, 2003, Gilbert, 2003).

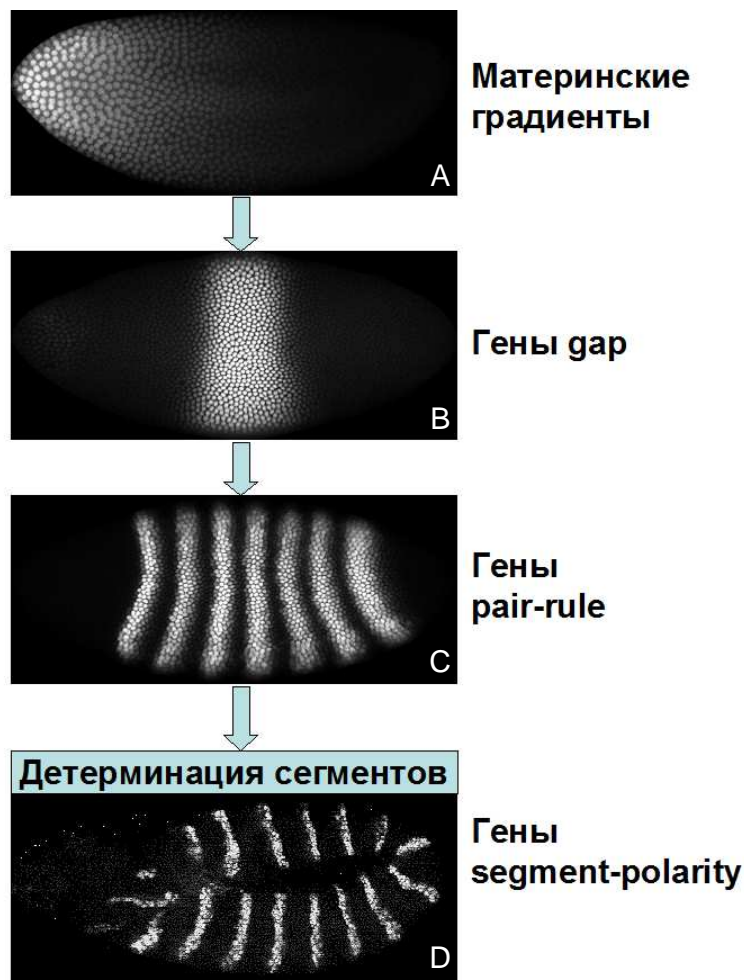


Рис. 1: Экспрессия генов сегментации, принадлежащих к разным уровням регуляторного каскада, в виде все более пространственно четких областей. Показана экспрессия материнского гена *bcd* (A), и следующих зиготических генов: гена гар *Kr* (B), гена pair-rule *eve* (C) и гена segment-polarity *en* (D). Изображения картины экспрессии гена *en* предоставлено лабораторией Дж. Райница, остальные изображения взяты из базы данных FlyEx (<http://urchin.spbcas.ru/flyex/>) (Pisarev et al., 2009): ad18 (*bcd*), pf11 (*Kr*) и em26 (*eve*)

Гены сегментации были идентифицированы в экспериментах, насыщающих весь геном дрозофилы мутациями. На основе фенотипов нуль-мутантов эти гены были разделены на несколько классов – материнские координатные гены, а также три класса зиготических генов: гены гар, pair-rule и segment-polarity (Рис. 1) (Гилберт, 1994, Жимулев, 2003, Gilbert, 2003, Akam, 1987, Ingham, 1988).

Материнские координатные гены экспрессируются материнским гено-

мом и влияют на развитие переднего, заднего или терминальных районов эмбриона. Нуль-мутации в этих генах приводят к нарушениям (выпадениям или удвоениям) головных, хвостовых, дорсальных или вентральных структур.

Мутации в генах *gap* приводят к выпадению непрерывного блока сегментов, что показано на Рисунке 2 на примере личинки, несущей нуль-мутацию в гене *Kr*. Мутации в генах *pair-rule* затрагивают каждый четный или нечетный сегмент, а мутации в генах *segment polarity* влияют на полярность каждого индивидуального сегмента (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980).

Как упоминалось ранее, первые морфологические дефекты у мутантов по генам сегментации обнаруживаются уже после начала гастрюляции. Это говорит о том, что на стадии бластодермы процесс детерминации сегментов осуществляется на регуляторном уровне. Большинство как материнских, так и зиготических генов кодируют транскрипционные факторы, которые регулируют другие гены путем присоединения к определенным последовательностям в регуляторных районах этих генов. Это формирует сеть взаимодействий, состоящую из нескольких уровней, и гены более высокого уровня, к примеру, материнские координатные гены, регулируют гены более низкого уровня, например, гены *gap* – но не наоборот. Помимо этого, выявлены существенные регуляторные взаимодействия между генами, принадлежащими к одному уровню иерархии.

Гены *segment-polarity*, не рассматриваемые в данной работе, в основном кодируют сигнальные белки, так как эти гены действуют уже после формирования клеток, на стадии гастрюляции. В этот период во взаимодействиях генов задействованы межклеточные сигнальные пути. Однако белковый продукт гена *en*, экспрессия которого маркирует anteriорные границы парасегментов, является транскрипционным фактором (Рис. 1D).

Активность генов с материнским эффектом являет собой первый этап становления пространственной организации у дрозофилы. Антериорно – постериорная полярность ооцита формируется во время оогенеза в результате взаимодействий между ооцитом и окружающим его эпителием соматиче-

ских фолликулярных клеток. Это приводит к зависящей от микротрубочек локализации транскриптов ряда координатных генов в ооците. В частности, мРНК *bcd* локализуется на anteriорном конце ооцита, а мРНК *osk* – на posteriорном, приводя к активации гена *nos*. Это формирует так называемые передний и задний организующие центры (Гилберт, 1994, Gilbert, 2003). Продукты этих двух генов отвечают за формирование вдоль оси А–П трех материнских градиентов, а именно, градиента белка *Vcd* и материнских градиентов белков *Cad* и *Nb*.

Следует отметить, что у всех изученных видов двукрылых мРНК *bcd* локализуется на anteriорном конце эмбриона, причем у более примитивной круглошовной мухи *Megaselia abdita* потеря функции *bcd* приводит не только к отсутствию головных и торакальных структур, как это наблюдается у дрозофилы, но помимо этого еще к делеции от трех до четырех абдоминальных сегментов (с последующей дупликацией оставшихся структур) (Stauber et al., 2000). Столь существенная роль *bcd* опровергает существовавшую долгое время гипотезу что у более примитивных насекомых морфогенетические функции *bcd* выполнялись в основном градиентом *hb* и в полной мере проявились лишь у дрозофилы (McGregor, 2005).

Экспрессия *bcd* в эмбрионе дрозофилы является полностью материнской (Berleth et al., 1988). Начиная с цикла дробления 9 белок *Vcd* образует А–П градиент концентрации, который в последующих циклах приобретает экспоненциальную форму (Driever and Nusslein-Volhard, 1988a, Houchmandzadeh et al., 2002).

Транскрипты *cad* и *hb* имеют как материнское, так и зиготическое происхождение. Сразу после оплодотворения материнские мРНК *cad* и *hb* равномерно распределены по всему эмбриону. Затем, в результате репрессии трансляции мРНК *cad* белком *Vcd* и мРНК *hb* белком *Nos*, сопровождающейся деградацией РНК, не входящей в состав полисом, мРНК и белок *cad* формируют градиент с максимумом в posteriорной части эмбриона, а мРНК и белок *hb* – в anteriорной части эмбриона. Образование таких градиентов облегчается тем, что эмбрион является синцитием. Эти градиенты,

действуя совместно, задают позиционную информацию, необходимую для дальнейшей экспрессии зиготических генов.

Материнский градиент *cad* присутствует в эмбрионе дрозофилы приблизительно в циклах дробления 9–11, а *hb* - в циклах 12–14. После этого уровень материнских транскриптов убывает и экспрессия этих генов становится полностью зиготической (Mlodzik et al., 1985, Mlodzik and Gehring, 1987, Boring et al., 1993, Macdonald and Struhl, 1986, Tautz et al., 1987, Tautz, 1988). Зиготическая экспрессия *cad* (Mlodzik and Gehring, 1987, Macdonald and Struhl, 1986) и *hb* (Tautz et al., 1987) начинается в циклах 10 и 11.

Материнский вклад также вносит система материнских терминальных генов, которая представляет собой сигнальный путь, ключевым компонентом которого является тирозин-киназный рецептор *tor*. Эта система регулирует экспрессию генов сегментации на anteriорном и posteriорном полюсах эмбриона посредством зиготических терминальных генов *gar* *tll* и *hkb* (Weigel et al., 1990). Эти гены регулируют экспрессию других генов *gar*, но не регулируются ими.

Гены *gar* играют очень важную роль в раннем развитии эмбриона дрозофилы, так как являются первыми зиготическими генами, имеющими четкую пространственно локализованную экспрессию. Экспериментальные данные указывают на то, что белковые продукты этих генов в большинстве случаев являются репрессорами транскрипции близкого радиуса действия (Strunk et al., 2001, Payankulam and Arnosti, 2009, Li and Arnosti, 2011). Эти гены экспрессируются в виде одной–двух широких областей, находящихся в области презумптивной зародышевой полоски. Ширина этих областей в конце цикла 14А составляет примерно 10 ядер эмбриона. Помимо этого каждый из этих генов в цикле 14А образует несколько дополнительных областей экспрессии в головной или хвостовой части эмбриона. Транскрипты генов *gar* впервые появляются в циклах 10–11 (Preiss et al., 1985, Knipple et al., 1985, Jaeger et al., 2007), а белки – в циклах 12–13 (Eldon and Pirrotta, 1991, Pignoni et al., 1992).

Экспрессия генов *pair-rule* начинается в циклах 9–12 на уровне мРНК

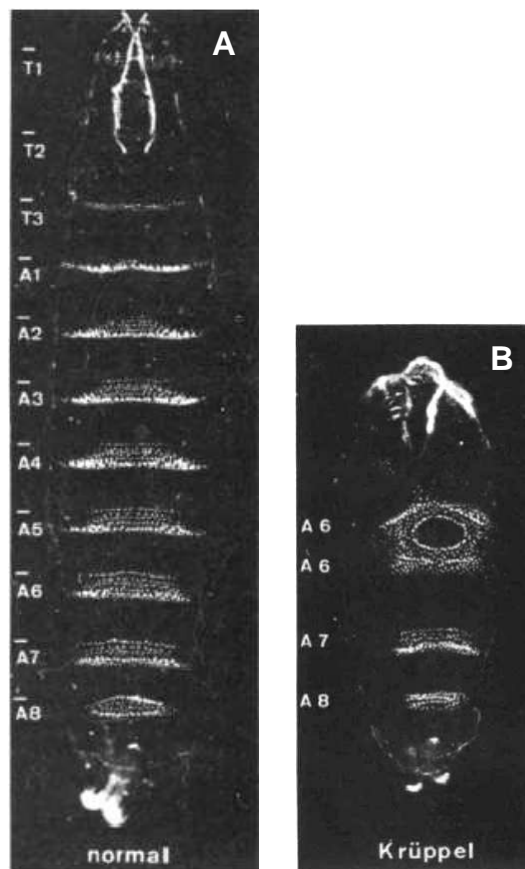


Рис. 2: Кутикулярные препараты личинки дрозофилы дикого типа (А) и личинки, гомозиготной по мутации в гене *gap Kr* (В) (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). У личинки *Kr*– отсутствуют все грудные и часть брюшных сегментов. Головные структуры развиваются нормально, рядом с ними присутствует небольшая полоса, соответствующая первому грудному сегменту (Т1). За ним следует участок измененных переменных структур, обычно обозначаемых как удвоенный шестой абдоминальный сегмент (А6). Эти структуры могут быть разделены или слиты, иметь реверсированную полярность, либо не иметь. Более постериорные абдоминальные сегменты А7 и А8, а также тельсон мало изменены по сравнению с личинкой дикого типа (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980, Ingham et al., 1988)

(Macdonald et al., 1986, Frasch et al., 1987, Hafen et al., 1984, Yu and Pick, 1995, Kilchherr et al., 1986, Gergen and Butler, 1988, Coulter et al., 1990) и в циклах 12–14 на уровне белка (Frasch et al., 1987, Gutjahr et al., 1993, Krause et al., 1988). Ранняя экспрессия этих генов не имеет четко обозначенных областей экспрессии. Формирование полос начинается только в цикле 14А, и к началу гаструляции эти гены как на уровне мРНК, так и на уровне белка, формируют 7 четко выраженных полос экспрессии в области презумптивной

зародышевой полоски (Macdonald et al., 1986, Frasch et al., 1987, Hafen et al., 1984, Krause et al., 1988, Gergen and Butler, 1988, Kania et al., 1990, Coulter et al., 1990, Carroll et al., 1988, Lardelli and Ish-Horowicz, 1993, Yu and Pick, 1995, Kilchherr et al., 1986, Gutjahr et al., 1993, Grossniklaus et al., 1992). Гены (*h*), *odd*, *run*, *prd* и *slp* также экспрессируются в будущем головном отделе (Carroll et al., 1988, Lardelli and Ish-Horowicz, 1993, Drean et al., 1998, Gergen and Butler, 1988, Gutjahr et al., 1993, Grossniklaus et al., 1994).

Ширина сформировавшихся полос генов *pair-rule* в конце цикла 14А составляет примерно 3–4 ядра. На следующем этапе включается экспрессия генов *segment-polarity*, полосы экспрессии которых шириной всего лишь в одну клетку маркируют anteriорные и posteriорные границы парасегментов. Однако детерминация позиций этих полос происходит еще на стадии бластодермы. Показано, что относительные уровни экспрессии генов *eve* и *ftz* в цикле 14А еще до окончания процесса формирования клеток определяют относительную ширину четных и нечетных парасегментов (Fujioka et al., 1995, Hughes and Krause, 2001, Fujioka et al., 2002). Это происходит за счет регуляции гена *segment-polarity en* с вовлечением промежуточных регуляторов – генов *pair-rule odd*, *slp* and *prd* (Jaynes and Fujioka, 2004, Swantek and Gergen, 2004). Таким образом, динамика и пространственная точность формирования полос генов *pair-rule* являются характеристиками, определяющими весь дальнейший процесс сегментации.

1.4 Необходимость получения количественных данных по экспрессии генов

Экспрессия генов сегментации была описана в основном в 1980–90-х годах на качественном уровне, т.е. на основе визуального анализа изображений картин экспрессии генов. Анализ характера экспрессии генов у мутантов по генам сегментации и до сих пор является важным инструментом для изучения регуляторных взаимодействий. Однако когда в конце 1990-х годов процесс детерминации сегментов у дрозофилы впервые стал исследовать-

ся средствами системной биологии, выяснилось, что описательные данные дают весьма противоречивые представления об экспрессии генов. В основном это касалось интерпретации регуляторных взаимодействий на основе существующих данных о мутантных фенотипах (см. следующий раздел).

Оставались нерешенными два важных вопроса. Во-первых, очевидно, что фундаментальной единицей процесса детерминации сегментов является ядро (или клетка). Поэтому биологически важной информацией является не общая характеристика картины экспрессии гена, а информация о количестве генных продуктов, присутствующих в каждой клетке, а также о пространственном расположении клетки в эмбрионе. Во-вторых, недостаточно иметь информацию об экспрессии гена в какой-то один момент времени — необходимо иметь данные для всего периода развития. Поэтому важнейшей причиной того, что система генов сегментации у дрозофилы стала вновь активно востребована в научных исследованиях последних лет (Spirov and Holloway, 2003, Gregor et al., 2005, Crauk and Dostatni, 2005, Gregor et al., 2007b, Hendriks et al., 2006, Surkova et al., 2008a, He et al., 2008, Kozlov et al., 2012, Surkova et al., 2013, Janssens et al., 2013), стало получение точных количественных данных по экспрессии генов.

1.5 Изменение характера экспрессии генов сегментации у мутантов по генам *Kr* и *kni*

Как было сказано выше, описанные ранее данные по экспрессии генов сегментации у эмбрионов, мутантных по генам *Kr* и *kni*, имели в основном качественный характер, то есть были основаны на визуальном анализе изображений, к тому же полученных без учета временной динамики развития. Это дает неточное понятие о пространственной динамике экспрессии генов, о позициях и ширине областей экспрессии, и не предоставляет никакой информации о вариабельности формирования областей экспрессии у мутантных эмбрионов. Это может приводить к неверным выводам о регуляторных взаимодействиях генов, которые обычно делаются на основе анализа

мутантных фенотипов. Ниже приведены имеющиеся литературные данные по экспрессии генов *gap* и гена *pair-rule eve* в анализируемых мутантных аллелях.

Для нуль-мутантов по *Kr* было показано, что как постериорная, так и anteriорная области экспрессии гена *gt* расширяются в направлении центра эмбриона, при этом постериорная область экспрессии занижена (Kraut and Levine, 1991a, Eldon and Pirrotta, 1991).

Уровень постериорной экспрессии *kni* у мутантов по *Kr* очень сильно снижен по сравнению с эмбрионами дикого типа – в большей степени, чем это наблюдается для других генов (Pankratz et al., 1989, Eldon and Pirrotta, 1991). Была высказана гипотеза, что в данном случае *Kr* может являться активатором *kni* (Pankratz et al., 1989). Однако в дальнейшем было опубликовано альтернативное предположение, что занижение экспрессии *kni* у эмбрионов *Kr*– обусловлено репрессирующим воздействием *gt* на *kni*, т.к. у двойных мутантов *Kr;gt* экспрессия *kni* восстанавливается до уровня, наблюдаемого у эмбрионов дикого типа (Carovilla et al., 1992).

Эффект нуль-мутации в гене *kni* выражается в существенном снижении уровня экспрессии *gt* в постериорной области, но не в изменении А–П позиций его областей экспрессии (Kraut and Levine, 1991a, Pankratz et al., 1989, Eldon and Pirrotta, 1991). Показано, что влияние мутации в гене *kni* на экспрессию *hb* гораздо менее существенное и выражается лишь в небольшом расширении постериорной области экспрессии, в то время как anteriорная область остается неизменной (Jackle et al., 1986, Clyde et al., 2003).

В ранних публикациях сообщалось о том, что нуль-мутация в гене *Kr* проявляется в постериорном смещении задней границы передней области экспрессии *hb* в сторону отсутствующей экспрессии *Kr* (Jackle et al., 1986, Warrior and Levine 1990). Однако первое же исследование, основанное на количественных данных показало, что эта область экспрессии не меняет своего положения относительно таковой у эмбрионов дикого типа (Houchmandzadeh et al., 2002). Влияние нуль-мутации в гене *Kr* на anteriорную область *hb* выражается в уменьшении экспрессии в районе полосы парасегмента 4 (PS4

stripe), появление которой является отличительной чертой экспрессии *hb* во второй половине цикла дробления 14А (WuX et al., 1998).

У двойных мутантов *Kr;kni* экспрессии *hb* в центральной области эмбриона не подавляется, как это свойственно для эмбрионов дикого типа. В результате, *hb* дополнительно экспрессируется в промежутке между антериорной и постериорной областями экспрессии. Подобного явления не наблюдается у одиночных нуль-мутантов по *Kr* и *kni*, и это показывает, что репрессия *hb* в центральной области осуществляется продуктами этих двух генов совместно (Clyde et al., 2003).

У нуль-мутантов по *kni* было показано постериорное смещение центральной области экспрессии *Kr* в сторону отсутствующей области экспрессии *kni* (Jackle et al., 1986, Gaul and Jackle, 1987). Как упомянуто выше, аналогичное смещение постериорных границ антериорных областей *gt* и *hb* было показано для нуль-мутантов по гену *Kr* на основе визуального анализа изображений.

Экспрессия pair-rule гена *eve* в виде 7-ми полос, свойственных эмбрионам дикого типа, у нуль-мутантов по *Kr* заменена 4-мя областями экспрессии. Полосы 1 и 7 не изменены по сравнению с таковыми у эмбрионов дикого типа, а полосы 2/3 и 4/5 слиты (Frasch and Levine, 1987, Warrior and Levine, 1990). При этом у гетерозигот *Kr+ / Kr-* полоса 2 расширена по сравнению с эмбрионами дикого типа и ее ширина зависит от дозы *Kr* (Warrior and Levine 1990).

У нуль-мутантов по *kni* на месте полос 3-7 образуется широкая область экспрессии, но в конце цикла 14А формируется задняя граница полосы 3 (Small et al., 1996). Формирования границ полос 4-6 не происходит (Frasch and Levine, 1987).

1.6 Теория позиционной информации и концепция морфогенетического поля

Важную роль в выработке современных представлений о механизмах эмбриональной детерминации сыграло открытие в 1891 г. немецким био-

логом Г. Дришем (Hans Driesch) явления эмбриональных регуляций, под которым понимают восстановление нормальной, геометрически правильной и полной структуры организма, несмотря на удаление, добавление или перемешивание части материала зародыша. Практически нет таких зародышей, которые на начальном периоде своего развития не представляли бы собой целостные системы, способные к эмбриональным регуляциям. В дальнейшем развитии эти системы подразделяются на ряд более мелких, но тоже целостных подсистем (Белоусов, 2005). Однако сам Дриш практически устранился от объяснения того, как устроены такие регуляторные системы (Driesch, 1914).

Для объяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе эмбриональной регуляции (т.е. законов Дриша), в 1969 году Льюис Волперт выдвинул концепцию позиционной информации. Эта концепция состоит в том, что на определенной стадии развития, еще до видимой дифференцировки зародыша, каждая его клетка по отдельности, независимо от соседей, получает информацию о своем положении в зародыше, а затем с помощью своего генетического аппарата интерпретирует эту позиционную информацию, дифференцируясь в том, или ином направлении.

Согласно Л. Волперту, позиционная информация является полностью независимой от ее последующей интерпретации. Это подразумевает, что молекулярные механизмы формирования паттерна по сути, могут быть универсальными (Wolpert, 1969, Wolpert, 1996). Однако это также предполагает, что процессы, происходящие в клетках-мишенях не должны изменять систему координат, установленную позиционной информацией.

Одним из возможных механизмов реализации понятия позиционной информации является концепция морфогенетических градиентов. Концепция морфогенетических градиентов была сформулирована в начале прошлого века для объяснения феномена дистанционного влияния определенных участков яйца или эмбриона на формирование паттерна в соседних тканях (Ephrussi and Johnston, 2004). Первоначально градиенты часто рассматривали как градиенты метаболической активности. Алан Тьюринг (Turing, 1952)

предложил термин “морфоген” для обозначения молекулы, участвующей в морфогенезе и образующей в пространстве паттерны за счет химической реакции и диффузии. Позднее понятие морфогена было уточнено Ф. Криком, который определил морфоген как вещество, участвующее в формировании паттерна путем образования градиентов концентрации в формирующейся ткани за счет диффузии от локализованного источника (Crick, 1970). Очевидно, что морфогены идеально подходят на роль носителя позиционной информации. По определению, они непосредственно влияют в зависимости от концентрации форме на экспрессию генов в клетках-мишенях и их концентрация монотонно убывает с увеличением расстояния от источника.

Градиент белкового продукта материнского гена *bcd*, определяющий антериорно – постериорную полярность раннего эмбриона дрозофилы, был первым морфогенетическим градиентом, который удалось увидеть непосредственно в эксперименте (Driever and Nusslein-Volhard, 1988a,b). В большинстве других систем доказательством существования морфогенов является их активность, т.е. способность индуцировать разные гены при разных концентрациях. Трудность непосредственной визуализации морфогенов объясняется их очень малыми концентрациями, например, концентрация активина составляет около 50 пМ (Gurdon, 2001). В дальнейшем были охарактеризованы многие морфогенетические градиенты у различных организмов (Slack, 1987, Neumann97, Gurdon, 2001), однако для большинства из них отсутствуют данные о молекулярных механизмах, задействованных в их интерпретации (Gurdon, 2001).

Несмотря на то, что теория Л. Волперта предлагает целостную концепцию определения позиционной информации в регуляторной системе, концепция морфогенетического поля, созданная еще в первой половине XX века такими учеными, как А.Г. Гурвич, П. Веисс, К. Уоддингтон, вносит некоторые коррективы в понимание теории позиционной информации. Впервые понятие "морфогенетическое поле" было введено А.Г. Гурвичем в 1922 году в работе "О понятии эмбриональных полей". В настоящее время морфогенетическое поле считается фундаментальным понятием биологии раз-

вития. В современной формулировке это область, представляющая собой совокупность клеток, способных отвечать на локализованные биохимические сигналы, что в результате приводит к формированию специфических морфологических структур или органов (Gilbert et al., 1996). По сути, идея морфогенетического поля вовсе не противоречит теории позиционной информации и концепции морфогенетических градиентов. Однако морфогенетическое поле включает либо весь зародыш (на ранних стадиях развития), либо отдельный его участок (на более поздних стадиях), которые при этом рассматриваются как единое целое, все компоненты которого тем или иным способом получают информацию друг о друге и координируют свое поведение. Согласно центральной идее морфогенетического поля, без взаимодействия некоторого элемента с его окружением этот элемент вообще не может оценить свое положение. Концепции морфогенетических полей допускают не только ближние взаимодействия между соседними элементами зародыша, но и дальние – между элементами, непосредственно между собой не контактирующими (Белоусов, 2005).

Таким образом, концепция позиционной информации предполагает полностью статическую систему координат, которая пассивно интерпретируется клетками-мишенями предположительно в какое-то определенное время развития после достижения морфогенетическим градиентом устойчивого состояния. Идея морфогенетических полей, напротив, предполагает взаимодействия между отдельными элементами поля в ходе эмбриональной регуляции.

Было выявлено, что у эмбрионов дрозофилы дикого типа области экспрессии зиготических генов динамически сдвигаются после изначального определения их позиций пороговыми концентрациями материнских градиентов (Jaeger et al., 2004a, Surkova et al., 2008a). Таким образом, для раннего развития дрозофилы дикого типа свойственна динамическая интерпретация позиционной информации зиготическими генами, что ближе к концепции морфогенетического поля, чем к теории статического определения позиционной информации Л. Волперта (Jaeger et al., 2004a, Surkova et al., 2008a,

Самсонова, 2008). Регуляторные механизмы установления позиционной информации в эмбрионах дикого типа были выявлены с помощью математического моделирования. Было показано, что сдвиги постериорных областей экспрессии генов *gap* в anteriорном направлении обусловлены тем, что гены, экспрессирующиеся более постериорно, репрессируют гены, экспрессирующиеся более anteriорно, но не наоборот (Jaeger et al., 2004a).

Задачей данной работы было исследовать, насколько меняется характер интерпретации позиционной информации при нарушении нормального процесса сегментации. Гены *gap* являются важнейшими зиготическими регуляторами процесса детерминации сегментов, и нуль-мутации в этих генах приводят к существенному изменению экспрессии других зиготических генов. Это дает возможность проанализировать пространственную динамику экспрессии генов у эмбрионов с измененным характером взаимодействий в сети генов сегментации.

1.7 Сегментация у дрозофилы как предмет исследования устойчивости раннего развития

Биологические организмы хорошо адаптируются к изменению внешних условий и устойчивы к потенциальным повреждениям, таким, как мутации. Эпигенетический механизм подавления фенотипической вариабельности в процессе развития получил название генетической буферизации, или канализации.

Идея о канализации развития была выдвинута в 40-х годах XX века известным британским ученым Конрадом Уоддингтоном (Conrad Waddington). В основу данной концепции легло наблюдение о том, что в отличие от мутантов, организмы дикого типа обладают способностью подавлять на уровне фенотипа как генетическую вариабельность, так и вариабельность, обусловленную влиянием окружающей среды (Waddington, 1942).

Для объяснения этого факта Уоддингтон сформулировал концепцию, что в организмах, подвергающихся естественному отбору, процессы разви-

тия обычно канализированы и что существует конечное число траекторий развития, названных им креодами. Эти траектории регулируются таким образом, чтобы обеспечить один и тот же конечный результат, независимо от variability условий развития. Т.е. каждый креод должен оставаться стабильным при наличии небольших возмущений.



Рис. 3: Эпигенетический ландшафт Уоддингтона. Шар, катящийся по горному склону, является метафорическим представлением клетки. Долины изображают «креоды», или совокупности сходных траекторий в пространстве состояний. Выбор пути развития происходит в точках деления долин в результате действия генов (Суркова и др., 2011)

Метафорическим представлением явления канализации явился эпигенетический ландшафт Уоддингтона, где развивающаяся система представлена горным ландшафтом, состоящим из хребтов и долин, по которому катится шар (Рис. 3) (Waddington, 1957, Slack, 2002, Суркова и др., 2011). Выбор пути развития происходит в точках деления долин в результате действия генов. Каждая долина ландшафта соответствует совокупности сходных траекторий развития. Если шар несильно толкнуть в сторону горного склона, он

вернется в ту же долину, где был до этого, но окажется в несколько другой точке, чем до толчка. Эта аналогия позволяет уяснить смысл канализации, которая заключается в том, что в результате воздействия различных факторов (внутренних и внешних, генетических и негенетических) траектория развития может претерпеть изменение, однако это не скажется на ходе онтогенеза. В отличие от гомеостаза, обозначающего стабильность состояния биологической системы, устойчивость путей развития системы Уоддингтон назвал гомеорезом (Waddington, 1957, Saunders, 1993).

В настоящее время существование буферизации генотипической вариативности на уровне фенотипа доказано как теоретическими, так и экспериментальными исследованиями. Последние позволили обнаружить гены, ответственные за канализацию (Rutherford and S. Lindquist, 1998, Sollars et al., 2002).

Как уже упоминалось выше, каскад действия генов сегментации представляет собой удобную систему для изучения процесса передачи информации, заключенной в градиентах экспрессии материнских генов, зиготическим генам-мишеням, которые экспрессируются в виде пространственно четких областей. Было показано, что высокая позиционная вариативность морфогенетического градиента *Vcd* в несколько раз уменьшается на уровне экспрессии зиготических генов *hb* и *eve*, регулируемых *Vcd* (Houchmandzadeh et al., 2002, Spirov and Holloway, 2003). Это позволило предположить, что система генов сегментации может представлять собой модельную систему для изучения канализации экспрессии генов. Концепция канализации развития К. Уоддингтона была основана на том факте, что фенотипы мутантов, в отличие от таковых у дикого типа, отличаются повышенной вариативностью. Наличие высокоточных количественных данных по экспрессии генов в эмбрионах дрозофилы как дикого типа, так и мутантов, позволяет проверить эту концепцию на уровне экспрессии генов.

1.8 Заключение по обзору литературы

Дрозофила является модельным организмом, у которого метамерный план строения тела детерминируется на регуляторном уровне в первые 3 часа эмбрионального развития. Этот процесс осуществляется посредством каскада взаимодействий транскрипционных факторов – продуктов генов сегментации. Гены сегментации представляет собой удобную систему для изучения регуляции процессов развития, так как, во-первых, взаимодействия происходят в синцитии ещё до образования клеток путем диффузии транскрипционных факторов. Это позволяет рассматривать генные взаимодействия без учета межклеточных сигнальных путей. Во-вторых, система генов сегментации по большей части не зависит от структурных генов, так как морфологические дефекты у мутантов по этим генам наблюдаются уже после начала гастрюляции. Основные выводы о взаимодействиях генов в этой системе были сделаны на основе качественного описания изображений паттернов экспрессии генов у нуль-мутантов по генам сегментации. Данная информация имеет противоречивый характер и не является точной, что приводило, в частности, к сложностям в интерпретации результатов математического моделирования (Jaeger et al., 2004b, Jaeger, 2011). Поэтому важнейшим аспектом является получение точных количественных данных по экспрессии генов сегментации, т.к. регуляторные взаимодействия, лежащие в основе формирования паттернов в данной системе, и в настоящее время являются предметом пристального изучения.

Теория позиционной информации и концепция морфогенетических градиентов (Wolpert, 1969, Ephrussi and Johnston, 2004), предполагают четкое разделение между установлением и интерпретацией позиционной информации в морфогенетическом поле. Эти концепции предполагают полностью статическую систему координат, которая пассивно интерпретируется клетками-мишенями. Градиент экспрессии материнского гена *bcd*, задающий начальные условия для экспрессии зиготических генов, был первым морфогенетическим градиентом, который удалось увидеть непосредствен-

но в эксперименте (Driever and Nusslein-Volhard, 1988a,b). Таким образом, система генов сегментации может использоваться для изучения механизмов передачи позиционной информации от материнских градиентов зиготическим генам-мишеням как в эмбрионах дикого типа, так и в мутантных эмбрионах, где процесс детерминации сегментов существенно изменен.

Важнейшей биологической проблемой является выявление генетических и эпигенетических механизмов, лежащих в основе устойчивости развития организмов. Термин “канализация развития” был введен Конрадом Уоддингтоном для обозначения того, что организмы дикого типа, в отличие от мутантных, обладают способностью подавлять на уровне фенотипа как генетическую изменчивость, так и изменчивость, обусловленную влиянием окружающей среды (Waddington, 1942). Перечисленные выше свойства системы генов сегментации, а также высокоточные данные по экспрессии этих генов у эмбрионов дикого типа и у мутантных аллелей позволяют проверить концепцию канализации развития на уровне экспрессии генов.

2 ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1 Получение изображений картин экспрессии генов

2.1.1 Мутантные линии дрозофилы

Эмбрионы *Drosophila melanogaster* дикого типа получали, используя линию Oregon-R; эмбрионы, мутантные по гену *Kr* – линию Kr^1 (Wieschaus et al., 1984); мутантные по гену *kni* – линию Df(3L)ri-79c, либо Df(3L)ri-XT1, ru[1] st[1] e[1] ca[1] (Bloomington *Drosophila* Stock Center). Эмбрионы, мутантные по *Kr;kni* были получены путем скрещивания линий Kr^1 и Df(3L)ri-79c.

2.1.2 Сбор эмбрионов дрозофилы и иммунофлуоресцентное маркирование

Эмбрионы дрозофилы в возрасте 3-4 часов развития собирали и фиксировали в параформальдегиде в соответствии со стандартным протоколом (Frasch et al., 1987, Kosman et al., 1998).

Для получения информации об уровнях экспрессии генов был применен метод непрямого иммунофлуоресцентного маркирования (Dequin et al., 1984, Frasch et al., 1987). В случае непрямого маркирования сначала образец обрабатывают первичными антителами, специфичными для данного антигена, а затем добавляют вторичные антитела, сопряженные с флуорофором и полученные к первичным антителам.

Были использованы первичные антитела против белковых продуктов генов, в зависимости от изучаемого генотипа. Для регистрации сигнала были использованы вторичные антитела, конъюгированные с флуорофорами FITC, Texas Red и Cy5 (Jackson Labs), или с флуорофорами Alexa Fluor 488, 555, 647 и 700 фирмы Molecular Probes (Janssens et., 2005). Примерно половину эмбрионов дикого типа и все эмбрионы, полученные от мутантных линий, дополнительно метили антителами, специфичными к гистонам H1.4 (Chemicon) или Hoechst 34580 (Invitrogen) для маркирования ядер (Janssens et., 2005, Surkova et al., 2011).

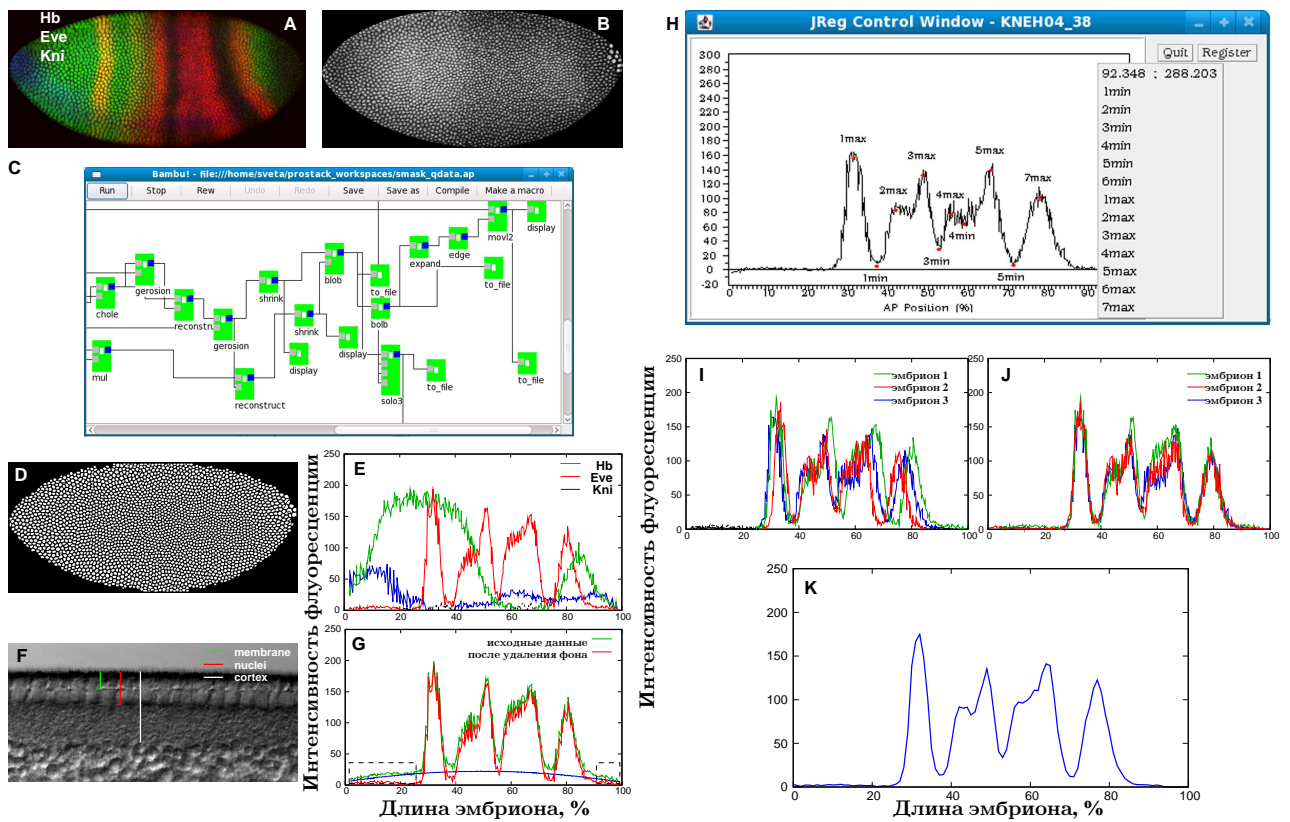


Рис. 4: Этапы получения количественных данных по экспрессии генов. (А). Конфокальное изображение эмбриона, мутантного по гену *Kr*, меченого на экспрессию *hb*, *eve* и *kni*. Белые линии обозначают центральную 10% полосу. В. Изображение, прокрашенное на гистоны, используемое для получения ядерной маски. С. Графический интерфейс программы ProStack (D). Ядерная маска. (Е). Одномерные количественные данные. (F). Изображение, полученное в режиме ДИК и используемое для временной классификации эмбрионов с помощью показанных маркеров – длины мембраны, кортекса и ядер (см. подробнее Рис. 5). (G). Удаление неспецифического фонового сигнала из картины экспрессии *eve*. Пунктиром обозначены области эмбриона, где отсутствует экспрессия. (H). Использование программы GCPReg (BREReA) в интерактивном режиме для извлечения характерных черт и пространственной регистрации картин экспрессии генов. (I, J). Картины экспрессии *eve* у трех эмбрионов, мутантных по гену *Kr* до (I) и после (J) пространственной регистрации К. Одномерный интегрированный паттерн.

2.1.3 Количественная конфокальная микроскопия

Для сканирования эмбрионов дрозофилы использовали конфокальные микроскопы Leica TCS4D с иммерсионным объективом 16x/0.50, Leica TCS SP2 с объективом 20x/0.70 Plan Apo, а также Leica TCS SP5 с объективом HCX PL APO lambda blue 20.0x/0.70 IMM Lbd.BL. Для сканирования были взяты только латерально ориентированные эмбрионы. Были использованы четыре лазера: UV 405 nm, Argon 488 nm, HeNe 543 nm и HeNe 633 nm, каналы сканировали последовательно. Для уменьшения шума от фото-

умножителей, изображение для каждого канала получали путем усреднения 8-16-ти индивидуальных сканов. Результирующие изображения имели размер 1024 на 1024 пикселей; для записи сигнала использовался 8-ми битный формат. Для последующего точного установления возраста эмбрионов по степени инвагинации клеточных мембран их дополнительно сканировали в режиме дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) в сагиттальной проекции (Surkova et al., 2008a).

Параметры конфокального микроскопа “gain” (напряжение на фотоприемнике) и “offset” (пороговый уровень сигнала) настраивали таким образом, чтобы пиксели, лежащие вне эмбриона, имели бы значение равное 0, а пиксели, имеющие наибольшую яркость, равнялись 255. Пиксели с максимальной яркостью выбирали следующим образом: моменту развития, на котором экспрессия данного гена сегментации имеет максимальную интенсивность, соответствует характерная картина экспрессии этого гена. Таким образом, опытный экспериментатор может найти на препарате для каждого гена эмбрион с картиной экспрессии, соответствующей максимуму интенсивности, и использовать небольшое количество наиболее ярких пикселей этого паттерна для настройки микроскопа. Очевидно, что такая настройка позволяет достаточно точно оценить количественно (в относительных единицах) уровни экспрессии каждого гена.

Мутантные эмбрионы определяли по отсутствию (для нуль-мутантов), или заниженной (для гетерозигот) экспрессии генов *Kr* и/или *kni* в соответствующем канале микроскопа. Для получения изображений картин экспрессии генов у мутантов делали настройки на максимум интенсивности экспрессии каждого из генов у эмбрионов дикого типа (Surkova et al., 2013).

2.2 Получение и обработка количественных данных

2.2.1 Сегментация изображений

В данной работе количественную оценку уровня экспрессии генов осуществляли путем анализа их белковых продуктов, которые, поскольку боль-

шинство генов сегментации кодируют транскрипционные факторы, локализируются в ядрах эмбриона. На рисунке 4А показано изображение картин экспрессии генов *hb*, *eve* и *kni* у эмбриона, мутантного по гену *Kr*.

Метод сегментации изображений (или разделение изображения на отдельные части или объекты), примененный в данной работе, позволяет не только выделять отдельные ядра одновременно у нескольких изображений, полученных в разных каналах микроскопа, но и извлекать количественную информацию об экспрессии генов в виде текстовых таблиц (Janssens et al., 2005, Самсонова, 2008, Суркова и др. 2008a, Surkova et al., 2008b, Surkova et al., 2011).

Для этого проводятся следующие процедуры с использованием сценариев обработки изображений в программе ProStack (Рис. 4С), (Kozlov, 2008, Козлов, 2012): (1) экспериментальные изображения приводятся в стандартную ориентацию относительно А–П и Д–В осей так, что передний (анteriorный) конец эмбриона находится слева, а спинная (дорсальная) часть находится сверху; (2) выделяется область, занимаемая объектом на изображении, и отсекаются пустые области по краям; (3) строится “ядерная маска”, то есть бинарное изображение, в котором “включены” только пиксели, соответствующие ядрам в эмбрионе (Рис. 4D); (4) вычисляются координаты центроидов ядер и средняя интенсивность флуоресценции в каждом ядре для каждого канала микроскопа, т.е. для каждого сканированного белка (Janssens et al., 2005, Суркова и др. 2008a, Surkova et al., 2011).

Построение ядерной маски производится на основе изображения эмбриона, прокрашенного на гистоновые белки или ДНК-красителем Hoechst (Рис. 4В). Если такое изображение отсутствует, то ядерная маска строится на основе пиксельного максимума экспрессии трех исследуемых генов. Качество построения ядерной маски обычно контролируется визуально путем ее наложения на исходное изображение.

Конечный результат сегментации изображений представляет собой таблицу, содержащую координаты x (А–П) и y (Д–В) каждого ядра в процентах соответственно от длины и ширины эмбриона, а также усредненную интен-

сивность флуоресценции, или относительный уровень экспрессии для каждого из генов, экспрессия которых была сканирована у данного эмбриона. Так как экспрессия генов сегментации в области презумптивной зародышевой полоски отвечает за детерминацию структур вдоль оси А–П, и, по большей части, не зависит от системы Д-В генов, данной работе анализируются одномерные количественные данные. Эти данные извлекаются из центральной 10% полосы эмбриона, при этом Д-В координата игнорируется (Рис. 4А,Е)

2.2.2 Классификация эмбрионов по времени развития

Для реконструкции временной динамики экспрессии генов на основе индивидуальных фиксированных эмбрионов было необходимо их классифицировать по времени развития.

Для циклов дробления 10–13 использовался простой подсчет ядер в текстовых файлах, содержащих количественные данные по экспрессии генов и полученных путем сегментации изображений (см. ниже). Т. к. интерфазы этих циклов составляют только 6–14 минут, этого было достаточно, чтобы получить временную шкалу для этого периода.

Цикл 14А намного дольше и составляет примерно 50 минут, поэтому эмбрионы внутри этого цикла были разделены на восемь эквивалентных по возрасту временных классов на основе динамики экспрессии гена *eve* (Рис. 5) (Surkova et al., 2008a, Самсонова, 2008, Surkova et al., 2013). Практическим критерием эквивалентности временного класса по возрасту является способность опытного наблюдателя различить картины экспрессии эмбрионов, принадлежащих к одному классу. Таким образом, длительность каждого временного класса примерно равна 6.5 минутам развития. Для увеличения выборок для каждой временной точки у мутантов с целью проведения статистического анализа пространственных сдвигов и вариабельности областей экспрессии генов, каждые два соседних временных класса были объединены в одну временную группу, что дало 4 временных группы по 13 минут

каждая (Рис. 5), (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Эта временная шкала примерно соответствует описанным ранее 4-м фазам формирования клеточных мембран в бластодерме (Lecuit and Wieschaus, 2000, Schroeder et al., 2011).

В данной работе были использованы эмбрионы дикого типа, начиная с цикла дробления 10 и заканчивая началом гастрюляции. Эмбрионы, полученные от мутантных линий, сканировали только в цикле дробления 14А, так как в более ранних циклах невозможно выделить нуль-мутантов из-за крайне низкого уровня экспрессии генов.

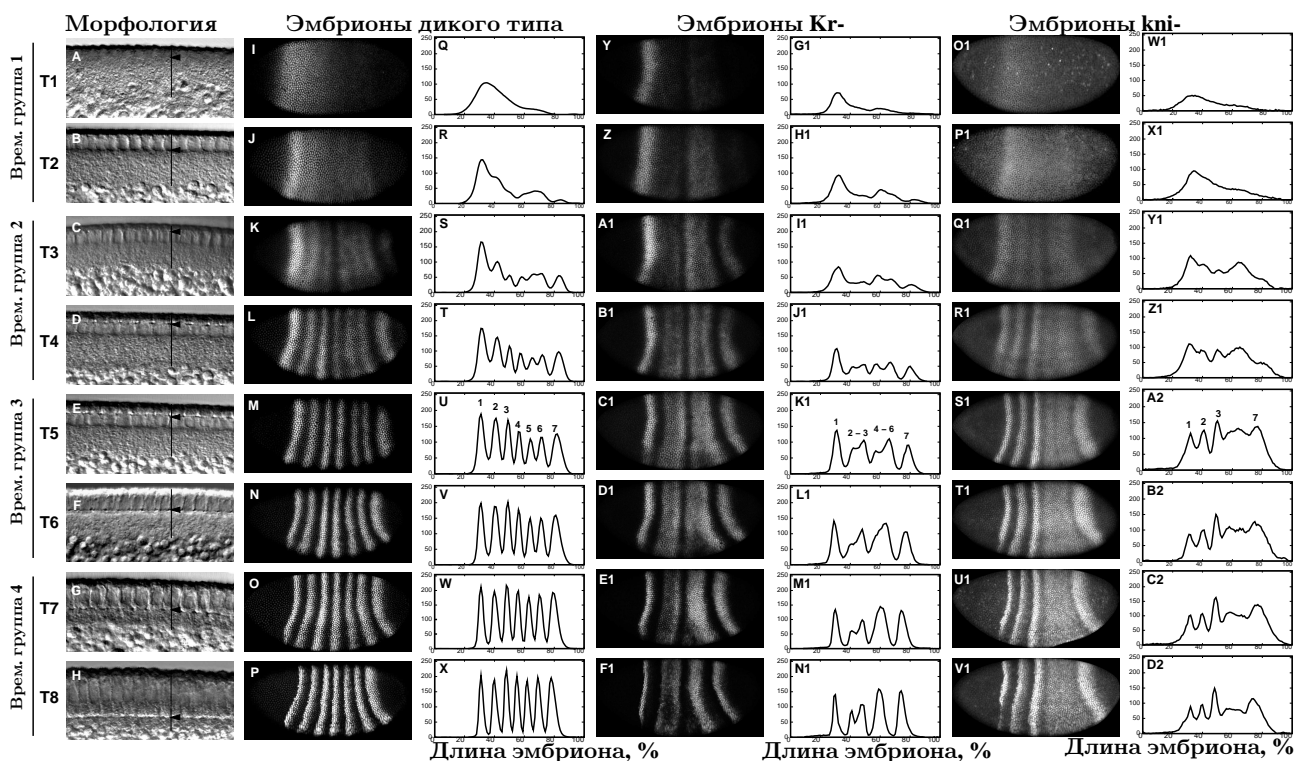


Рис. 5: Экспрессия *eve* в 8 временных классах (Т) цикла 14А у эмбрионов дикого типа и нуль-мутантов по генам *Kr* и *kni*. Каждый временной класс имеет продолжительность 6.5 минут. Вертикальными полосками слева показаны 4 временные группы, каждая из которых включает два соседних временных класса. (А–Н) Изображения морфологии бластодермы высокого разрешения, полученные в режиме ДИК. Вертикальные черные линии показывают кортикальную цитоплазму, черные стрелки во временных классах 1 и 2 показывают удлинение ядер, а во временных классах 3–8 – позицию фронта растущей мембраны. (I–P) Изображения картин экспрессии *eve* в типичных эмбрионах дикого типа, нуль-мутантах по *Kr* (Y–F1) или *kni* (O1–V1), принадлежащих к обозначенному временному классу. (Q–X), (G1–N1), (W1–D1) Одномерные интегрированные картины экспрессии *eve* в 8-ми временных классах. Номера полос показаны для временного класса 5 (Surkova et al., 2013). Рисунки (А–Х) были опубликованы ранее (Самсонова, 2008, Surkova et al., 2008a), рисунки (Y–D2) впервые представлены в статье (Surkova et al., 2013).

Классификация эмбрионов, основанная на анализе динамики картин экспрессии гена *eve*, хорошо согласуется со степенью инвагинации мембран – морфологическим маркером, используемым для определения возраста эмбрионов в цикле 14A (Рис. 4F и 5), (Surkova et al., 2008b, Самсонова, 2008, Суркова и др. 2008a, Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Во временном классе 1 ядра эмбриона имеют округлую форму а во временном классе 2 форма ядер становится удлиненной. Инвагинация клеточных мембран начинается во временном классе 3, рост мембран оценивается относительно размера области кортикальной цитоплазмы между поверхностью эмбриона и желтком, имеющим четко выраженные гранулы (Рис. 4F и 5). К концу цикла 14A, во временном классе 8, мембраны достигают желтка, в это время происходит образование клеток.

Изображения морфологии бластодермы были получены примерно для половины эмбрионов дикого типа и для всех мутантных линий. Для оценки степени инвагинации мембран использовались изображения, полученные только с одной стороны эмбриона (дорсальной), так как скорость целлюляризации существенно различается в Д–В направлении. Информация о степени инвагинации мембран была особенно полезна для классификации мутантов, так как для этих эмбрионов динамика картин экспрессии *eve* имеет сложный характер, ранее не описанный в литературе (Рис. 5Y-D2), (Surkova et al., 2013).

Для 120 эмбрионов дикого типа, принадлежащих к временным классам 3–8 цикла 14A мы произвели измерение размера мембран в процентах от размера кортекса на дорсальной стороне эмбриона, построили кривую роста мембран по этим 5-ти временным точкам (Рис. 6A) и сравнили полученные результаты с аналогичной кривой, построенной на основе измерений *in vivo* (Merrill et al., 1988). Динамика степени инвагинации мембран в наших данных совпадает со стандартной кривой, а именно, четко наблюдаются две фазы инвагинации мембран: медленная (до временного класса 6), и быстрая (во временных классах 6–8) (Рис. 6A). На основе кривой (Merrill et al., 1988) был определен возраст каждого из 120 эмбрионов, а затем по-

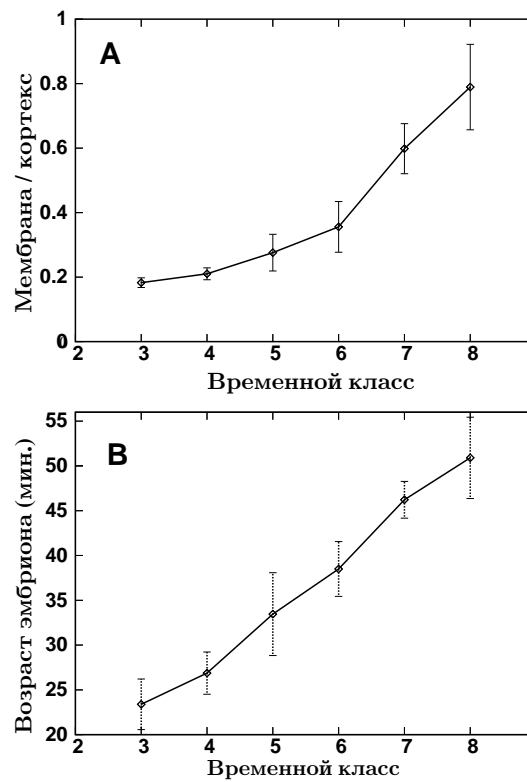


Рис. 6: Соотношение временной классификации фиксированных эмбрионов с данными, полученными *in vivo*. А. Степень инвагинации плазматических мембран у фиксированных эмбрионов временных классов 3–8 (отношение длины мембраны к длине кортекса). В. Распределение возраста эмбрионов, определенного по стандартной кривой (Merrill et al., 1988) по временным классам. Для каждого временного класса на (А,В) показано стандартное отклонение значений от среднего.

строен график его зависимости от классификации по временным классам (Рис. 6А). График показывает, что временные классы представляют собой практически равные промежутки времени, и тем самым метод временной классификации фиксированных эмбрионов адекватно соотносится с динамикой развития эмбриона *in vivo* (Surkova et al., 2008a).

2.2.3 Удаление фонового сигнала

Хорошо известно, что, наряду со специфическим окрашиванием, методы иммуофлуоресцентного маркирования биологических образцов *in situ* приводят к появлению неспецифического сигнала, называемого фоном. Возникновение этого сигнала вызвано многими факторами, из которых важная роль принадлежит первичным и вторичным антителам.

Метод удаления фонового сигнала, примененный в этой работе, основан на наблюдении, что уровень флуоресценции у нуль-мутантов по генам сегментации, окрашенных на продукт мутантного гена, хорошо аппроксимируется двумерным параболоидом, или, в более общем случае, выпуклой поверхностью второго порядка (Myasnikova et al., 2005).

Основная идея метода удаления фона состоит в определении областей эмбриона, где экспрессия гена отсутствует. Эти области затем используются для аппроксимации фонового сигнала, чтобы затем удалить его масштабированием картины экспрессии (Рис. 4G), (Myasnikova et al., 2005, Самсонова, 2008, Суркова и др. 2008a, Surkova et al., 2008b).

2.2.4 Регистрация картин экспрессии генов

Конфокальный микроскоп позволяет получать одновременно картины экспрессии только нескольких генов. Однако в конечном итоге интерес представляет пространственно–временная динамика экспрессии всех генов исследуемой генной сети. В силу индивидуальной вариабельности размеров эмбрионов, информацию об относительном расположении картин экспрессии разных генов в пространстве невозможно получить простым совмещением картин экспрессии у индивидуальных эмбрионов, окрашенных антителами к разным белкам. Чтобы решить эту задачу, данные, полученные для индивидуальных эмбрионов, должны быть приведены к общей системе координат с помощью процедуры регистрации.

В данной работе был использован метод регистрации, основанный на выделении контрольных точек (Brown, 1992) в изображении и на преобразовании координат для максимально полного совмещения этих точек в разных изображениях. В качестве контрольных точек обычно используют какие-либо характерные признаки картин экспрессии. Обычно это координаты максимумов и минимумов экспрессии (Myasnikova et al., 2001, Kozlov et al., 2002, Суркова и др. 2008a, Surkova et al., 2008b, Surkova et al., 2011). Выделение контрольных точек производилось в программах GCPReg и BREReA

(Kozlov et al., 2009, Козлов, 2012) (Рис. 4Н) на основе аппроксимации картин экспрессии квадратичными сплайнами (Myasnikova et al., 2001), или на применении вейвлетного преобразования (FRDWT) (Kozlov et al., 2002).

Для мутантных эмбрионов в программе создавались новые шаблоны для выделения точек для каждого временного класса, так как картины экспрессии генов у таких эмбрионов существенно изменены по сравнению с эмбрионами дикого типа (Рис. 5). Пример регистрации паттернов *eve* у эмбрионов, мутантных по гену *Kr*, показан на рисунке 4Н–J.

Основной сложностью в создании новых шаблонов и файлов параметров в программах GCPReg и BREReA, включающих интервалы поиска А–П позиций и уровней экспрессии для выделения характерных черт, явилась сильная вариабельность экспрессии генов, свойственная мутантным эмбрионам (см. главу 5). Помимо этого, в отличие от эмбрионов дикого типа, где характер экспрессии *eve* меняется крайне мало начиная с временного класса 5, у эмбрионов *Kr*– экспрессия *eve* претерпевает существенные изменения в течение всего цикла 14А (Рис. 5I1–N1). Это приводит к тому, что количество контрольных точек, необходимых для успешной регистрации паттерна после начала формирования полос, различается в каждом временном классе.

Кроме того, регистрация картин экспрессии генов у мутантных эмбрионов впервые осуществлялась не только на основе паттерна *eve* (Рис. 4Н), а и на основе картины экспрессии гена *gar* *gt*, имеющего в позднем цикле 14А несколько областей экспрессии вдоль А–П оси эмбриона (Рис. 11J,К). Это было прежде всего необходимо для регистрации паттернов у двойных мутантов *Kr;kni*, меченых только на экспрессию генов *gar*.

В отличие от эмбрионов дикого типа, при выделении точек у мутантных эмбрионов во всех случаях паттерны аппроксимировались сплайнами для того, чтобы избежать ошибок поиска экстремумов широких областей экспрессии, в связи с вариабельностью уровней экспрессии между отдельными ядрами эмбриона.

Для всех эмбрионов выделение контрольных точек осуществлялось в ин-

терактивном режиме для визуального контроля правильности нахождения экстремумов и возможности корректировки неправильно найденных точек (Рис. 4Н).

Вслед за выделением контрольных точек для каждого изображения находили такое преобразование координат, которое минимизировало расстояние между соответствующими точками в разных изображениях, а затем трансформации координат подвергали все регистрируемые изображения (Myasnikova et al., 2001, Самсонова, 2008, Суркова и др. 2008а, Surkova et al., 2011).

Описанный метод был использован для регистрации картин экспрессии генов сегментации у эмбрионов, относящихся к одному временному классу. Пример результата регистрации картин экспрессии гена *eve* у трех эмбрионов, мутантных по гену *Kr* и отнесенных к временному классу 5, показан на рисунке 4I, J. Очевидно, что регистрация уменьшает вариабельность взаимного расположения паттернов у разных индивидуальных эмбрионов вдоль А–П оси.

2.2.5 Построение интегрированного набора данных

Главной целью пространственной регистрации и удаления фона является построение “эталонного” или “интегрированного” набора данных, отражающего взаимное расположение областей экспрессии всех генов исследуемой генной сети на каждом отрезке времени. Таким образом, области экспрессии каждого гена будут характеризоваться средними для каждого периода времени значениями интенсивности флуоресценции.

Для конструирования одномерных интегрированных картин экспрессии генов сегментации, координаты ядер каждого одномерного паттерна из набора данных, прошедшего регистрацию, группируются вдоль оси x по R интервалам (Myasnikova et al., 2001). Затем внутри каждого интервала вычисляется среднее значение интенсивности флуоресценции по всем эмбрионам данного временного класса. Число R выбирается из тех соображений, что, к примеру, в цикле 14А, в центральной части эмбриона диаметр одного

ядра составляет примерно 1% от его длины, и, следовательно, R должно быть равно 100 для того, чтобы правильно смоделировать ядерную структуру паттерна (Myasnikova et al., 2001, Kozlov et al., 2002, Самсонова, 2008, Суркова и др. 2008a, Surkova et al., 2008b, Surkova et al., 2011).

В следующей главе представлена подробная характеристика интегрированных наборов данных по экспрессии генов сегментации для эмбрионов дикого типа и мутантов по генам *gap*.

2.3 Выделение характерных черт картин экспрессии и статистический анализ данных

В данной работе динамика и вариабельность формирования областей экспрессии осуществляется путем извлечения небольшого числа характерных черт картин экспрессии генов и последующего количественного анализа этих данных.

В качестве характерных черт используются А–П позиции максимумов и минимумов экспрессии, а также позиции точек, где уровень экспрессии достигает определенного порогового значения (Рис. 7). Границами областей экспрессии считаются А–П позиции, соответствующие 50% от максимального уровня экспрессии (Surkova et al., 2008a).

Метод, применяемый для извлечения характерных черт картин экспрессии, во многом аналогичен используемому при пространственной регистрации данных (см. выше, Рис. 4Н). При этом учитываются перечисленные ниже характерные особенности картин экспрессии генов.

Для картин экспрессии генов *pair-rule* используется вейвлетное преобразование (FRDWT) (Kozlov et al., 2002), так как этот метод хорошо работает для паттернов, имеющих четко выраженные экстремумы. Однако для более широких областей экспрессии, таких как: материнские градиенты, области экспрессии генов *gap*, ранние паттерны экспрессии генов *pair-rule* до образования полос, а также паттерны экспрессии генов *pair-rule* у ноль-мутантов, обычно применяется аппроксимация сплайнами (Myasnikova et

al., 2001). При этом происходит сглаживание паттерна и устранение локальных всплесков, затрудняющих выделение характерных черт.

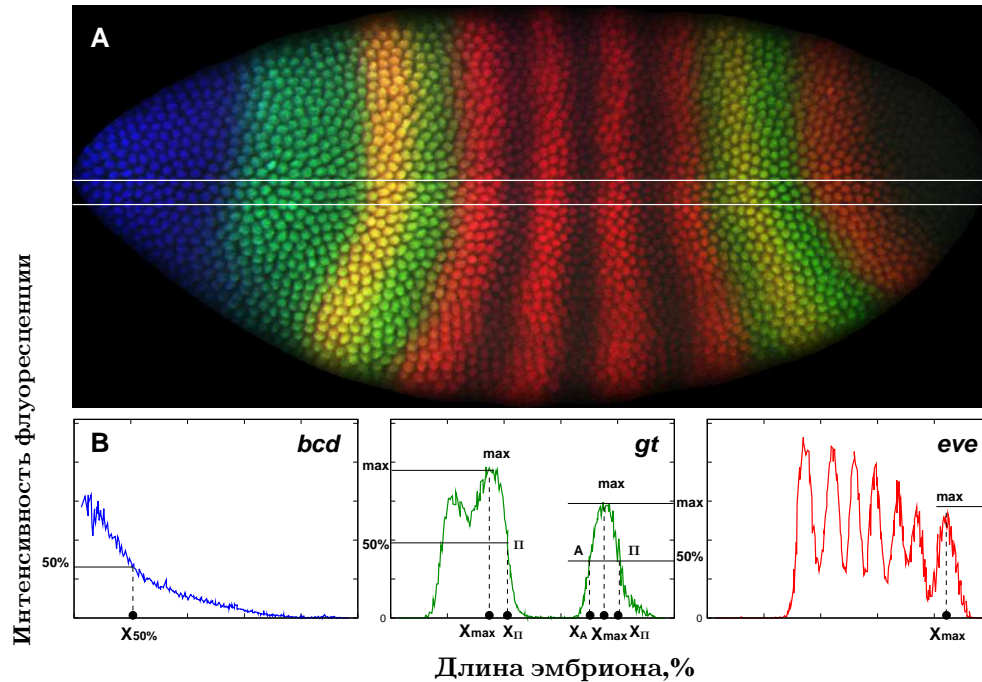


Рис. 7: Получение одномерной картины экспрессии генов сегментации и выделение характерных признаков. А. Эмбрион дрозофилы цикла 14А, меченый на экспрессию генов *bcd*, *gt* и *eve*, обозначенных, соответственно, синим, зеленым и красным цветами. Белыми линиями выделена центральная 10% полоса. В. Одномерные картины экспрессии трех генов, показанных на рисунке А. $X_{50\%}$, X_A и $X_{П}$ – А–П координаты точек, в которых уровень экспрессии достигает 50% от максимального значения, X_{max} – А–П координаты максимумов экспрессии (Surkova et al., 2008a).

Для проверки статистической значимости пространственных сдвигов областей экспрессии использовался метод ANOVA в пакете StatSoft Statistica. Для каждого временного класса (или временной группы, Рис. 5) были взяты выборки значений А–П позиций областей экспрессии у индивидуальных эмбрионов и проверялось, насколько статистически значимо различаются выборки для всех анализируемых временных классов при $P = 0.05$. Значением пространственного сдвига является разность между усредненными позициями данной области экспрессии в 2-х разных временных классах или временных группах.

Пространственная вариабельность картин экспрессии рассматривалась путем анализа значений стандартных отклонений А–П позиций характер-

ных черт. Значения пространственных сдвигов и вариабельности областей экспрессии вычислялись в % ДЭ.

2.4 Заключение к главе 2

В главе 2 описаны методы получения экспериментальных данных, использованных в данном исследовании, а также все этапы получения и обработки количественных данных по экспрессии генов сегментации у дрозофилы. Эти этапы включают в себя обработку изображений, классификацию эмбрионов по времени развития, удаление неспецифического фонового сигнала, пространственную регистрацию картин экспрессии генов, построение интегрированных паттернов всех исследованных генов у эмбрионов дикого типа, а также нуль-мутантов и гетерозигот по генам *gar*. Помимо этого, описан метод получения данных *in vivo* для главы 4 и методы статистической обработки данных, примененные в главах 4 и 5.

Из перечисленных выше методов особое внимание уделено временной классификации эмбрионов и пространственной регистрации, так как для данной работы ранее разработанные сценарии были модифицированы, в основном, из-за необходимости обработки данных по нуль-мутантам, имеющих картины экспрессии генов, существенно отличающиеся от таковых у эмбрионов дикого типа. Помимо этого, валидность метода временной классификации была дополнительно проверена путем измерения степени инвагинации плазматических мембран в цикле 14А и сопоставления полученных данных, распределенных по временным классам, с ранее опубликованной стандартной кривой для определения возраста эмбрионов (Merrill et al., 1988).

3 ГЛАВА 3. Количественные данные по экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа и мутантных по генам *gar*

В данной главе впервые приводится подробное описание экспрессии генов сегментации у эмбрионов дрозофилы дикого типа и мутантов по генам *Kr* и *kni*. Количественные данные с пространственным разрешением в одно ядро эмбриона и временным разрешением в 6.5 минут развития позволили выявить много новых закономерностей экспрессии этих генов у дикого типа, у одиночных и двойных нуль-мутантов по генам *gar*, а также у гетерозигот. Усредненные (интегрированные) данные для каждого временного класса сравниваются с исходными данными, полученными для индивидуальных эмбрионов.

3.1 Характеристика набора данных

Был осуществлен сбор и иммуноокрашивание эмбрионов дрозофилы и получены изображения картин экспрессии генов *hb*, *kni*, *gt*, *eve*, *ftz*, *bcd*, *cad* и *tll* у 237 нуль-мутантов и 89 гетерозигот по гену *Kr*. Также использовались ранее полученные изображения картин экспрессии генов *hb*, *Kr* и *eve* у 68 нуль-мутантов и 10 гетерозигот по гену *kni*; генов *hb* и *gt* у 29 нуль-мутантов по генам *Kr;kni* (Surkova et al., 2013). Для анализа использованы данные по экспрессии генов *eve*, *bcd*, *cad*, *Kr*, *kni*, *gt*, *hb*, *tll*, *ftz*, *h*, *run*, *odd*, *prd* и *slp* примерно для 1500 эмбрионов дрозофилы дикого типа (Pisarev et al., 2009, Самсонова, 2008). Подробнее в разделе "Личный вклад автора".

3.2 Материнские координатные гены

Количественная экспрессия генов *bcd* и *cad* была проанализирована как у эмбрионов дикого типа, так и у нуль-мутантов по *Kr*, последнее не выявило каких-либо отличий экспрессии этих генов от таковой у эмбрионов дикого типа. Это подтвердило предыдущие результаты об отсутствии влияния генов *gar* на *bcd* и *cad* в период раннего эмбриогенеза (Bronner and Jackle, 1991). Активность *Kr* отвечает за позднюю зиготическую экспрессию *cad* в мальпигиевых сосудах, но не в раннем эмбрионе (Liu and Jack, 1992).

3.2.1 *bicoid*

Градиент белка Vcd с максимумом в антериорной части эмбриона, обнаруживается в области от 0 до 70–80% ДЭ (Рис. 8А, J). Интегрированный паттерн *bcd* показывает, что интенсивность экспрессии этого гена остается в значительной мере постоянной во времени начиная с цикла дробления 11 до момента времени за 12–18 минут до начала гастрюляции (Рис. 8). Присутствует тенденция максимальной аккумуляции Vcd в начале цикла 14А (временные классы 1–2) с последующим постепенным снижением уровня белка. Небольшие перепады уровня Vcd, такие как 5% снижение между циклами дробления 12 и 13, не представляются существенными из-за наблюдаемой межъядерной вариабельности, показанной на Рис. 8А и вариабельности между эмбрионами, отраженной на Рис. 9А. Однако к концу цикла 14А концентрация Vcd падает почти в два раза, и такое резкое падение является существенным. Уменьшение уровня концентрации не влияет на область распространения градиента (Рис. 8А, N), (Surkova et al., 2008a).

3.2.2 *caudal*

В циклах дробления 10, 11 и 12 *cad* формирует паттерн, с постепенно увеличивающейся концентрацией от антериорного полюса эмбриона примерно до 60% ДЭ (Рис. 8В, J), причем в постериорном конце эмбриона концентрация снова уменьшается. В этот период экспрессия *cad* имеет полностью ма-

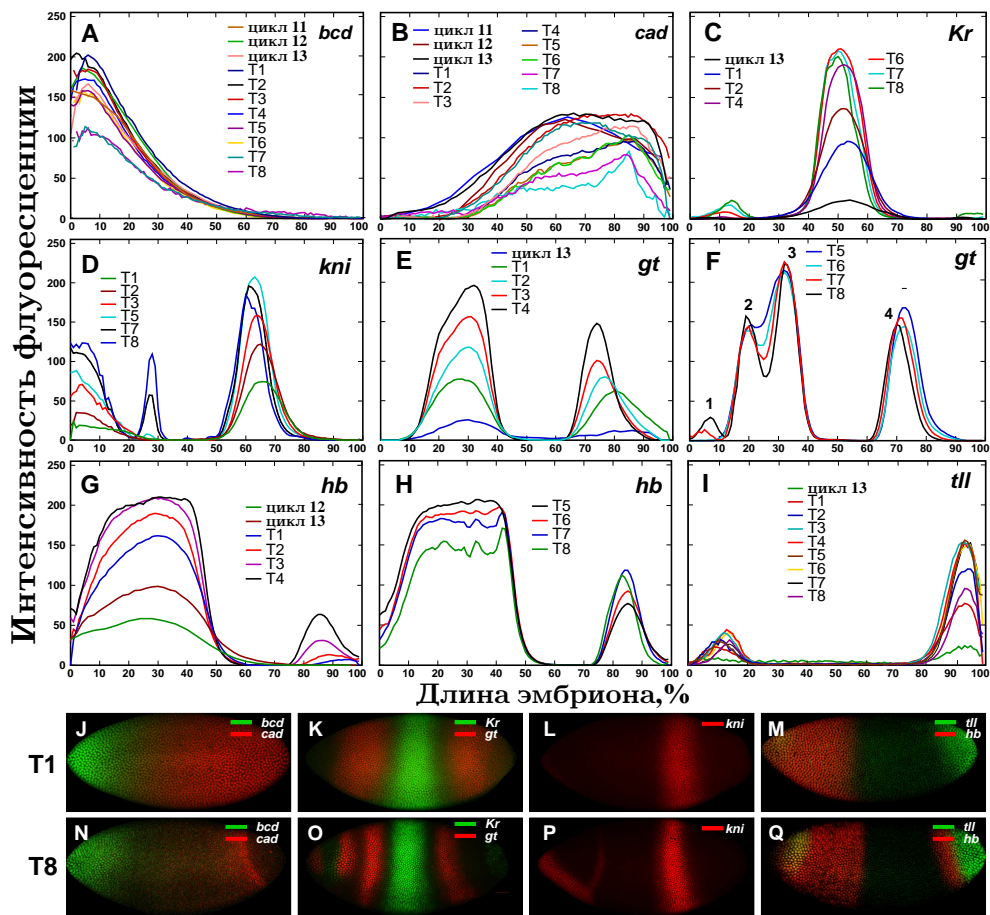


Рис. 8: Временная динамика экспрессии материнских генов и генов гар. Одномерные интегрированные картины экспрессии *bcd* (A), *cad* (B), *Kr* (C), *kni* (D), *gt* (E и F), *hb* (G и H) и *tll* (I) показаны для циклов деления ядер 11-13 и временных классов (Т) цикла 14А. Области экспрессии, входящие в картину экспрессии *gt* на панели F пронумерованы в направлении А–П. На панелях J–Q показаны типичные конфокальные изображения экспрессии тех же генов, что и на А–I, в индивидуальных эмбрионах, принадлежащих к временным классам 1 (Т1) и 8 (Т8). Гены, экспрессирующиеся в одном и том же индивидуальном эмбрионе, показаны разными цветами, обозначенными на каждой панели.

теринское происхождение (Macdonald and Struhl, 1986, Mlodzik and Gehring, 1987). В цикле 13 и временных классах 1 и 2 цикла 14А экспрессия *cad* обнаруживается и в абдоминальной, и в постериорной области эмбриона, и является как материнской, так и зиготической (Schulz and Tautz, 1995). Хотя интегрированный паттерн демонстрирует некоторые незначительные изменения в уровне экспрессии в этот период, при детальном рассмотрении картин экспрессии у индивидуальных эмбрионов заметно, что эти изменения по большей части являются следствием большого уровня вариабельности экспрессии между эмбрионами (Рис. 9А). Во временном классе 3 экспрессия *cad* в абдоминальной области, примерно с 50 до 75% ДЭ, уменьшается

и наивысший уровень экспрессии наблюдается в постериорной части эмбриона. Во временных классах 4-6 максимум экспрессии *cad* смещается к 75% ДЭ, формируя монотонный постериорно-антериорный градиент. К концу цикла 14А, во временных классах 7 и 8, постериорная область экспрессии сужается до полосы в районе 75-90% ДЭ (Рис. 8В,Н), (Surkova et al., 2008a).

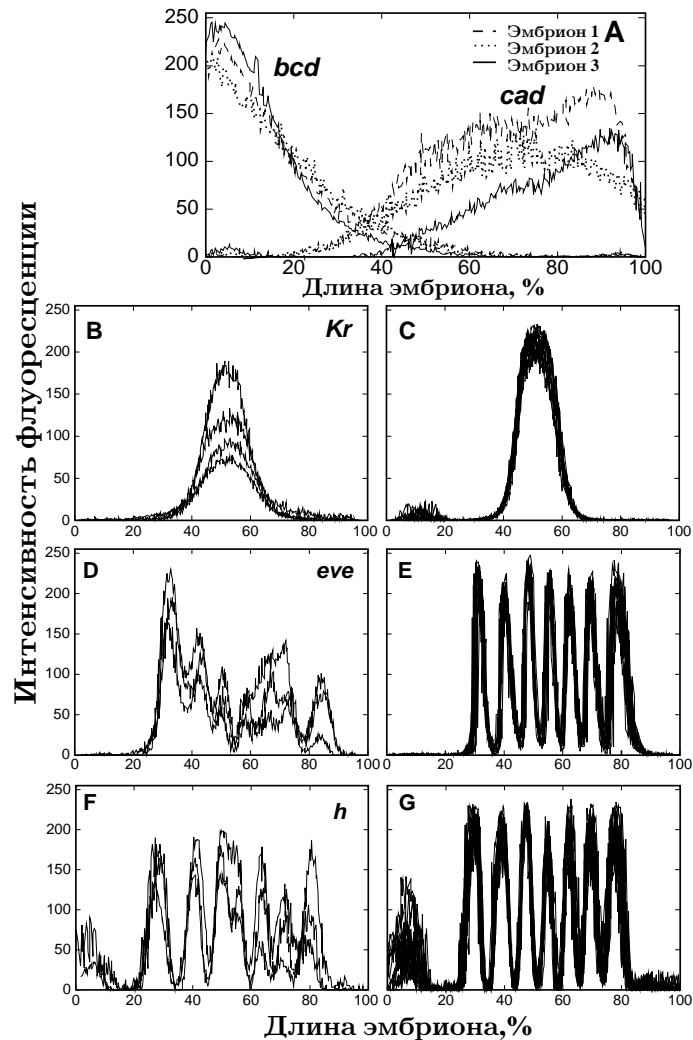


Рис. 9: Вариабельность экспрессии генов у индивидуальных эмбрионов дикого типа. Картины экспрессии *bcd* и *cad* показаны на (А) для трех эмбрионов, принадлежащих к временному классу 2 и меченых на экспрессию обоих генов. На панелях В, D и F показаны несколько наиболее различающихся между собой ранних картин экспрессии *Kr*, *eve* и *h* в индивидуальных эмбрионах из временных классов 1, 3 и 4 соответственно. Экспрессия *Kr* во временном классе 6 (С), а также *eve* (Е) и *h* (G) во временном классе 7 показана для случайных выборок из 13, 12 и 16 индивидуальных эмбрионов соответственно.

3.3 Гены *gap*

В отличие от материнских генов, экспрессия генов *gap* значительно изменена у нуль-мутантов по *Kr* и *kni*, поэтому в данном разделе описание количественной экспрессии генов *gap* приводится отдельно для эмбрионов дикого типа и нуль-мутантов. Исключение составляет терминальный ген *tll*, контролирующий формирование терминальных областей эмбриона дрозофилы (Strecker et al., 1986, Strecker et al., 1988, Mahoney and Lengyel, 1987). Он не является классическим геном *gap*, однако регулирует гены *gap*, *pair-rule*, а также гомеозисные гены (Reinitz and Levine, 1990, Mahoney and Lengyel, 1987), но сам не регулируется ими (Bronner and Jackle, 1991). Поэтому его экспрессия у мутантов по *Kr* и *kni* не изменена относительно таковой у эмбрионов дикого типа.

3.3.1 *knirps*

Экспрессия *kni* у эмбрионов дикого типа. Низкий уровень экспрессии *kni* впервые обнаруживается в районе 60–75% ДЭ. В начале цикла 14А *kni* экспрессируется в виде широкой постериорной области в презумптивной брюшной части эмбриона, а также в антериорно–вентральной области (Rothe et al., 1989, Rothe et al., 1994). (Рис. 8D и Рис. 10), (Surkova et al., 2008a).

Максимум постериорной области экспрессии *kni* у эмбрионов дикого типа во временной группе 2 имеет пространственное положение 64.5% ДЭ, а во временной группе 4 – 62.9% ДЭ (Табл. 1). Форма этой области практически не изменяется в течение цикла 14А. Уровень экспрессии в постериорной области *kni* достигает максимума во временном классе 5 (Рис. 12В).

Экспрессия *kni* в антериорной области находится под контролем Д–В системы, поэтому недостаточно достоверно представлена на одномерных интегрированных паттернах экспрессии. Однако очевидно, что в раннем цикле 14А эта антериорная область расположена в районе 0–20% ДЭ (Рис. 8D, ??), (Surkova et al., 2008a).

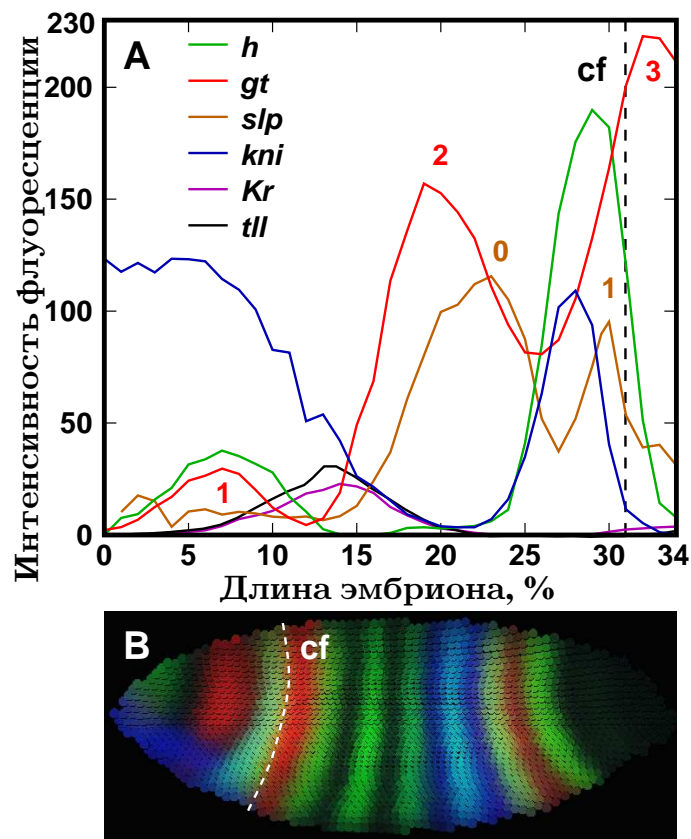


Рис. 10: Картины экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа в презумптивной головной области. (А) Колокализация одномерных картин экспрессии *h*, *gt*, *slp*, *kni*, *Kr* и *tll* в презумптивном головном отделе дрозофилы во временном классе 8. (В) Двумерные интегрированные паттерны *gt* (красный), *h* (зеленый) and *kni* (синий) в искусственно реконструированном эмбрионе (Kozlov et al., 2002). Приблизительное положение презумптивной головной борозды (*cf*) показано белой пунктирной линией (Surkova et al., 2008a).

Экспрессия *kni* у нуль-мутантов по *Kr*. Измененная экспрессия *kni* является отличительной чертой эмбрионов, мутантных по *Kr*. У таких эмбрионов уровень экспрессии *kni* крайне низок в течение всего цикла 14А. Максимальный уровень, составляющий всего 1/10 наблюдаемого у эмбрионов дикого типа, выявляется во временном классе 5 (Рис. 11В). В дальнейшем уровень экспрессии еще больше снижается, достигая почти фонового уровня перед гастрულიацией (Рис. 11С, F). Падение уровней экспрессии генов в конце цикла 14А является общей чертой экспрессии всех генов гар как у эмбрионов дикого типа, так и у мутантов (Рис. 12), однако экспрессия *kni* демонстрирует, что подобное явление наблюдается даже в тех случаях,

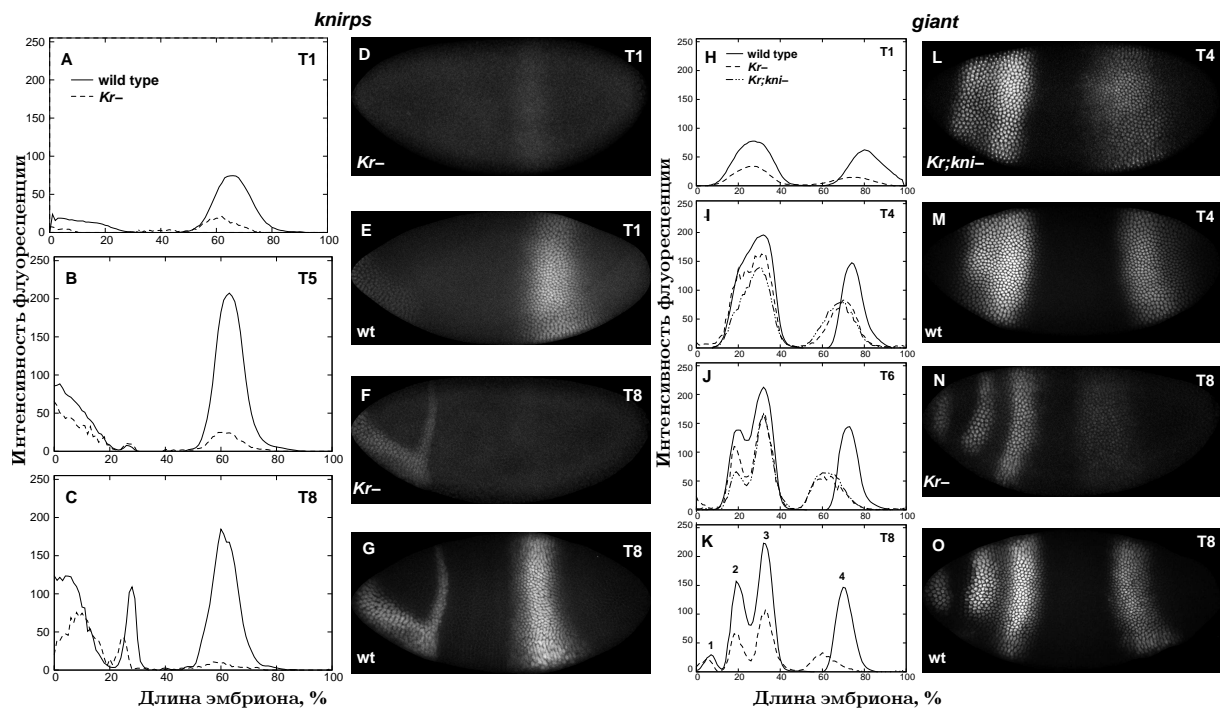


Рис. 11: Временная динамика экспрессии *kni* у эмбрионов *Kr-* и экспрессии *gt* у эмбрионов *Kr-* и *Kr;kni-* в сравнении с таковой у эмбрионов дикого типа (wild type). Интегрированные паттерны экспрессии *kni* (A-C) и *gt* (H-K) показаны для обозначенных временных классов (T) цикла 14A. Четыре области экспрессии *gt* отмечены на панели (K). На панелях (D-G) и (L-O) показаны типичные конфокальные изображения эмбрионов, меченых на экспрессию *kni* и *gt* соответственно (Surkova et al., 2013).

когда уровень экспрессии гена очень низкий. У эмбрионов *Kr-* пик области экспрессии *kni* расположен примерно на 3% ДЭ ближе к anteriорному концу эмбриона, чем у эмбрионов дикого типа. Такая разница А–П позиций наблюдается как в начале, так и в конце цикла 14A (Табл. 1).

Антериорная область экспрессии *kni* у эмбрионов *Kr-* несколько занижена по сравнению с таковой у эмбрионов дикого типа, но резкого падения уровня экспрессии, как в постериорной области, не наблюдается, что особенно очевидно в конце цикла 14A (Рис. 11C,F), (Surkova et al., 2013, Surkova et al., 2008a).

3.3.2 *giant*

Экспрессия *gt* у эмбрионов дикого типа. В работе Элдон и Пирротта (Eldon and Pirrotta, 1991) сообщается, что белок Gt у эмбрионов дикого типа впервые появляется в конце цикла дробления 12, однако в исследуемом

наборе данных экспрессия *gt* в этот период не была обнаружена. В цикле 13 у большинства эмбрионов очевидно наличие двух областей экспрессии: антериорной от 22 до 37% ДЭ, и постериорной от 75 до 90% ДЭ (Рис. 8E). Во временном классе 1 цикла 14А форма этих областей не меняется, однако уровень экспрессии увеличивается в два раза.

В течение всего цикла 14А у эмбрионов дикого типа обнаруживается значительное сужение задней области экспрессии *gt* (Табл. 2), происходящее из-за того, что пространственный сдвиг его постериорной границы превосходит сдвиг антериорной границы (Surkova et al., 2008a). Экспрессия *gt* в этой области достигает максимума во временном классе 5 и в дальнейшем убывает (Рис. 12С).

Обл.экспр./ Врем. группа	Gt ant			Hb ant				Kr cent	
	WT	<i>Kr-</i>	<i>Kr;kni-</i>	WT	<i>Kr-</i>	<i>kni-</i>	<i>Kr;kni-</i>	WT	<i>kni-</i>
2	38	36.5	-	46.3	44.6	44.7	44.3	52.1	52.0
4	37.8	37.3	37.6	46.9	45.7	45.9	45.8	50.2	49.0

Обл.экспр./ Врем. группа	Kni post		Gt post			Hb post			
	WT	<i>Kr-</i>	WT	<i>Kr-</i>	<i>Kr;kni-</i>	WT	<i>Kr-</i>	<i>kni-</i>	<i>Kr;kni-</i>
2	64.5	61.3	74.6	69	-	86.5	83.5	85.3	-
4	62.9	60	71	61.6	61.9	84.3	80.4	83.1	81.9

Таблица 1: Средние значения А–П позиций областей экспрессии генов *gar* у эмбрионов *Kr-*, *kni-* и *Kr;kni-* во временных группах 2 и 4 в сравнении с таковыми у эмбрионов дикого типа (WT). Приведены результаты для задних границ антериорных областей экспрессии *gt* и *hb*, а также максимумов всех остальных областей экспрессии. Сокращения “ant”, “cent” и “post” обозначают антериорные, центральные и постериорные области экспрессии (Surkova et al., 2013).

Экспрессия *gt* в антериорной области у эмбрионов дикого типа значительно более динамична, чем в постериорной. Во временных классах 2 и 3 эта область становится асимметричной (Рис. 8E) и эта асимметрия сопровождается исчезновением вентральной экспрессии в передней части. Во временном классе 4 начинает формироваться новая область экспрессии (домен 2 на Рис. 8E) на передней границе исходной области (домена 3) с дорсаль-

ной стороны примерно в районе 18% ДЭ.

В этот период экспрессия *gt* в передней области крайне вариабельна. Эта вариабельность выражается в существенном разбросе уровней экспрессии у индивидуальных эмбрионов (не показано). Разделение передней области экспрессии происходит медленно и наблюдается у 10, 61 и 94% эмбрионов из временных классов 4, 5 и 6, соответственно (Surkova et al., 2008a).

Головная область экспрессии (домен 1), расположенная в районе образования будущих головных структур, у эмбрионов дикого типа начинает формироваться во временном классе 5. Эта область обнаружена у 10, 47 и 87% эмбрионов временных классов 5, 6 и 7, соответственно. Её экспрессия достигает максимума во временном классе 8, в это время она расположена в районе от 3 до 9% ДЭ (Рис. 8F, 10).

Экспрессия *gt* у нуль-мутантов по *Kr* и *Kr;kni*. Наиболее поразительной чертой экспрессии *gt* у эмбрионов *Kr*- является существенный сдвиг задней области экспрессии в антериорном направлении к позиции области экспрессии *kni*, намного превосходящий сдвиг этой области *gt* у эмбрионов дикого типа (Рис. 11Н-К, 22С, см. ниже). И у нуль-мутантов по *Kr* и у двойных мутантов *Kr;kni* эта область шире, чем у эмбрионов дикого типа, но она так же сужается в ходе цикла 14А (Табл. 2). Более того, уровень экспрессии в этой области значительно ниже, чем у дикого типа (Рис. 11Н-К, N, O). Максимальный уровень составляет примерно 50% от такового у эмбрионов дикого типа, при этом экспрессия еще больше снижается начиная с временного класса 4. К началу гастрюляции постериорная экспрессия *gt* падает до уровня, наблюдаемого в начале цикла 14А, и в это время ее уровень так же низок, как у постериорной области экспрессии *kni* (Рис. 11, 12В, С), (Surkova et al., 2013).

Экспрессия *gt* в антериорной области у нуль-мутантов по *Kr* и *Kr;kni* менее интенсивна, чем у эмбрионов дикого типа, особенно в раннем и позднем цикле 14А (Рис. 11).

Интересным является то, что эта область не расширяется в постериор-

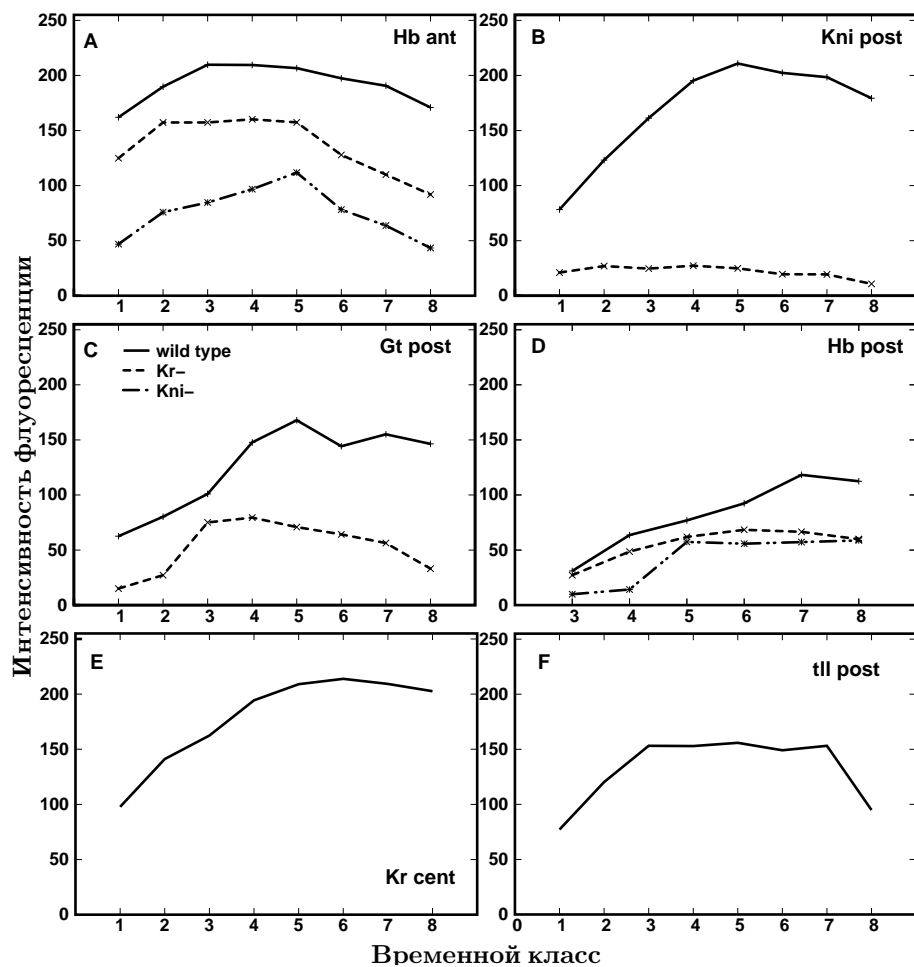


Рис. 12: Временная динамика усредненных значений максимальных уровней экспрессии генов *gar* у эмбрионов дикого типа (wild type) и нуль-мутантов по генам *Kr* и *kni* в цикле 14А. Антериорные, центральные и постериорные области экспрессии генов обозначены, соответственно, как “ant”, “cent” и “post” (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013).

ном направлении у эмбрионов *Kr*⁻, как сообщалось ранее (Kraut and Levine, 1991a,b) (см. Обзор литературы). Нами обнаружено, что как у эмбрионов *Kr*⁻, так и у эмбрионов *Kr;kni*⁻ А–П позиция постериорной границы антериорной области *gt* почти не изменена относительно таковой у эмбрионов дикого типа (Рис. 11 и Табл. 1), (Surkova et al., 2013).

Интегрированный паттерн экспрессии *gt* у одиночных мутантов по *Kr* во временных классах 4–7 практически совпадает с таковым у двойных мутантов по *Kr;kni*. Единственным небольшим различием является форма второй антериорной области (Рис. 11I,J). Это, скорее всего, связано с небольшой вариабельностью Д–В ориентации эмбрионов, выбираемых для сканирования на конфокальном микроскопе, т.к. экспрессия в этой области меняется

в Д–В направлении.

3.3.3 *Krüppel*

Экспрессия *Kr* у эмбрионов дикого типа. В цикле дробления 12 у двух из восьми эмбрионов, меченых на экспрессию *Kr*, обнаружен низкий уровень экспрессии в районе 35–70% ДЭ. В цикле 13 экспрессия *Kr* наблюдалась уже у всех проанализированных эмбрионов (Рис. 8С).

В цикле 14А *Kr* экспрессируется в виде области, имеющей границы примерно от 44 до 62.5% ДЭ во временном классе 1, и от 43 до 57% ДЭ во временном классе 8 (Рис. 8С). Экспрессия в этой центральной области крайне вариабельна в период ее интенсивного роста в цикле 13 и начале цикла 14А, но со временем эта вариабельность существенно уменьшается (Рис. 9В,С), (Surkova et al., 2008a).

Уровень экспрессии *Kr* возрастает до временного класса 6 и после этого убывает (Рис. 12Е).

Во временных классах 3–5 в антериорно-дорсальном (головном) районе появляется вторая область экспрессии *Kr* (Jacob et al., 1991). Она обнаруживается в районе 7–16% ДЭ у 13, 56 и 80% всех эмбрионов, принадлежащих к временным классам 3, 4 и 5, соответственно (Рис. 10 и 8С). Начиная с временного класса 6 эта область обнаруживается у всех эмбрионов нашего набора данных. Уровень экспрессии *Kr* в этой области намного ниже, чем в центральной.

Во временном классе 7 низкий уровень экспрессии *Kr* появляется в постериорной области примерно в районе 92–97% ДЭ (Рис. 8С). Экспрессия *Kr* в этой области ранее была описана на уровне мРНК (Knipple et al., 1985).

Экспрессия *Kr* у нуль-мутантов по *kni*. Форма и А–П позиция центральной области экспрессии *Kr* у нуль-мутантов по *kni* почти такие же как у эмбрионов дикого типа (Рис. 13А,В и Табл. 1), это противоречит ранее опубликованным данным о постериорном расширении этой области у эмбрионов *kni*- (Jackle et al., 1986, Gaul and Jackle, 1987) (см. Обзор ли-

температуры). Совпадение позиций области экспрессии *Kr* у нуль-мутантов и эмбрионов дикого типа показано на рисунке 13В (Surkova et al., 2013).

Во временном классе 7 уровень экспрессии *Kr* у мутантов по *kni* снижен до 75% от такового у эмбрионов дикого типа (Рис. 13А). Это снижение наиболее очевидно в ранних и поздних временных классах.

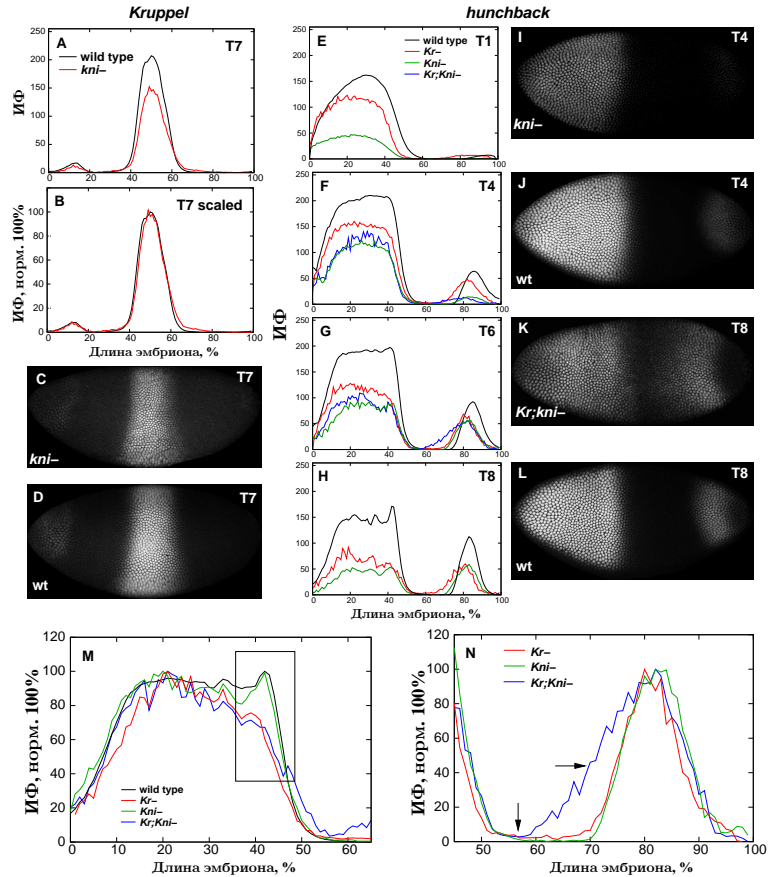


Рис. 13: Временная динамика экспрессии *Kr* и *hb* у мутантов в сравнении с эмбрионами дикого типа (wild type). Интегрированные паттерны экспрессии *Kr* (А) и *hb* (Е–Н) показаны для обозначенных временных классов (Т) цикла 14А. (В) Интенсивность флуоресценции паттернов *Kr* у эмбрионов дикого типа и *kni*⁻, показанных на панели (А), нормирована на максимальный уровень (ИФ, норм) для возможности сравнения А–П позиций областей. На (С, D) и (I–L) показаны типичные конфокальные изображения эмбрионов, меченых на экспрессию *Kr* и *hb* соответственно. (М) Дефекты формирования полосы PS4 *hb* (Wu et al., 2001) у эмбрионов *Kr*⁻ и *Kr;kni*⁻ в сравнении с эмбрионами *kni*⁻ и эмбрионами дикого типа. Усредненная anteriорная экспрессия *hb* во временном классе 7 нормирована на максимальный уровень экспрессии. Район полосы PS4 обведен рамкой. (N) Постериорная экспрессия *hb* во временном классе 6 нормирована на максимальный уровень экспрессии, чтобы показать, что anteriорная граница этой области становится пологой у мутантов *Kr;kni*⁻. Пологая anteriорная граница и локализованный район репрессии показаны, соответственно, горизонтальной и вертикальной стрелками.

3.3.4 *hunchback*

Экспрессия *hb* у эмбрионов дикого типа. В циклах дробления 10 и 11 белок Нб формирует низкий градиент с максимумом в передней части эмбриона (не показано). В цикле 12 уровень экспрессии возрастает, и к началу цикла 14А градиент Нб становится менее пологим и антериорная область экспрессии *hb* отделяется от переднего полюса эмбриона. Во временном классе 2 антериорная область экспрессии *hb* приобретает более округлую форму (Рис. 8G).

В дальнейшем, во временных классах 3–4 она становится плоской в верхней части, что сопровождается увеличением угла наклона задней границы (Рис. 8G). В это время уровень экспрессии *hb* достигает максимума (Рис. 12А). К концу цикла 14А уровень экспрессии *hb* в передней области понижается, и очевидно появление нескольких дополнительных областей экспрессии: одной нечетко обозначенной области в районе 15–30% ДЭ и двух пиков в областях 32–35% ДЭ и 41–44% ДЭ (Рис. 8H). Последний известен как “полоса парасегмента 4” (PS4 stripe) (Wu et al., 2001).

Формирование задней области экспрессии *hb* начинается в цикле 13. Во временном классе 2 она начинает отделяться от заднего полюса эмбриона, и примерно у половины эмбрионов, принадлежащих к этому временному классу, *hb* образует колоколообразную область экспрессии с максимумом в 87–88% ДЭ (Рис. 8G). Во временном классе 3 она полностью отделяется от заднего полюса эмбриона и имеет ширину 12.2 % ДЭ с максимумом в 86.5 % ДЭ. К концу цикла 14А задняя область экспрессии *hb* сужается до 10.2 % ДЭ и смещается в антериорном направлении к 84.3 % ДЭ (Табл. 1 и 2).

В отличие от передней области экспрессии, уровень экспрессии в задней области постепенно увеличивается до временного класса 7 и понижается только в конце цикла 14А (Рис. 12D), (Surkova et al., 2008a).

Обл.экспр./ Врем.группа	Gt WT	Gt <i>Kr</i> -	Gt <i>Kr;kni</i> -	Hb WT	Hb <i>Kr</i> -	Hb <i>Kr;Kni</i> -
2	12.0	16.9	-	12.2	12.9	-
4	9.4	14.0	14.7	10.2	10.9	14.9

Таблица 2: Временные изменения в ширине постериорных областей экспрессии генов *gt* и *hb* у эмбрионов *Kr*- и *Kr;kni*- в сравнении с эмбрионами дикого типа (WT) для временных групп 2 и 4 (Surkova et al., 2013).

Экспрессия *hb* у нуль-мутантов по *Kr*, *kni* и *Kr;kni*. Как и в случае экспрессии *Kr* у нуль-мутантов по *kni*, у эмбрионов, мутантных по *Kr*, *kni* и *Kr;kni*, позиция антериорной области экспрессии *hb* не меняется в сравнении с диким типом (Табл. 1). Это, вместе с описанными выше результатами об отсутствии постериорного расширения антериорной области экспрессии *gt* у мутантов, показывает, что средние значения позиций антериорных и центральных областей экспрессии более устойчивы к влиянию мутаций, чем предполагалось ранее (Surkova et al., 2013).

Как упоминалось ранее, формирование полосы парасегмента 4 (PS4) является отличительной чертой антериорной экспрессии *hb* в конце цикла 14А. Мы обнаружили, что у большей части эмбрионов, мутантных по *Kr* и *Kr;kni*, в позднем цикле 14А эта полоса отсутствует и «верхняя» часть области экспрессии *hb* более сглажена по сравнению с диким типом (Рис. 13М). Это подтверждает более ранние наблюдения, что мутация в гене *Kr* влияет на формирование полосы PS4 (Hulskamp et al., 1994, Wu et al., 1998) (см. Обзор литературы). Однако анализ экспрессии у индивидуальных эмбрионов показывает, что у мутантов эта полоса формируется намного раньше, чем у эмбрионов дикого типа, во временных классах 2–3, а к концу цикла 14А убывает.

Уровень экспрессии *hb* в антериорной области у нуль-мутантов ниже, чем у эмбрионов дикого типа. Самый низкий уровень обнаруживается у мутантов по *kni* и двойных мутантов *Kr;kni* (Рис. 13Е-Н). У мутантов по *kni* антериорная область быстро растет до временного класса 5, а затем

убывает до уровня, обнаруживаемого в начале цикла 14А. У мутантов по *Kr* уровень антериорного *Nb* в целом имеет такую же временную динамику, как у эмбрионов дикого типа, только его убывание в конце цикла 14А выражено сильнее (Рис. 12А).

Постериорная область экспрессии *hb* у эмбрионов *kni*-формируется только во временном классе 3, примерно на 13 минут позже, чем у мутантов по *Kr* и эмбрионов дикого типа. Несмотря на позднее появление, у мутантов и по *kni*, и по *Kr* эта область перестает расти или начинает убывать начиная с середины цикла 14А, т.е. раньше, чем у эмбрионов дикого типа (Рис. 12D). У двойных мутантов *Kr;kni* уровень постериорной экспрессии *hb* также низок, как у мутантов по *kni* (Рис. 13F,G). И у мутантов по *Kr*, и у мутантов по *kni* максимум постериорной области экспрессии *hb* расположен примерно на 3% ДЭ ближе к переднему концу эмбриона, чем у эмбрионов дикого типа (Табл. 1). У мутантов по *Kr* размер этой постериорной области такой же как у эмбрионов дикого типа как в раннем, так и в позднем цикле 14А (Табл. 2).

Напротив, у двойных мутантов *Kr;kni* постериорная область экспрессии *hb* на 4% ДЭ шире, т.к. её антериорная граница, в отличие от эмбрионов дикого типа и одиночных мутантов, образует пологий градиент (Табл. 2 и Рис. 13N), (Surkova et al., 2013).

3.3.5 *tailless*

Экспрессия *tll* у эмбрионов дикого типа. Мы впервые обнаруживаем экспрессию *tll* в постериорной области в цикле дробления 13, однако появление передней области экспрессии наблюдается только во временном классе 1 цикла 14А (Рис. 8I).

В ходе временных классов 1 и 2 уровень и антериорной и постериорной экспрессии *tll* резко увеличивается. После этого экспрессия в передней области остается постоянной до конца цикла 14А, с падением во временном классе 8. Экспрессия в задней области является более интенсивной, но её

динамика следует той же тенденции. С цикла 13 по временной класс 3 уровень экспрессии в задней области возрастает почти в пять раз, а после этого остается на одном и том же уровне до временного класса 7, а затем резко снижается во временном классе 8 (Рис. 8I, 12F), (Surkova et al., 2008a).

Максимумы антериорной и постериорной областей экспрессии *tll* имеют А–П координаты, соответственно, 16 и 92% ДЭ, которые практически не меняются со временем.

3.4 Гены *pair-rule*

Динамика экспрессии генов *pair-rule* гораздо более сложная, чем у материнских градиентов и генов *gap*, т.к. эти гены имеют большее количество областей экспрессии. Эти области, или полосы, имеют сложную динамику изменения во времени и характер этих изменений является разным у разных генов *pair-rule*.

В этом разделе для каждого гена показаны примеры изображений картин экспрессии у индивидуальных эмбрионов, а также динамика изменения интегрированного паттерна во времени параллельно с вариабельностью одномерных картин экспрессии у индивидуальных эмбрионов того же временного класса.

Несмотря на значительную вариабельность характера формирования полос экспрессии генов *pair-rule*, в целом, образование полос происходит тремя способами (Рис. 14). Первый способ - это деление, когда формирование новых полос происходит путем деления ранее существующей области экспрессии (Рис. 14А). К примеру, таким образом происходит формирование полос 5 и 6 гена *eve*. Второй способ - когда новая полоса формируется на границе ранее образованной полосы, как в случае с 4-й полосой *h* (Рис. 14В). Третий способ - это образование полосы *de novo*, примером которого может служить образование полосы 7 *odd* в задней части эмбриона, непосредственно за областью, где уже ранее сформировались полосы 1–6 (Рис. 14С). Эта классификация будет в дальнейшем использована при описании

картин экспрессии генов *pair-rule* (Surkova et al., 2008a).

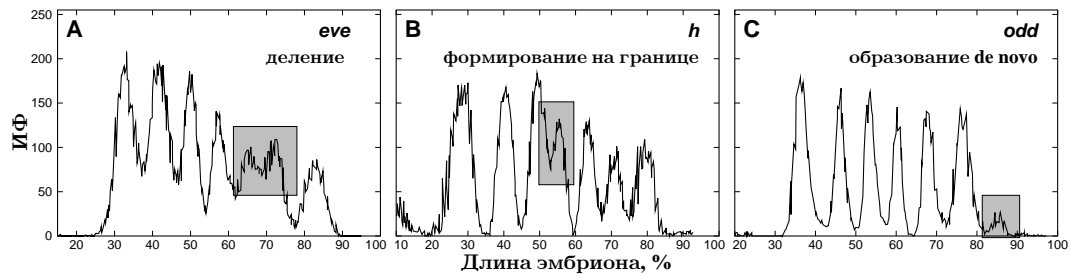


Рис. 14: Три типа формирования полос экспрессии генов *pair-rule*: (А) деление, (В) формирование на границе, (С) образование *de novo*. Серыми прямоугольниками обозначены области, где формируется новая полоса.

3.4.1 *even skipped*

Экспрессия *eve* в эмбрионах дикого типа

Впервые мы обнаруживаем белок Eve в цикле деления 12, это согласуется с ранее опубликованными данными (Frasch et al., 1987). Однако Манфред Фраш и др. показывали, что Eve в это период имеет равномерное распределение внутри эмбриона. После удаления фона нами обнаружено, что в ранних эмбрионах *eve* экспрессируется в виде широкой области от 28 до 52% ДЭ с максимумом примерно в 40% ДЭ (Рис. 15А). Подобная форма картины экспрессии, в целом, сохраняется в цикле 13 и временном классе 1 цикла 14А, однако концентрация Eve со временем возрастает (Рис. 15А).

Во временном классе 2 на интегрированном паттерне *eve* обнаруживаются 3 отдельные области экспрессии (Рис. 15В). При этом область 2, которая во временных классах 2–3 делится на полосы 4, 5 и 6, наиболее вариабельна у индивидуальных эмбрионов (Рис. 9D). В случае генов *gap*, вариабельность паттернов в процессе их формирования по большей части касается вариабельности уровней экспрессии (Рис. 9В), в то время, как у картин экспрессии генов *pair-rule* наблюдается также сильный разброс пространственной формы паттернов (Surkova et al., 2008a).

У всех эмбрионов из временного класса 2 присутствовала полоса 1, у 54% эмбрионов были обнаружены признаки полосы 2, у 34% была обнаружена

полоса 3, у 27% - полоса 4, в то время, как полосы 5 и 6 были обнаружены менее, чем у 6% эмбрионов из временного класса 2 (Рис. 18).

Во временном классе 3 происходит интенсивное формирование полос, уже присутствуют 6 ярко выраженных пиков экспрессии (Рис. 15В). Полосы 5 и 6 еще не до конца разделены и наблюдается существенная вариабельность между индивидуальными картинами экспрессии (Рис. 9D).

Начиная с временного цикла 5 полосы экспрессии *eve* приобретают более четкую форму и в результате образуется классический паттерн из семи полос (Рис. 15С), хотя уровень экспрессии полос 5 и 6 остается ниже, чем у других полос вплоть до временного класса 7 (Рис. 19А).

В поздних временных классах вариабельность формы паттернов у индивидуальных эмбрионов намного снижается (Рис. 9Е), На рисунке 15С видно, что полосы в задней части эмбриона со временем смещаются в А–П направлении (Surkova et al., 2006a). С приближением начала гаструляции уровень экспрессии в полосах *eve* перестает увеличиваться, а у некоторых полос (например, полосы 2) уменьшается (Рис. 19А, 15С).

Во временном классе 8 некоторые полосы *eve* становятся асимметричными, при этом задняя часть полос более пологая, чем передняя. Это предзнаменует формирование поздних узких полос *eve* с максимумами в антериорной части каждого презумптивного парасегмента, наблюдаемых в начале гаструляции (Fujioka et al., 1995, Jaynes and Fujioka, 2004). Наши измерения показывают, что в конце цикла 14А эта асимметрия сильнее выражена в задней части эмбриона (Табл. 3), (Surkova et al., 2008a).

Полоса	1	2	3	4	5	6	7
Степень асимметрии	1.2	1.2	1.1	1.2	1.3	1.4	1.8

Таблица 3: Степень асимметрии полос *eve* во временном классе 8 у эмбрионов дикого типа. Каждое значение равняется расстоянию между пиком полосы и постериорным минимумом, поделенное на расстояние между пиком и антериорным минимумом.

Экспрессия *eve* у нуль-мутантов

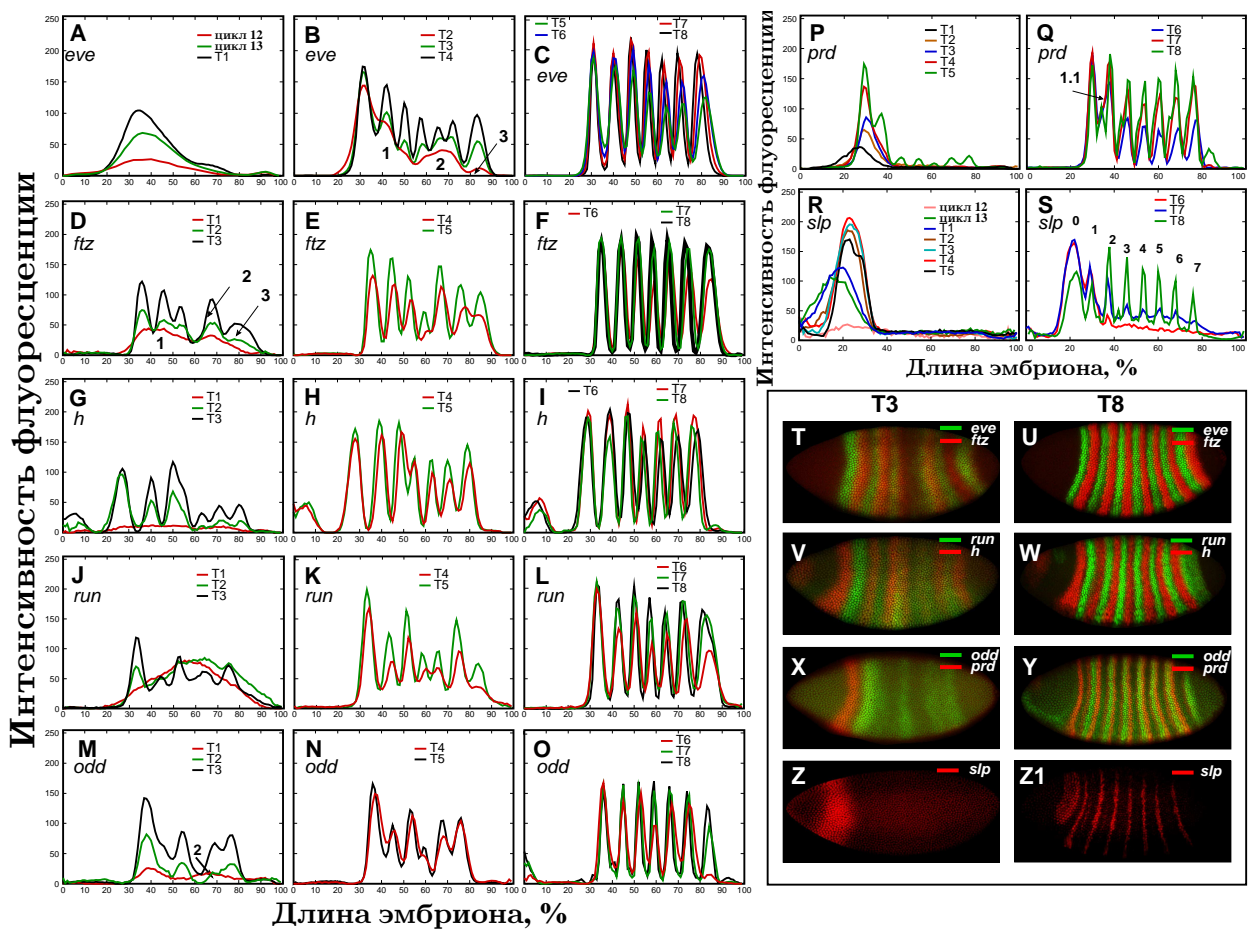


Рис. 15: Временная динамика экспрессии генов pair-rule у эмбрионов дикого типа. Одномерные интегрированные паттерны экспрессии *eve* (A–C), *ftz* (D–F), *h* (G–I), *run* (J–L), *odd* (M–O), *prd* (P,Q) и *slp* (R–S) показаны для циклов деления ядер (cycles 12–13) и временных классов (time classes) цикла 14A. Цифрами на (B) и (D) отмечены три временных области экспрессии соответственно *eve* и *ftz* во временном классе 2. Типичные конфокальные изображения экспрессии этих генов в индивидуальных эмбрионах, принадлежащих временным классам 3 (T3) и 8 (T8) показаны на панелях T–Z1. Экспрессия разных генов в одном и том же индивидуальном эмбрионе показана разными цветами, обозначенными в подписи на каждой панели (Surkova et al., 2008a).

Локализованное влияние нуля-мутации по *kni*. В целом, изменения в картине экспрессии *eve*, вносимые нуля-мутацией в гене *gar kni*, имеют локальный характер и ограничены областью, в которой у дикого типа формируются полосы 4–6 («область 4-6»). Эта область примерно соответствует территории, контролируемой геном *kni*, который устанавливает внутренние границы полос 4 и 6 при высокой концентрации и внутренние границы полос 3 и 7 при крайне низкой концентрации (Clyde et al., 2003). Интересным является то, что внутренние границы полос 3 и 7 у нуля-мутантов по *kni* все равно формируются, несмотря на то, что *Kni* полностью отсутствует (Рис.

5A2-D2), (Surkova et al., 2013).

У мутантов по *kni* формирование полос *eve* значительно задерживается по сравнению с эмбрионами дикого типа и начинается только во временных классах 3–4 (Рис. 5W1-Z1). Во временном классе 5 формируются полосы 1–3 и 7, но минимумы экспрессии между полосами выражены меньше, чем у эмбрионов дикого типа. Полосы 4–6 слиты вместе, но уровень экспрессии в этой области остается высоким (Рис. 5A2). Полоса 7 динамически сдвигается со временем в anteriорном направлении, как и у эмбрионов дикого типа (см. следующую главу).

После временного класса 5, когда все полосы сформированы, форма паттерна *eve* остается практически неизменной. Единственной динамически меняющейся во времени чертой является уменьшение экспрессии в области 4–6 перед гастрულიцией (Рис. 5S1-V1, A2-D2).

Нелокализованное влияние нуль-мутации по *Kr*. У эмбрионов, мутантных по *Kr*, 7-ми полосный паттерн *eve* существенно изменен (Frasch and Levine, 1987, Warrior and Levine, 1990, Kraut and Levine, 1991a), помимо этого, он характеризуется сложным динамическим развитием во времени, как показано ниже.

В отличие от эмбрионов дикого типа, где ранний паттерн *eve* образует А–П градиент с максимумом в позиции будущей полосы 1, у мутантов по *Kr* во временном классе 1 этот паттерн имеет более крутую постериорную границу (Рис. 5Y, G1). Как у эмбрионов дикого типа, полоса 7 формируется во временном классе 2 и сдвигается на существенное расстояние в anteriорном направлении в течение цикла 14А. Это приводит к сжатию паттерна *eve* с течением времени (Рис. 16H), (Surkova et al., 2013).

Форма полос 1 и 7 не меняется в течение всего цикла 14А. Остальные полосы 2–6 объединены в две большие области экспрессии, «область 2–3» и «область 4–6» (Рис. 5J1-L1). Во временном классе 4 эти области начинают делиться а потом расти, при этом оставаясь слитыми у основания.

В это время мы наблюдаем, что территория паттерна *eve*, затронутая

мутацией в гене *Kr*, имеет протяженность с 37 по 74% ДЭ (Рис. 5J1) и захватывает полосы 2–6. Однако известно, что *Kr* устанавливает внутренние границы полос 2 и 5 (Small et al., 1991, Stanojevic et al., 1991, Fujioka et al., 1999). Это предполагает, что существенные изменения паттерна *eve* у ноль-мутантов по *Kr* по большей части определяются измененной экспрессией других генов, а именно, *gt* и *kni* у этих мутантов (см. выше).

Во временных классах 5 и 6 разделение области 4–6 наиболее выражено в вентральной части эмбриона, тогда как полосы остаются слитыми дорсально и латерально (Рис. 5C1,D1). Интегрированные паттерны показывают, что уровень экспрессии *eve* выше в постериорной части каждой из широких областей (2–3 и 4–6) (Рис. 5K1,L1).

Во временных классах 7 и 8 антериорная часть области 4–6 постепенно исчезает, а постериорная растет и сужается. К концу цикла 14А у мутантов по *Kr* полосы 2 и 3 разделяются путем формирования минимума экспрессии в латерально–вентральной части эмбриона (Рис. 5F1,N1).

Экспрессия у гетерозигот: динамическая трансформация формы паттернов от мутантной к дикому типу. Эмбрионы, гетерозиготные по генам сегментации, являются важным материалом для изучения вариабельности и канализации развития. Уменьшение дозы гена в два раза приводит почти к такому же снижению уровня экспрессии гена (Рис. 16А). Однако этот измененный молекулярный фенотип, как правило, не приводит к изменению в кутикулярном фенотипе личинок. Ген *Kr* представляет особый интерес, т.к. канализация у гетерозигот по *Kr* неполная, т.к. у личинок *Kr+ / Kr-* наблюдаются незначительные, но легко обнаруживаемые кутикулярные дефекты (Wieschaus et al., 1984). По этим причинам был произведен анализ экспрессии генов у гетерозигот *Kr+ / Kr-* и *kni+ / kni-*.

Нами обнаружено, что в целом форма и размер раннего паттерна *eve* у гетерозигот по *Kr* сходны с таковыми у ноль-мутантов, тогда как поздние паттерны *eve* более сходны с паттернами дикого типа. Как и в случае гомозиготных мутантов по *Kr*, у *Kr+ / Kr-* гетерозигот, принадлежащих к

временному классу 3, область слитых полос 4–6 и полоса 7 имеют заниженную экспрессию и сдвинуты к переднему концу эмбриона (Рис. 16В). Однако в середине цикла 14А все семь полос отделяются друг от друга, хотя полосы 3–5 все еще более низкие, чем у эмбрионов дикого типа. К концу цикла 14А экспрессия во всех полосах достигает высокого уровня, хотя полосы 3–5, расположенные в заниженной центральной области экспрессии *Kr*, остаются более узкими (Рис. 16С).

Мы не обнаружили расширения полосы 2 *eve*, о котором сообщалось в более ранних работах (Wagrior and Levine 1990) (см. Обзор литературы). На рисунке 16D показано, что ширина этой полосы такая же, как у эмбрионов дикого типа.

У эмбрионов дикого типа и нуль-мутантов по *Kr* формирование полос *eve* сопровождается динамическим сжатием паттерна экспрессии (Рис. 16H). У гетерозигот в раннем цикле 14А паттерн *eve* сжат, как в случае нуль-мутантов, но к началу гаструляции он имеет почти такую же ширину, как у эмбрионов дикого типа.

У гетерозигот по *kni* полоса 5 *eve* полностью отсутствует до временного класса 5, но начиная с этого момента и до гаструляции она практически достигает уровня, наблюдаемого у эмбрионов дикого типа (Рис. 17). Тем не менее, эта полоса остается уже чем остальные полосы, аналогично полосам 3–5 у гетерозигот по *Kr* (Рис. 16F, 17D). Таким образом, у гетерозигот по *kni* дефекты паттерна *eve* более локализованы, чем у гетерозигот по *Kr*. Это в какой-то мере сходно с влиянием нуль-мутаций в генах *Kr* и *kni* на экспрессию *eve*.

3.4.2 *fushi tarazu*

Впервые экспрессия *ftz* обнаруживается в цикле 13. Несмотря на то, что присутствует существенная вариабельность индивидуальных паттернов, в среднем, низкий уровень экспрессии обнаруживается в пределах области, расположенной примерно от 32 до 78% ДЭ. Нестабильный характер экс-

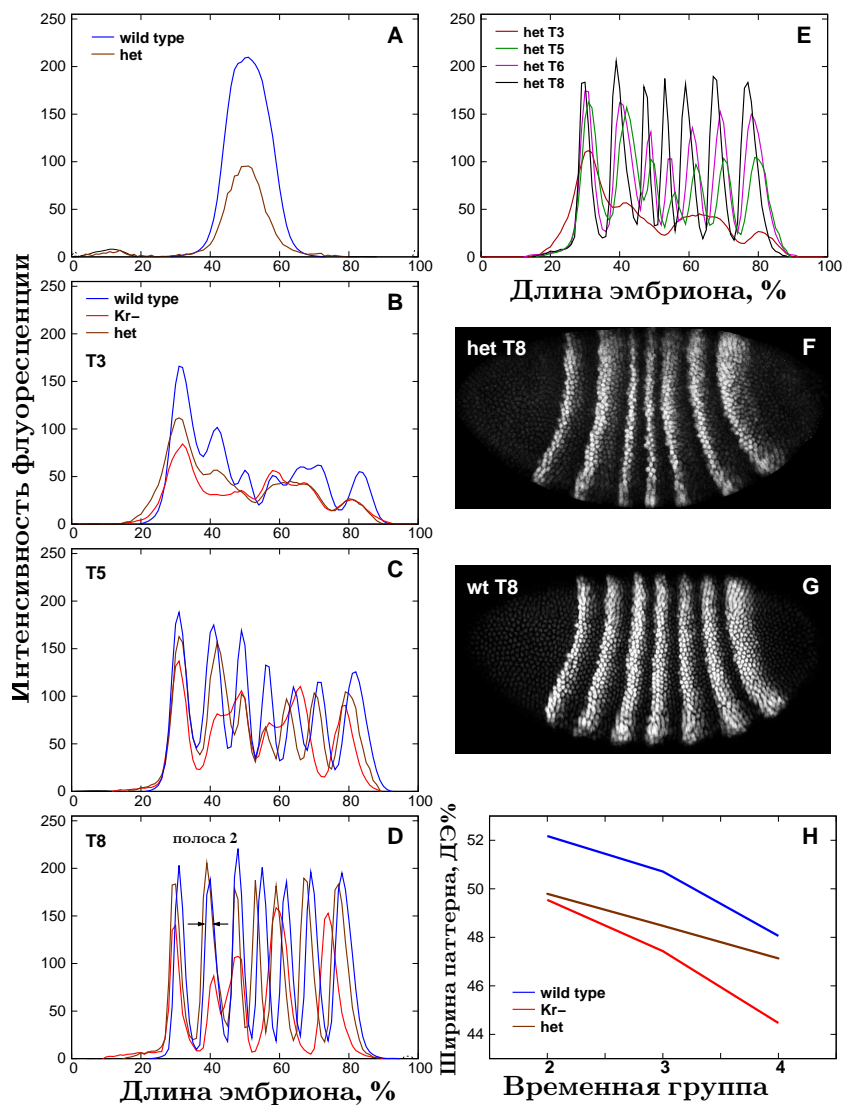


Рис. 16: Экспрессия генов у гетерозигот Kr^+/Kr^- ("het"). (A) Интегрированный паттерн экспрессии Kr у эмбрионов дикого типа (wild type) и гетерозигот из временного класса 6. (B–D) Сравнение экспрессии eve у эмбрионов дикого типа, Kr^+/Kr^- и Kr^- . (E) Динамика экспрессии eve у гетерозигот. (F,G) Типичные конфокальные изображения экспрессии eve у индивидуальных гетерозиготных эмбрионов и эмбрионов дикого типа (H) Динамические изменения ширины паттерна eve у эмбрионов Kr^+/Kr^- и Kr^- в цикле 14A. Ширина паттерна рассчитывалась как разность между средними А–П позициями максимумов полос 7 и 1 (% ДЭ).

прессии сохраняется до временного класса 1. У некоторых эмбрионов обнаруживаются две области экспрессии, одна в районе от 43 до 52% ДЭ, другая – от 64 до 77% ДЭ. Уровень экспрессии ftz в это время составляет примерно пятую часть того, который наблюдается в конце цикла 14A перед началом гастрюляции (Рис. 15D,F).

В ходе временного класса 2 обнаруживаются три большие области экспрессии, это наиболее динамичный период экспрессии ftz . Из первой области

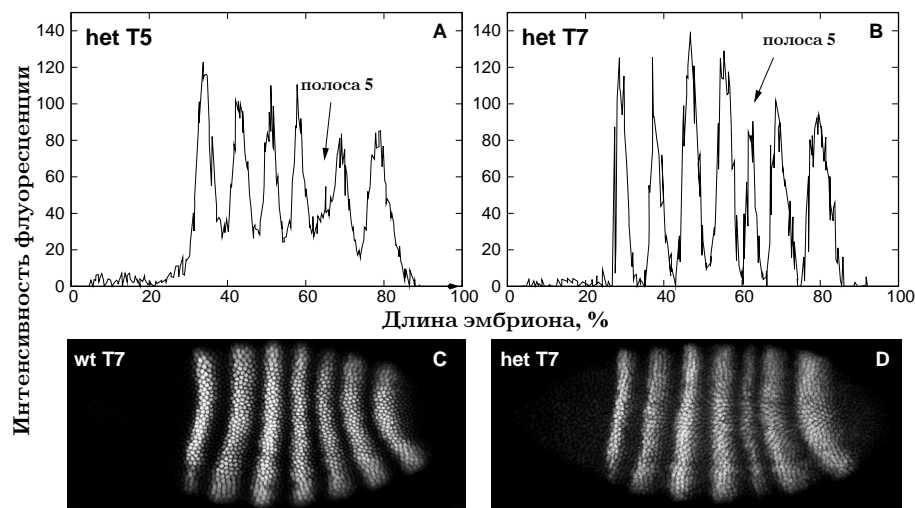


Рис. 17: Экспрессия *eve* у эмбрионов, гетерозиготных по *kni* (“het”). Одномерные картины экспрессии у двух индивидуальных эмбрионов, принадлежащих к временным классам 5 и 7 показывают позднее появление (A), но быстрый рост (B) полосы 5. (C,D) Конфокальные изображения экспрессии *eve* у эмбриона дикого типа (wt) из временного класса 7 и эмбриона, гетерозиготного по *kni*, показанного на рисунке (B).

формируются полосы 1,2 и 3, из области 2 – полоса 5, а из области с очень низким уровнем экспрессии в задней части эмбриона (области 3) в дальнейшем образуются полосы 6 и 7 (Рис. 15D). Во временном классе 2 область 2 сформирована у всех эмбрионов, у 88% эмбрионов есть полоса 1, а полосы 2 и 3 (в области 1) разделились у 62% всех эмбрионов. Наблюдается сильная вариабельность паттернов у индивидуальных эмбрионов - у некоторых сформированы только полосы 1 и 5, но есть и эмбрионы, у которых уже различимы все полосы, за исключением 6 и 7 (Рис. 18).

Во временном классе 3 полосы *ftz* приобретают более четкую форму и вариабельность между индивидуальными паттернами уменьшается (Рис. 15D). У всех эмбрионов этого временного класса есть полосы 1, 2, 3 и 5, но в остальных областях экспрессия достаточно слабая. Полоса 4 обнаружена у 19% эмбрионов, в то время как полосы 6 и 7 разделяются только в 4.8% случаев. Однако уже во временном классе 4 полоса 4 сформирована у 80% всех эмбрионов, а разделение полос 6 и 7 происходит примерно у 50% всех паттернов (Рис. 18).

Во временном классе 5 уже четко различимы 7 полос *ftz* (Рис. 15E). В этот период уровень экспрессии *ftz* в области полос 6 и 7 намного выше, чем

у полосы 4. Полоса 4 остается самой низкой вплоть до временного класса 7. Во временном классе 7 все полосы экспрессии *ftz* полностью формируются и имеют примерно одинаковый уровень экспрессии (Рис. 15F, 19C), (Surkova et al., 2008a).

В заключение хочется отметить существенные различия в формировании паттернов экспрессии генов *eve* и *ftz*, которые выражаются в последовательности и времени формирования полос, а также характере их роста. Это наблюдение имеет важное значение, так как известно, что именно уровни относительных концентраций продуктов экспрессии *eve* и *ftz* в цикле 14А определяют позиции границ будущих парасегментов (Fujioka et al., 1995, Hughes and Krause, 2001, Fujioka et al., 2002).

3.4.3 *hairy*

Белок Н не обнаруживается до начала цикла 14А, но даже во временном классе 1 этого цикла экспрессия *h* очень низкая и не намного превышает фон (Рис. 15G). После временного класса 1 экспрессия резко возрастает и во временном классе 2 полосы 1 и 2, а также область, из которой в дальнейшем формируется полоса 3, появляются у большинства эмбрионов (Рис. 18).

Уровень экспрессии первых трех полос остается намного выше, чем у других полос *h* вплоть до временного класса 7 (Рис. 19B). Антеродорсальный домен *h*, называемый также “нулевой полосой”, также образуется во временном классе 2 (Lardelli and Ish-Horowicz, 1993). Эта область экспрессии имеет зависимость от Д–В системы и на одномерном интегрированном паттерне расположена в районе от 0 до 10% ДЭ (Рис. 15G-I).

Во временном классе 3 начинается формирование полосы 4 на границе будущей полосы 3. В этот временной период деление этих полос очевидно у 16% всех эмбрионов. Помимо этого, у большинства эмбрионов в это время есть полосы 5, 6 и 7 (Рис. 18).

Во временном классе 4 все полосы экспрессии *h* уже появились, однако полоса 4 еще очень низкая (Рис. 15H). Анализ индивидуальных паттернов

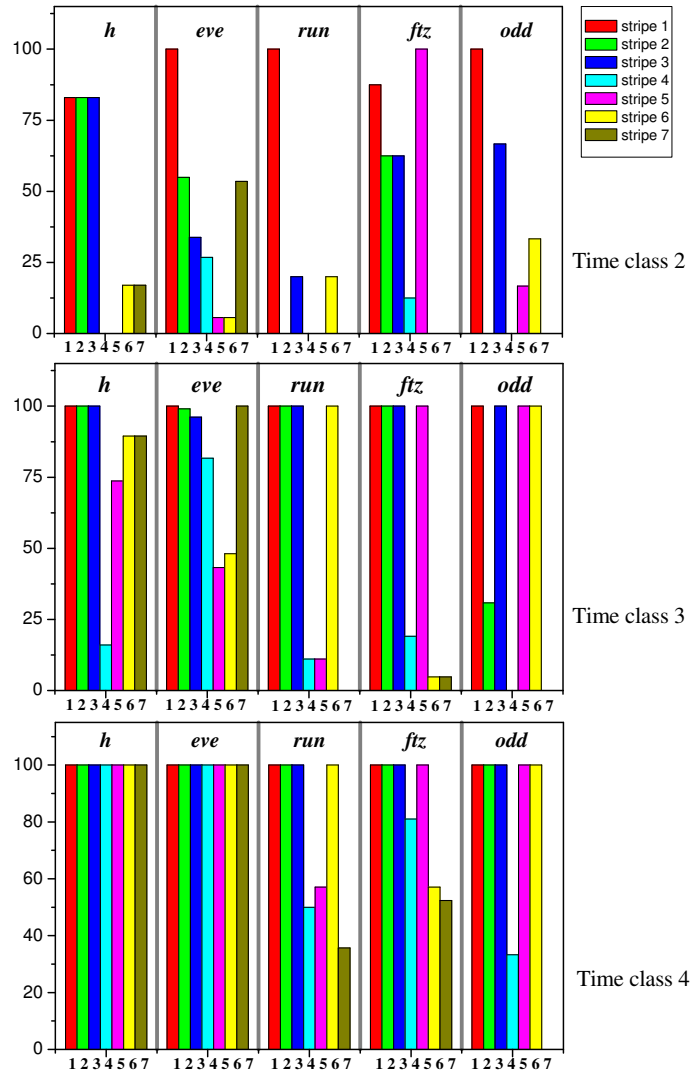


Рис. 18: Скорость формирования полос экспрессии генов pair-rule во временных классах (time class) 2, 3 и 4. Для каждого гена и временного класса показана гистограмма, демонстрирующая процент эмбрионов, у которых эта полоса сформировалась. Каждый столбец гистограммы обозначает определенную полосу экспрессии.

показывает, что и полоса 4, и полоса 3, из которой она сформировалась, крайне вариабельны по форме. Кроме того, уровень экспрессии полос 5, 6 и 7 тоже крайне вариабелен (Рис. 9F), (Surkova et al., 2008a).

Во временном классе 7 паттерн *h* полностью формируется, и к этому периоду вариабельность уровня экспрессии внутри полос резко снижается (Рис. 15I, 9G). Во временном классе 8 уровень экспрессии *h* во всех полосах начинает снижаться. У полосы 2 это снижение особенно существенно, и у некоторых эмбрионов в конце цикла 14A эта полоса становится намного

ниже полос 1 и 3 (Рис. 19В).

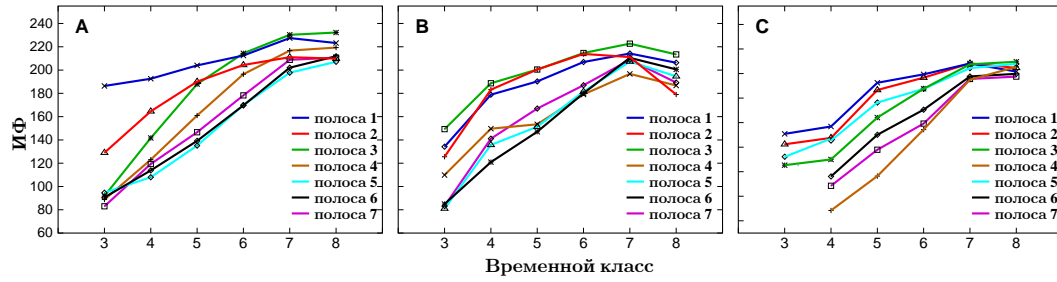


Рис. 19: Динамика изменения уровней экспрессии полос генов pair-rule во времени. (А) *eve*, (В) *h*, (С) *ftz*; каждая кривая соответствует индивидуальной полосе экспрессии, обозначенной на рисунке.

3.4.4 *run*

Во временном классе 1 цикла 14А *run* экспрессируется в виде одной широкой симметричной области с максимумом, расположенным в 50-60% ДЭ (Рис. 15J). Во временном классе 2 формируется полоса 1 в районе 30-37% ДЭ.

Временной класс 3 характеризуется очень быстрым переходом от экспрессии *run* в виде широкой области к формированию полос экспрессии. Широкая область экспрессии разделяется на четыре части, а именно, полосы 2, 3, 4+5 и 6. У 11% всех эмбрионов полосы 4 и 5 в этот период уже разделены (Рис. 18). Уровень экспрессии полос 1, 3 и 6 выше, чем у других полос, что является характерной чертой паттерна *run* вплоть до временного класса 6 (Рис. 15J,K), (Surkova et al., 2008a).

Во временном классе 4 полоса 7 формируется *de novo* примерно у 36% паттернов, а разделение полос 4 и 5 очевидно у 50% индивидуальных эмбрионов (Рис. 18). Во временном классе 6 уровень экспрессии *run* в разных полосах начинает выравниваться (Рис. 15L), но сохраняется существенная вариабельность уровня экспрессии в области полосы 7. В конце цикла 14А заметно, что эта полоса становится шире остальных полос и приобретает асимметричность (Рис. 15L).

Появление вторичных полос экспрессии *run* перед гастрულიацией (в промежутках между первичными полосами pair-rule) описано на уровне мРНК

(Gergen and Butler, 1988), однако мы не обнаружили их на уровне белка в этот период времени (Рис. 15L).

3.4.5 *odd skipped*

Несмотря на то, что ранее сообщалось, что мРНК *odd* не появляются до окончания цикла 13, мы обнаружили белок Odd у нескольких эмбрионов цикла 12 и у всех эмбрионов цикла 13. В эти периоды *odd* экспрессируется в виде широкой области, расположенной в районе примерно от 35 до 78% ДЭ. Во временном классе 1 экспрессия *odd* локализована в двух областях – в районе 34–47% ДЭ и 58–74% ДЭ, из которых в дальнейшем образуются, соответственно, полосы 1+3 и 5+6 (Рис. 15M).

Во временном классе 2 полоса 1 сформирована у всех эмбрионов, а полоса 3 обнаруживается у примерно 67% всех паттернов (Рис. 18). Во временном классе 3 начинается формирование полосы 2 на задней границе полосы 1. Во временном классе 4 полоса 4 начинает формироваться тем же способом примерно у 33% индивидуальных паттернов. Полоса 2 присутствует у всех эмбрионов, но имеет низкую интенсивность (Рис. 15M, 18), (Surkova et al., 2008a).

Во временном классе 5 примерно у 11% индивидуальных эмбрионов все еще нет полосы 4. В этот период начинает формироваться полоса 7, экспрессия в области этой полосы очень низкая и она наблюдается примерно в 6% индивидуальных паттернов (Рис. 15N).

Во временном классе 7 экспрессия в районе полосы 7 возрастает в несколько раз, однако все равно остается ниже, чем у других полос (Рис. 15O). К тому же, во временном классе 7 полосы *odd* сильно сужаются и между полосами обнаруживается очень низкая и переменная экспрессия. Это первый признак появления восьми вторичных полос *odd*. В течение временного класса 8 эти вторичные полосы формируются между первичными в передне–заднем направлении (Рис. 15O,Y).

Начиная с временного класса 6 обнаруживается передняя область экс-

прессии *odd*, который формирует узкую полосу, опоясывающую передние 20% вентральной части эмбриона (Рис. 15O,Y). Во временном классе 8 на задней границе переднего домена образуется узкая полоса, находящаяся под контролем А–П системы и опоясывающая эмбрион в районе формирования будущей головной борозды (Рис. 15Y). Характер экспрессии *odd* в передней части эмбриона некоторым образом схож с экспрессией *kni* в этой же области (Рис. 8P).

3.4.6 *paired*

Впервые низкий уровень экспрессии *prd* обнаружен нами у нескольких эмбрионов цикла деления 13, это соответствует ранее опубликованным данным (Gutjahr et al., 1993). Во временном классе 1 широкая anteriорная область экспрессии обнаруживается в районе 20-35% ДЭ. Интенсивность экспрессии в этой области увеличивается и она сужается до временного класса 4, когда на ее задней границе начинается формирование новой полосы (Рис. 15P).

Во временном классе 5 картина экспрессии *prd* претерпевает существенные изменения. У большинства эмбрионов на задней границе полосы 1 формируется полоса 2 и полосы 3–7 начинают практически одновременно формироваться *de novo*.

Во временном классе 6 у 2-х из 11-ти индивидуальных эмбрионов мы обнаружили формирование новой полосы (1.1) на передней границе полосы 2, которая является уже вторичной полосой, образующейся между первичными полосами *pair-rule* (Рис. 15Q). В этот период остальные вторичные полосы также начинают образовываться на передних границах всех первичных полос, за исключением полосы 1. Во временном классе 8 уровень экспрессии у первичных полос выравнивается, а интенсивность вторичных полос и полосы 8 увеличивается.

Таким образом, паттерн экспрессии *prd* уникален среди всех остальных генов *pair-rule* в том плане, что шесть вторичных полос образуются на пе-

редних границах первичных полос (Surkova et al., 2008a).

3.4.7 *sloppy-paired*

Экспрессия *slp* в эмбрионах дикого типа впервые обнаруживается в цикле деления 12, в этот период нами зафиксирована экспрессия в антериорной области (20% ДЭ) у 3-х из 12-ти эмбрионов. В цикле 13 и временных классах 1 и 2 эта антериорная область (0) отделяется от переднего полюса эмбриона, сужается и растет (Рис. 15R). Во временном классе 3 у некоторых эмбрионов она начинает делиться, это продолжается во временных классах 4 и 5, и заканчивается во временном классе 6. Ширина отделившейся полосы (1) примерно в два раза меньше ширины области 0 (Рис. 15R,S).

Остальные полосы *slp*, расположенные более постериорно по отношению к полосе 1, начинают формироваться *de novo* и также являются узкими. Во временном классе 7 у большинства эмбрионов уже присутствуют 6 полос *pair-rule*. Первыми формируются более антериорные полосы, а именно, 1, 2, 3 (Рис. 15S). Дополнительные вторичные полосы начинают появляться между первичными полосами *pair-rule*, и формирование этих вторичных полос происходит параллельно с формированием более постериорных полос *pair-rule*, которые образуются позже в постериорном конце эмбриона. К моменту начала гаструляции уровень экспрессии в полосе 0 снижается и к временному классу 8 она становится ниже всех остальных полос. Взаимное расположение полос 0 и 1 *slp* с антериорными областями экспрессии других генов сегментации показано на Рис. 10.

Таким образом, можно заключить, что *slp* имеет экспрессию, сходную с генами *gap*, в цикле 12–временном классе 4 цикла 14A, экспрессию *pair-rule* во временных классах 4–7, а экспрессию, сходную с генами *segment-polarity*, – во временном классе 8. Таким образом, несмотря на принадлежность *slp* к генам *pair-rule*, экспрессия этого гена ни в один из периодов времени не является классической экспрессией *pair-rule*. Полосы *pair-rule* формируются начиная с антериорного конца эмбриона и их уровень не выравнивается с

полосами, формирующимися на постериорном конце. Более того, вторичные полосы (segment-polarity) начинают образовываться раньше, чем заканчивается формирование первичных полос (pair-rule) (Surkova et al., 2008a).

3.5 Заключение по главе 3

3.5.1 Количественная экспрессия генов сегментации

В данной главе представлена впервые произведенная детальная характеристика экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа и мутантов по генам *gar*. В ранее опубликованных работах содержалась разрозненная информация об экспрессии отдельных генов, по большей части основанная на визуальной оценке изображений на определенной стадии развития.

В этой работе проделан комплексный анализ количественных данных по экспрессии генов, извлеченных из изображений, полученных с помощью конфокального микроскопа. Данные имеют временное разрешение от 6.5 до 13 минут развития и получены для каждого ядра эмбриона (см. главу 2), т.е. имеют пространственное разрешение в одно ядро. Специальный способ настройки микроскопа на максимальный уровень экспрессии каждого гена позволил впервые оценить динамику уровней экспрессии генов у эмбрионов дикого типа и мутантных. Помимо этого, в картинах экспрессии оценивались тип, время и последовательность формирования новых областей экспрессии, а также А–П позиции областей экспрессии.

Динамика экспрессии рассматривалась на основе усредненных, или интегрированных, картин экспрессии, и параллельно с этим для каждого временного класса анализировалась экспрессия у всех индивидуальных эмбрионов. Особое внимание уделено свойствам картин экспрессии, ранее не описанным в литературе, и позволяющим сделать новые выводы о возможных регуляторных взаимодействиях в рассматриваемой системе генов.

К примеру, до недавнего времени считалось, что мутация в гене *Kr* приводит к смещению постериорных границ антериорных областей экспрессии *hb* и *gt* в направлении заднего конца эмбриона, т.е. к территории отсутству-

ющего *Kr*. Аналогично было показано, что область экспрессии *Kr* смещается постериорно у нуль-мутантов по *kni* (Jackle et al., 1986, Warrior and Levine 1990, Hulskamp et al., 1994, Kraut and Levine, 1991a,b, Gaul and Jackle, 1987). Однако первые же полученные количественные данные показали, что мутация в гене *Kr* не меняет позиции антериорной области *hb* (Houchmandzadeh et al., 2002. В нашей работе этот результат подтвердился, и помимо этого было показано, что антериорный *gt* и *Kr* также не меняют своих позиций у мутантов по сравнению с эмбрионами дикого типа. Это демонстрирует, что пространственное положение областей экспрессии у антериорной части эмбриона более устойчиво к действию мутаций, чем считалось ранее. Таким образом, использование количественных данных может снять многие известные противоречия, возникающие при интерпретации данных по мутантам в генах сегментации (см. главу 1).

В данной работе впервые детально охарактеризована экспрессия на уровне белка таких генов pair-rule, как *odd*, *run* и *slp* для эмбрионов дикого типа. Это позволило сравнить временную динамику формирования полос у этих генов с другими генами pair-rule, а также провести детальный анализ позиционных сдвигов и пространственной вариабельности областей экспрессии, представленный в главах 4 и 5.

Детальный анализ экспрессии генов pair-rule *prd* и *slp* показал, что характер их экспрессии имеет принципиальное отличие от остальных генов pair-rule и заключается в формировании “вторичных” полос между “первичными” полосами pair-rule в ходе цикла 14А. Подобное явление также наблюдается у паттерна гена *odd* во второй половине цикла 14А. Это отражает роль этих генов в регуляторном каскаде, определяющем позиции полос segment-polarity – они регулируются другими генами pair-rule и при этом напрямую влияют на экспрессию гена *en* (Jaunes and Fujioka, 2004). Помимо этого формирование полос *prd* и *slp*, а также вторичных полос *odd*, происходит в предне – заднем направлении, т.е. более антериорные полосы формируются раньше. Аналогичный “временной градиент” характерен и для формирования ранних полос *en*, регулируемого этими генами (Karr et

al., 1989).

3.5.2 Особенности экспрессии *eve* у нуль-мутантов и гетерозигот в сравнении с таковой у эмбрионов дикого типа

У эмбрионов дикого типа и нуль-мутантов по гену *kni* наиболее существенные динамические изменения паттерна экспрессии *eve* происходят во время формирования полос.

Напротив, у эмбрионов, мутантных по гену *Kr*, экспрессия *eve* динамически меняется в течение всего цикла 14А. Более того, у этих мутантов существенные изменения затрагивают практически весь паттерн *eve*, а именно, полосы со 2 по 6. У эмбрионов дикого типа *Kr* устанавливает заднюю границу полосы 2 и переднюю границу полосы 5 (Small et al., 1991, Stanojevic et al., 1991, Fujioka et al., 1999). Поэтому очевидно, что нарушение формирования полосы 6 определяется измененной экспрессией других генов у нуль-мутантов по *Kr*, а именно, *gt* и *kni* (Рис. 11). Действительно, снижение экспрессии *gt* почти в два раза (Рис. 12С) может приводить к слиянию полос 5 и 6, как это наблюдается у гетерозигот по *gt* (не показано). Помимо этого, существенно заниженный уровень *kni* должен дополнительно влиять на уровень экспрессии полосы 5, как у эмбрионов, гетерозиготных по этому гену (Рис. 17). Эти изменения, совместно с влиянием мутации по *Kr* на anteriорную границу полосы 5 (Fujioka et al., 1999) могут быть причиной наблюдаемого формирования слитых полос 4–6 (Рис. 5К1-N1).

Интересным является то, что в конце цикла 14А пространственная позиция области экспрессии 4–6 совпадает с позициями совмещенных областей экспрессии *gt* и *kni* (Рис. 20), что предполагает сходные механизмы установления границ этих трех областей. В самом деле, у эмбрионов дикого типа внешние границы областей 4 и 6, так же, как и границы области экспрессии *kni*, устанавливаются Нб (Clyde et al., 2003). Более того, недавно было показано, что Нб отвечает за сдвиг постериорной области экспрессии *gt* к позиции *kni* у мутантов по *Kr* (Kozlov et al., 2012).

У нуль-мутантов по *kni* паттерн *eve* затронут в значительно меньшей степени и изменения выражаются только в отсутствии полос 4–6. В отличие от мутантов по *Kr*, эта территория как раз меньше той, которую должна затрагивать мутация по *kni*, так как у эмбрионов дикого типа *Kni* устанавливает внутренние границы полос 3–7 при низкой концентрации и полос 4–6 при высокой концентрации (Clyde et al., 2003). Интересно, что у мутантов внутренние границы полос 3 и 7, тем не менее, формируются (Рис. 5A2-D2), (Small et al., 1996). Это не может полностью объясняться репрессией со стороны генов *pair-rule* в конце цикла 14A, т.к. мы обнаруживаем полосу 3 *eve* в ранних временных классах 3 и 4 (Рис. 5Y1,Z1).

Постериорная граница полосы 3 устанавливается крайне низкими концентрациями *Kni* и требует высокой чувствительности энхансера 3+7 к этому транскрипционному фактору. Действительно, было показано, что он содержит много сайтов присоединения *Kni* (Struffi et al., 2011). Механизм репрессии ближнего действия, происходящей под влиянием *Kni*, в настоящее время интенсивно изучается. Недавно было показано, что *Kni* осуществляет локальные изменения уровня плотности и ацетилирования гистонов в энхансерах *eve* (Li and Arnosti, 2011). Парадоксально, что при этом задействован кофактор Groucho, который обычно является частью механизма репрессии не ближнего, а дальнего действия (Payankulam and Arnosti, 2009, Martinez and Arnosti, 2008). Таким образом, для понимания механизма формирования внутренних границ полос 3 и 7 у нуль-мутантов по *kni*, необходимо дальнейшее изучение механизмов репрессии ближнего действия, которая определяется действием других генов *gap*.

У гетерозигот по *Kr* и *kni* паттерн *eve* изменен в значительно меньшей степени, чем у нуль-мутантов, тем не менее, у гетерозигот по *Kr* измененная территория *eve* шире, чем у гетерозигот по *kni* (Рис. 16 и 17). Более того, нами обнаружено, что в целом форма и размер раннего паттерна *eve* у гетерозигот по *Kr* сходны с таковыми у нуль-мутантов, тогда как поздние паттерны *eve* более сходны с паттернами дикого типа. На функциональном уровне это может представлять собой тип канализации, при котором про-

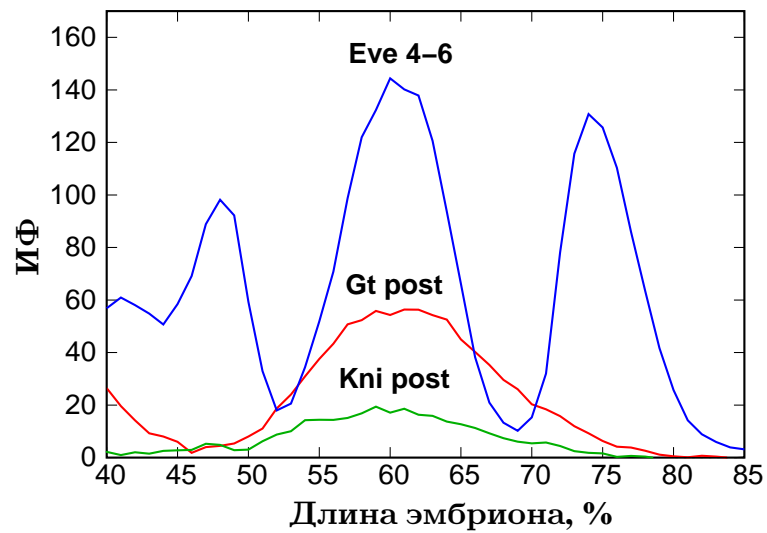


Рис. 20: Интегрированные картины экспрессии *eve* в области полос 4–6 (синий цвет) и постериорные области экспрессии *gt* и *kni* (красный и зеленый цвет) у нуль-мутантов по *Kr* во временном классе 7. В конце цикла 14А позиции этих трех областей экспрессии совпадают.

исходит коррекция мутантного фенотипа. Это явление может объясняться тем, что крайне низкие концентрации Кг в ранний период развития способны формировать только паттерн *eve*, сходный с мутантным. Однако последующее повышение уровня Кг приблизительно до половины от наблюдаемого у эмбрионов дикого типа (Рис. 16А), уже оказывается достаточным для формирования паттерна, состоящего из 7-ми полос, и, таким образом, обеспечивает выживаемость гетерозигот (Frasch and Levine, 1987).

Мы также обнаружили новые закономерности формирования постериорной границы полосы 2 *eve* у гетерозигот по *Kr*. Ранее было показано, что эта граница устанавливается репрессирующим воздействием Кг в зависимости от его концентрации и пониженная концентрация этого транскрипционного фактора у гетерозигот приводит к смещению задней границы этой полосы в постериорном направлении, приводя к ее расширению (Warrior and Levine 1990). У нуль-мутантов это приводит к полному слиянию полос 2 и 3 (Frasch and Levine, 1987, Warrior and Levine, 1990). Мы показали, что в позднем цикле 14А у эмбрионов *Kr+ / Kr-* ширина полосы 2 не изменена по сравнению с таковой у эмбрионов дикого типа (Рис. 16D). Более того, у эмбрионов *Kr-* этого же возраста слитые полосы 2 и 3 разделяются (Рис. 5N1). Возможно,

авторы предыдущих публикаций рассматривали более ранние картины экспрессии, или анализировавшие изображения не позволяли точно определить позиции полос. В любом случае, эти результаты в очередной раз подтверждают необходимость данных высокого пространственно–временного разрешения для характеристики процессов развития.

3.5.3 Динамическое уменьшение уровней экспрессии генов у эмбрионов дикого типа и мутантов

В данной главе показано, что у эмбрионов дикого типа уровни экспрессии как генов *gap*, так и генов *pair-rule*, имеют свойство снижаться в конце цикла 14A (Рис. 12 и 19). Для генов *gap* это снижение начинается раньше (Рис. 12). Подобное явление может объясняться падением уровня градиентов *Vcd* и *Cad*, являющихся активаторами генов *gap* и *pair-rule* (Рис. 8A,B).

Однако экспрессия генов *gap* у мутантов обнаружила гораздо более интересные свойства. Уровни экспрессии почти во всех областях генов *gap* ниже, чем у эмбрионов дикого типа. Из всех проанализированных областей экспрессии самый низкий уровень обнаружен в постериорной области *kni* (Рис. 12B and 11A-C). Но даже при очень низком уровне экспрессии у нуль-мутантов по генам *gap* наблюдается его дальнейшее снижение в конце цикла 14A, что сходно с аналогичным явлением у эмбрионов дикого типа (Рис. 12).

Снижение уровней экспрессии генов *gap* у нуль-мутантов по другим генам *gap* является необычным явлением. Существует множество как экспериментальных, так и теоретических доказательств того, что регуляция в системе генов *gap* основана на репрессирующих взаимодействиях между этими генами (Jaeger, 2011). Таким образом, инактивация гена *gap* должно приводить к повышению, а не к понижению экспрессии других генов.

В публикации Панкратц и др. было предложено, что существенное снижение уровня мРНК *kni* у мутантов по *Kr* является следствием того что *Kr* является активатором *kni* (Pankratz et al., 1989). Однако более позднее исследование показало, что экспрессия *kni* восстанавливается до нормаль-

ного уровня у двойных мутантов *Kr;gt* (Carovilla et al., 1992). Это результат предполагает, что *Kr* влияет на *kni* не напрямую, а путем репрессирующего воздействия на *gt*, тем самым предотвращая его сдвиг к позиции *kni* и репрессию этого гена. Описанные в этой главе данные не полностью подтверждают механизм снижения *kni* за счет репрессии *gt*, так как у мутантов по *Kr* уровень постериорной экспрессии *kni* очень низкий с самого начала цикла 14А, и тем самым, общее снижение экспрессии *kni* не коррелировано со сдвигом *gt* на территорию области экспрессии этого гена (Рис. 12В и 22С).

Однако этот сдвиг может объяснять снижение уровня самого постериорного *gt*, так как он сдвигается к позиции, соответствующей более низкой концентрации его позитивного регулятора Cad (Rivera-Pomar et al., 1995), что подтвердили результаты математического моделирования (Kozlov et al., 2012). Тем не менее, у мутантов по *kni* А-П позиция постериорной области экспрессии *gt* не изменена по сравнению с диким типом, однако уровень экспрессии *gt* также существенно занижен (Kraut and Levine, 1991a). Таким образом, явление снижения уровней экспрессии генов гар у мутантов имеет системный характер и подчеркивает необходимость интактной системы взаимодействий для поддержания уровней экспрессии генов гар.

4 ГЛАВА 4. Динамические сдвиги позиций областей экспрессии зиготических генов у мутантных эмбрионов в сравнении с эмбрионами дикого типа

Ранее было выявлено, что у эмбрионов дикого типа большинство областей экспрессии зиготических генов динамически сдвигаются в ходе развития эмбриона (Jaeger et al., 2004a, Surkova et al., 2008a, Самсонова, 2008). Таким образом, можно говорить не о пассивном считывании позиционной информации, заложенной в морфогенетических градиентах, а о ее динамической интерпретации генами-мишенями. Было показано, что сдвиги областей экспрессии генов в постериорной части эмбриона не зависят от морфологических перемещений ядер бластодермы (Surkova et al., 2008a) (т.н. "морфологического потока") (Keränen et al., 2006), и обусловлены репрессивными взаимодействиями между зиготическими генами (Jaeger et al., 2004a).

Следовало ожидать, что нуль-мутации в генах гар, являющихся важнейшими регуляторами процесса детерминации сегментов, окажут влияние на характер интерпретации позиционной информации.

В данной главе мы проводим сравнительный анализ позиционной динамики экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа и мутантных в цикле 14A с особым акцентом на позиции областей экспрессии, их сдвиги и ширину.

Для правильной оценки изменений в позициях областей экспрессии мы приводим величины, с которыми можно сопоставлять результаты, представленные в этом разделе. К концу цикла 14A ширина областей экспрессии генов гар у эмбрионов дикого типа составляет примерно 10% ДЭ, а ширина полос сформированного паттерна гена pair-rule приблизительно равна 3% ДЭ. Правильная экспрессия генов pair-rule необходима для корректной инициации полос генов segment-polarity *en* и *wg* шириной примерно равной 1% ДЭ, которые детерминируют позиции будущих границ парасегментов (DiNardo and O'Farrell, 1987, Ingham et al., 1988). В частности, экспрессия

en иницируется на anteriорных границах полос *eve* и *ftz*. Это означает, что даже незначительное изменение позиции области экспрессии может иметь существенное влияние на процесс сегментации тела дрозофилы.

4.1 Пространственные сдвиги областей экспрессии генов *gar*

У нуль-мутантов по генам *gar* большинство областей экспрессии генов сегментации меняет позиции в течение цикла 14А (Рис. 22). Сдвиги постериорных областей *kni*, *gt* и *hb* у нуль-мутантов являются статистически значимыми (Табл. 4) и направлены от постериорного к anteriорному концу эмбриона, аналогично таковым у эмбрионов дикого типа (Рис. 21).

У эмбрионов дикого типа постериорные области экспрессии *kni* и *hb* сдвигаются примерно на 2% ДЭ. У мутантов по *Kr* сдвиг области *kni* немного меньше, чем у эмбрионов дикого типа, а сдвиг области *hb* – немного больше (Табл. 4 и Рис. 22А,В) (Surkova et al., 2013).

Обл.экспр./ Врем.группы	Kni post 1-4		Gt post 1-4		Hb post 2-4		
Генотип	wild type	<i>Kr</i> -	wild type	<i>Kr</i> -	wild type	<i>Kr</i> -	<i>kni</i> -
Сдвиг	2.4 (N=122)	1.8 (N=54)	8.4 (N=147)	13.3 (N=106)	2.2 (N=159)	3.1 (N=78)	2.2 (N=54)
Обл.экспр./ Врем.группы	Eve 7 2-4						
Генотип	wild type		<i>Kr</i> +/ <i>Kr</i> -		<i>Kr</i> -		<i>kni</i> -
Сдвиг	4.5 (N=579)		2.8 (N=76)		6.0 (N=113)		6.7 (N=56)

Таблица 4: Пространственные сдвиги постериорных областей экспрессии у эмбрионов дикого типа (wild type) и нуль-мутантов по *Kr* и *kni*, а также гетерозигот *Kr*+/*Kr*-. Сдвиги рассчитаны для максимумов областей экспрессии. Значения сдвигов обозначают движение в anteriорном направлении. Для каждой области экспрессии показан размер выборки *N*.

Как у эмбрионов дикого типа, так и у мутантов по *Kr*, наиболее существенно сдвигается постериорная область экспрессии *gt*, при этом её сдвиг у мутантов намного больше, чем у эмбрионов дикого типа (Рис. 21). В цикле 14А пик *gt* сдвигается на 8.4% ДЭ у эмбрионов дикого типа и на 13.3%

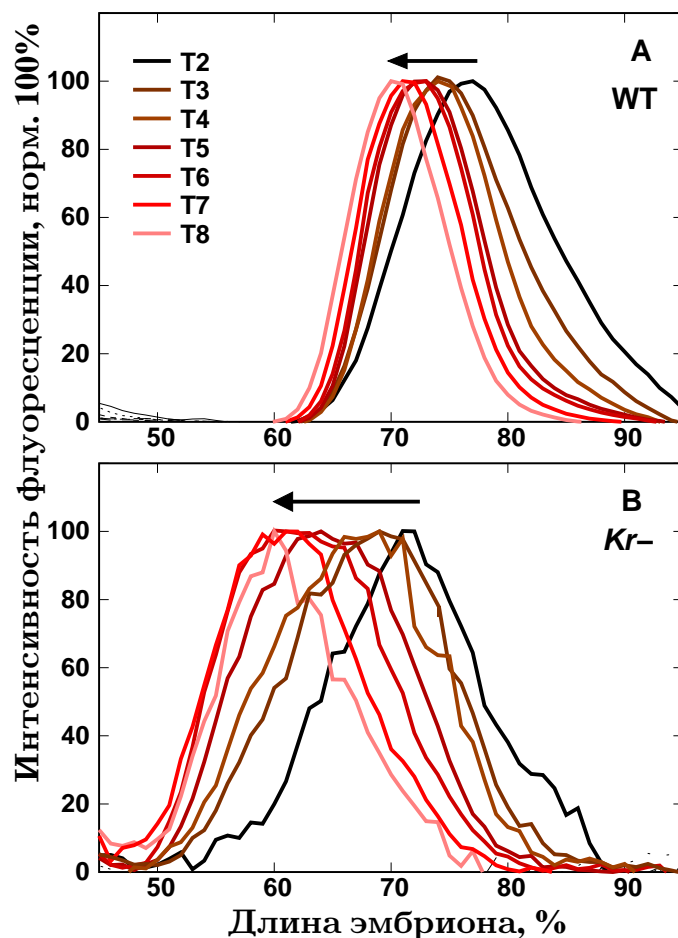


Рис. 21: Пространственный сдвиг задней области экспрессии гена *gt* во временных классах T2–T8 у эмбрионов дикого типа (А) и эмбрионов, нуль-мутантных по гену *Kr* (В). Общий сдвиг максимума этой области на (А) и (В) показан черными стрелками. Для удобства сравнения пространственных сдвигов у эмбрионов дикого типа и мутантных интенсивность флуоресценции нормирована на максимальный уровень.

ДЭ у мутантов по *Kr*, превосходя таким образом сдвиг соседних областей экспрессии *kni* и *hb* более чем на 10% ДЭ (Рис. 21, 22А-С, Табл. 4). Причем, у мутантов по *Kr* постериорная область *gt* в ходе своего движения в anteriорном направлении перекрывается с соседней областью экспрессии *kni*. В результате, к концу цикла 14А позиции пиков экспрессии *gt* и *kni* совпадают (Рис. 22С, F и Табл. 1).

Более подробное рассмотрение движения постериорной области экспрессии *gt* показывает, что этот сдвиг имеет разную временную динамику у эмбрионов дикого типа и мутантов. У эмбрионов дикого типа эта область экспрессии сдвигается на 4.8% ДЭ во временных группах 1–2 и в дальнейшем

почти не движется. У мутантов по *Kr* существенное движение постериорной области *gt* наблюдается в течение более длительного периода времени. В начале и середине цикла 14А *gt* сдвигается, соответственно, на 5 и 5.9% ДЭ, но во временной группе 4 перед гастрულიцей её движение замедляется (Табл. 5). Это происходит в то время, когда область *gt* достигает позиции области *kni* (Рис. 22С) (Surkova et al., 2013).

Врем.группы	Сдвиг Gt post	
	wild type	<i>Kr</i> -
1–2	4.8	5.9
2–3	1.0	5.0
3–4	1.7	2.4

Таблица 5: Сравнение пространственных сдвигов постериорной области экспрессии *gt* в трех временных группах цикла 14А у эмбрионов дикого типа (wild type) и нуль-мутантов по *Kr*. Значения сдвигов рассчитывались как разница между средними значениями позиций в соседних временных группах. Все сдвиги являются статистически значимыми ($p < 0.05$).

Границы областей экспрессии в целом демонстрируют аналогичную временную динамику, однако сдвиг антериорной границы обычно меньше, чем сдвиг максимума и постериорной границы. у эмбрионов дикого типа подобная А–П асимметрия в движении границ областей экспрессии приводит к сжатию областей экспрессии со временем (Surkova et al., 2008a). В ходе цикла 14А области экспрессии сужаются (Рис. 21А), причем подобное сужение наиболее очевидно в ранних временных классах, в то время, когда происходит быстрое увеличение уровней экспрессии генов (Рис. 12).

Таблица 2 показывает, что у мутантов по *Kr* постериорные области экспрессии *gt* и *hb* также сужаются со временем. При этом область экспрессии *gt* у одиночных мутантов примерно на 5% ДЭ шире, чем у эмбрионов дикого типа как в ранние, так и в поздние времена, а ширина постериорной области *hb* примерно одинакова у эмбрионов дикого типа и у одиночных мутантов. К позднему циклу 14А у двойных мутантов *Kr;kni* наблюдается такой же сдвиг задней области экспрессии *gt*, как у одиночных мутантов по *Kr*, и из таблицы 2 видно, что ширина этой области у двойных мутантов не

отличается от таковой у эмбрионов *Kr-*. Напротив, постериорная область экспрессии *hb* у двойных мутантов шире, чем у эмбрионов дикого типа и нуль-мутантных по *Kr*. Это происходит за счет формирования более пологой антериорной границы (Рис. 13N), хотя позиция максимума *hb* при этом остается неизменной (Табл. 1). С помощью математического моделирования было предсказано, что позиционирование антериорной границы постериорной области экспрессии *hb* осуществляется репрессией двух генов - *Kr* и *kni* (Kozlov et al., 2012). Таким образом, антериорное смещение границы *hb*, наблюдаемое у двойных мутантов *Kr;kni*, подтверждает данное предсказание.

В отличие от постериорных областей экспрессии генов *gap*, ни одна из антериорных областей не меняет своей А–П позиции со временем ни у эмбрионов дикого типа, ни у мутантов по *Kr*, т.к. все сдвиги, представленные в таблице 6 не являются статистически значимыми.

Обл.экспр./ (Врем.группа)	Eve 1 (2-4)		Gt ant (2-4)		Hb ant (2-4)	
Генотип	WT	<i>Kr-</i>	WT	<i>Kr-</i>	WT	<i>Kr-</i>
Сдвиг	0.4 N=584	0.9* N=113	0.3 * N=142	-0.8* N=82	-0.7* N=141	-1.1* N=78

Таблица 6: Пространственные сдвиги антериорных областей экспрессии у эмбрионов дикого типа (WT) и мутантов по *Kr*. Значения сдвигов рассчитаны для задних границ антериорных областей экспрессии Gt и Hb и максимума полосы 1 Eve. Положительные значения сдвигов обозначают движение в антериорном направлении, отрицательные – в постериорном. Звездочками обозначены значения сдвигов, не являющихся статистически значимыми при $p < 0.05$. Для каждой области экспрессии показан размер выборки *N*.

4.2 Пространственные сдвиги полос экспрессии генов pair-rule

Для большинства полос генов pair-rule у эмбрионов дикого типа свойственны существенные сдвиги полос экспрессии. При этом ранее были выявлены два типа сдвигов: во-первых, постериорные полосы сдвигаются в антериорном направлении аналогично постериорным областям экспрессии

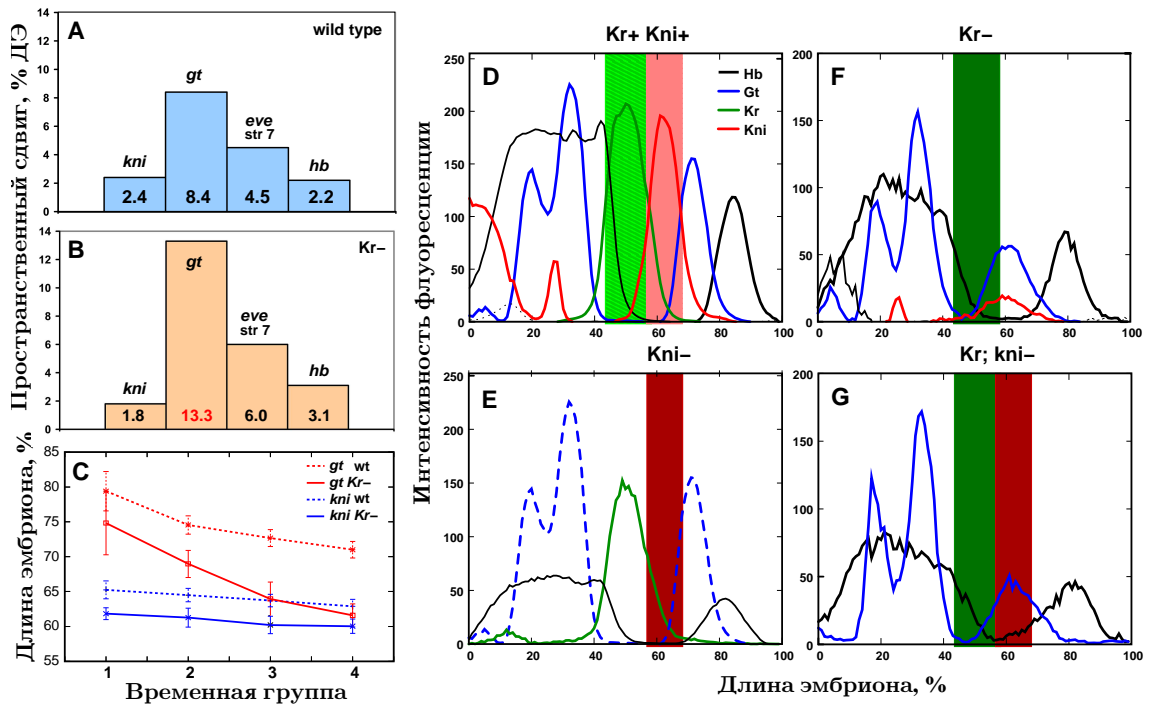


Рис. 22: Пространственные сдвиги областей экспрессии генов у мутантных эмбрионов в сравнении с эмбрионами дикого типа (wild type). (А,В) Значения пространственных сдвигов задних областей экспрессии у эмбрионов дикого типа (А) и мутантов по *Kr* (В) показаны для временных групп 1–4 (для постериорных областей *kni* и *gt*) и 2–4 (для полосы 7 *eve* (*str 7*) и постериорной области *hb*). Сдвиги рассчитаны для максимумов областей экспрессии, значения сдвигов отражают движение в anteriорном направлении. Все значения являются статистически значимыми при $p < 0.05$. Размеры выборок для каждой области экспрессии показаны в Табл. 4. (С) Пространственные сдвиги постериорных областей экспрессии *kni* и *gt* у эмбрионов, мутантных по *Kr*, в цикле 14А в сравнении с таковыми у эмбрионов дикого типа (wt). Погрешность показывает SD средних позиций областей экспрессии в каждой временной группе. (D–G) Совмещенные интегрированные паттерны экспрессии генов гар у эмбрионов дикого типа (D), *kni-* (E), *Kr-* (F) и *Kr;kni-* (G) из временного класса 7, показывающие позиции областей экспрессии в позднем цикле 14А. Пунктирная линия на (E) обозначает область экспрессии *gt* у эмбрионов дикого типа, т.к. у мутантов по *kni* ее позиция не изменена (Mohler et al., 1989, Eldon and Pirrotta, 1991). Вертикальными цветными полосками обозначены позиции областей экспрессии *Kr* и *kni* у эмбрионов дикого типа, где их экспрессия присутствует (светлым цветом на D), и у мутантов, где она отсутствует (темным цветом на E–G).

генов гар. Во-вторых, формирование новых полос внутри паттерна приводит к сдвигам соседних полос (Surkova et al., 2008a).

Полоса 7 *eve* сдвигается на 4.5, 6 and 6.7% ДЭ в anteriорном направлении, соответственно, у эмбрионов дикого типа и у нуль-мутантов по *Kr* и *kni*. Как у эмбрионов дикого типа, так и у нуль-мутантов по *Kr* этот сдвиг больше, чем сдвиги постериорных областей экспрессии *kni* и *hb*, но меньше сдвига *gt*. Напротив, у эмбрионов, гетерозиготных по *Kr*, полоса 7 *eve* сме-

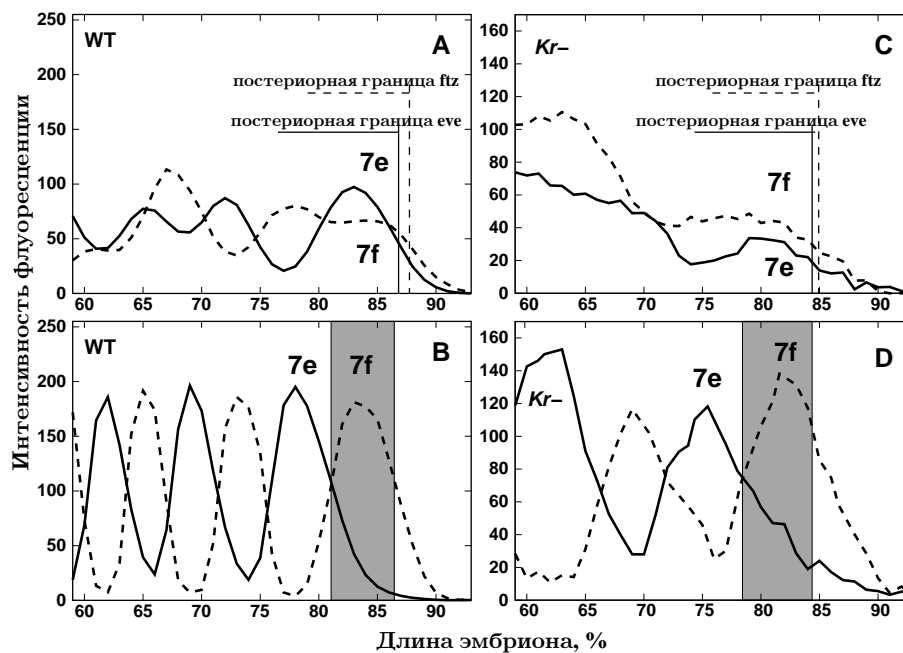


Рис. 23: Динамический сдвиг задней границы паттерна *eve* относительно задней границы паттерна *ftz* обеспечивает комплементарность картин экспрессии этих генов в период детерминации парасегментов. Картины экспрессии *eve* (сплошная линия) и *ftz* (пунктирная линия) для раннего (А, С) и позднего (В, D) класса 14А для эмбрионов дикого типа (WT) и нуль-мутантов по гену *Kr*.

щается лишь на 2.8% ДЭ (Табл. 4). Этот сдвиг в два раза меньше, чем у нуль-мутантов по *Kr* и не приводит к существенному сужению всего паттерна *eve* в ходе цикла 14А (Рис. 16Н) (Surkova et al., 2013).

Ранее для эмбрионов дикого типа была выявлена интересная закономерность: комплементарность паттернов генов *eve* и *ftz*, относительные уровни экспрессии которых в цикле 14А определяют относительную ширину будущих парасегментов, устанавливается динамически. Это происходит посредством пространственного сдвига постериорной границы паттерна *eve* относительно границы паттерна *ftz*, позиция которой существенно не меняется со временем (Рис. 23А,В), (Surkova et al., 2008а). У эмбрионов *Kr*-картины экспрессии *eve* и *ftz* значительно изменены по сравнению с эмбрионами дикого типа, однако комплементарность паттернов устанавливается аналогичным образом (Рис. 23С, D).

Другие абдоминальные полосы *eve* у эмбрионов дикого типа также сдвигаются в anteriорном направлении, но в значительно меньшей степени, чем

полоса 7. У нуль-мутантов по *Kr* небольшие сдвиги полос внутри паттерна связаны со сложной эволюцией паттерна в течение всего цикла 14А (Рис. 5G1-N1).

Как и в случае антериорных областей экспрессии генов *gar*, сдвиги антериорных полос *eve* у нуль-мутантов по *Kr* и *kni* не являются статистически значимыми (Surkova et al., 2013).

4.3 Заключение по главе 4

В данной главе был представлен анализ динамических изменений пространственной локализации областей экспрессии генов у эмбрионов дрозофилы, мутантных по генам *gar*, в сравнении с эмбрионами дикого типа. Ранее было выявлено, что у эмбрионов дикого типа области экспрессии зиготических генов динамически сдвигаются после изначального определения их позиций пороговыми концентрациями материнских градиентов, и эти сдвиги не зависят от морфологических перемещений ядер бластодермы (Surkova et al., 2008a). С помощью математического моделирования было показано, что сдвиги постериорных областей экспрессии генов *gar* в антериорном направлении обусловлены тем, что гены, экспрессирующиеся более постериорно, репрессируют гены, экспрессирующиеся более антериорно, но не наоборот (Jaeger et al., 2004a).

Важно было исследовать, каким образом осуществляется интерпретация позиционной информации при нарушении нормального процесса сегментации. Нуль-мутации в генах *gar* приводят к делеции больших участков тела, состоящих из нескольких смежных сегментов. В раннем эмбрионе, на стадии бластодермы, экспрессия зиготических генов у таких нуль-мутантов существенно изменена, что отражает ключевую роль генов *gar* в регуляции процесса детерминации сегментов.

Выявлено, что пространственная динамика у эмбрионов дикого типа и у мутантов сходна по трем важным аспектам. Во-первых, области экспрессии в антериорной части эмбриона практически не сдвигаются со временем, и

сдвиги, в основном, происходят в постериорной части. Во-вторых, постериорные области экспрессии движутся в антериорном направлении. В-третьих, сдвиги у эмбрионов дикого типа и одиночных нуль-мутантов приводят к сужению областей экспрессии генов за счет более существенного сдвига постериорной границы области экспрессии. Количественный анализ данных показал, что в целом значения сдвигов у мутантов больше, но эти значения сильно варьируют в зависимости от рассматриваемой области экспрессии (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013).

Наиболее существенный пространственный сдвиг, как у эмбрионов дикого типа, так и у нуль-мутантов по *Kr* и *Kr;kni* свойственен области экспрессии *gt* (Рис. 21). Причем у мутантов по *Kr* эта область смещается настолько, что полностью перекрывается с соседней областью экспрессии *kni*, занимая ту же самую пространственную позицию (Рис. 22).

Сходство локализации и направления пространственных сдвигов областей экспрессии, а также то, что эти сдвиги приводят к сжатию областей экспрессии и у нуль-мутантов и у эмбрионов дикого типа, подразумевает сходные регуляторные механизмы, определяющие эти сдвиги. Действительно, с помощью математического моделирования было показано, что сдвиг области экспрессии *gt* у нуль-мутантов по *Kr*, как и у эмбрионов дикого типа, происходит за счет репрессии со стороны постериорной области экспрессии *hb* (Kozlov et al., 2012). Это может служить частичным подтверждением гипотезы, что у нуль-мутантов, как и у эмбрионов дикого типа, сдвиги областей экспрессии генов происходят за счет репрессии со стороны соседних областей экспрессии, локализованных более постериорно.

Анализ пространственных сдвигов у нуль-мутантов по генам *gar* также позволяет предположить, что у этих эмбрионов, наиболее сильная репрессия свойственна для областей экспрессии генов *gar*, не граничащих друг с другом, так же, как и у эмбрионов дикого типа (Jaeger et al., 2004b). У нуль-мутантов по *Kr* движение постериорной области экспрессии *gt* замедляется в то время, когда она достигает позиции области *kni* (Табл. 5 и Рис. 22С). Таким образом, перед началом гастрюляции оба гена (*kni* и *gt*) начинают

экспрессироваться в областях, не граничащих с антериорной областью экспрессии *hb*, что предполагает сильную репрессию между *hb* и этими двумя генами. У нуль-мутантов по *kni*, где присутствует область экспрессии *Kr*, постериорная область *gt*, напротив, не смещается на территорию отсутствующей области экспрессии *kni* и не занимает соседнее положение с областью *Kr*. При этом у двойных мутантов *Kr;kni* сдвиг *gt* происходит аналогично наблюдаемому у одиночных мутантов по *Kr*. Следовательно, можно предположить, что у мутантов по *kni* именно репрессия *Kr* не позволяет области экспрессии *gt* сдвигаться к позиции области *kni* (Рис. 22Е) (Surkova et al., 2013).

Постериорные области экспрессии *kni* и *hb*, а также полоса 7 *eve* сдвигаются в меньшей степени, чем постериорная область *gt* (Рис. 22А,В и Табл. 4). Существенные различия в значениях сдвигов областей экспрессии у мутантов, описанных в этой главе, контрастируют с характером сдвигов у нуль-мутантов по терминальному гену *gap tll*. У эмбрионов *tll*-области экспрессии сдвигаются сильнее, чем у эмбрионов дикого типа, но практически аналогичным образом для всех исследуемых областей (Janssens et al., 2013). Такое различие может объясняться тем, что *Kr* и *kni* входят в состав регуляторных контуров с обратной связью (Jaeger et al., 2004a,b, Manu et al., 2009a), а *tll* не регулируется другими генами *gap* (Bronner and Jackle, 1991, Bronner and Jackle, 1996). Более того, у эмбрионов дикого типа постериорная область *tll* не сдвигается со временем, т.е. демонстрирует принципиальное отличие от остальных зиготических генов, экспрессирующихся не в терминальных областях эмбриона, а в презумптивной области тела дрозофилы.

Области экспрессии, расположенные в антериорной области (без учета головного отдела) в основном, не сдвигаются со временем как у эмбрионов дикого типа, так и у мутантов (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Исключение составляют области, сдвигающиеся по причине формирования рядом новой области экспрессии. Этими же причинами обусловлены сдвиги полос внутри паттернов генов *pair-rule* в ходе цикла 14А. Однако у генов *pair-rule*, так же, как и у генов *gap*, наибольшие смещения наблюдаются в

постериорной части эмбриона (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Подобная пространственная нестабильность постериорной экспрессии отражается и в увеличении позиционной вариабельности у одиночных нуль-мутантов по генам *gap*. Это явление и его возможные причины обсуждаются в следующей главе.

5 ГЛАВА 5. Вариабельность экспрессии генов сегментации

В данной главе подробно рассмотрена вариабельность экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа и эмбрионов, мутантных по генам *gap*. Вариабельность изучали, анализируя 1) уровни экспрессии генов; 2) характер формирования областей экспрессии; 3) пространственное положение областей экспрессии.

5.1 Вариабельность уровней экспрессии генов у эмбрионов дикого типа

Выявлено, что в цикле 13 – начале цикла 14А у индивидуальных эмбрионов дикого типа наблюдается существенная вариабельность уровней экспрессии как генов *gap*, так и генов *pair-rule*. Для большинства областей экспрессии генов *gap* увеличение вариабельности не связано с изменением их формы, которая остается постоянной в процессе развития (Рис. 9В). Напротив, вариабельность уровней экспрессии генов *pair-rule* максимальна во время образования полос, когда обнаруживается широкое разнообразие форм паттернов, наблюдаемых у разных эмбрионов одного возраста (Рис. 9D,F).

Однако высокий уровень ранней вариабельности как генов *gap*, так и *pair-rule* (Рис. 9В,D,F) существенно снижается к концу цикла 14А (Рис. 9С,E,G).

5.2 Вариабельность времени формирования областей экспрессии у эмбрионов дикого типа

Полученный большой объем данных по экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа позволил нам определить вариабельность времени формирования каждой области экспрессии с разрешением, равным одному

временному классу, т.е. примерно 6 минут развития. Мы анализировали, насколько быстро формируется каждая область экспрессии у 100% эмбрионов. Картины экспрессии генов pair-rule имеют большое количество черт, позволяющих провести подобный анализ.

Результаты анализа времени формирования каждой полосы представлены на рисунках 24E,F и 18. К примеру, временная точность формирования полосы 1 *run* составляет менее 6-ти минут, т.к. эта полоса начинает формироваться во временном классе 1, а к временному классу 2 уже сформирована у 100% всех эмбрионов (Рис. 24E). Резкий контраст представляет собой формирование полосы 4 *ftz*, продолжающееся 24 минуты развития. Эта полоса начинает формироваться во временном классе 1 и появляется у всех эмбрионов лишь во временном классе 5. Эти две полосы представляют собой примеры черт с наибольшей вариабельностью времени формирования (Рис. 24E). В целом, каждая полоса формируется с определенной временной точностью, таким образом, временная точность формирования разная для разных полос одного гена pair-rule (Рис. 18) (Surkova et al., 2008a).

Характер вариабельности времени формирования областей экспрессии генов gap отличается от такового у полос генов pair-rule. В середине цикла 14A присутствует существенная вариабельность появления антериорных областей *Kr* и *gt*. Мы обнаружили антериорную область экспрессии *Kr* (Рис. 10) у 13%, 56% и 80% эмбрионов, соответственно, из временных классов 3, 4 и 5; область 1 *gt* у 10%, 47%, и 87% эмбрионов из временных классов 5, 6 и 7, а также область 2 *gt* у 10%, 61% у 94% эмбрионов из временных классов 4, 5 и 6 (Рис. 24F). Таким образом, вариабельность времени формирования этих областей экспрессии во всех случаях составляет около 24 минут развития, однако начало этого периода варьируется от области к области (Рис. 24F). Кроме того, скорость формирования этих областей более равномерна во времени по сравнению с полосой 4 *ftz*, которая тоже формируется в течение 24 минут развития (Рис. 24E).

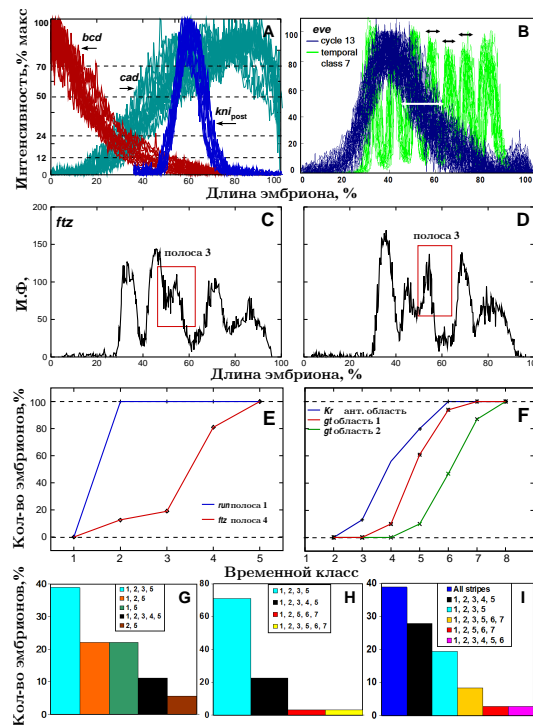


Рис. 24: Вариабельность А–П позиций, времени, последовательности и типа формирования областей экспрессии у эмбрионов дикого типа. (А). Пространственная вариабельность областей экспрессии *bcd*, *cad* и *kni* в цикле 14А. На рисунке показаны 26 эмбрионов, меченых на экспрессию *bcd* и *cad*, и 18 эмбрионов, меченых на экспрессию *kni*. Показана постериорная часть паттерна *kni* на А–П участке 35–100% ДЭ для временного класса 8. Показаны пороговые величины, соответствующие разным значениям в процентах от максимального уровня экспрессии. (В). Пространственная вариабельность индивидуальных картин экспрессии *eve* в цикле 13 и временном классе 7 цикла 14А. Вариабельность позиции задней границы ранней картины экспрессии *eve* показана белой стрелкой. Черными стрелками показан уровень вариабельности полос *eve* сформированных на месте постериорной границы раннего паттерна *eve*. (С,Д). Картины экспрессии *ftz* у двух эмбрионов из временного класса 3, демонстрирующие вариабельность способа формирования полосы 3, отмеченной красным прямоугольником. (Е,Ф). Временная вариабельность формирования полос генов pair-rule (Е) и областей экспрессии генов gap (F), обозначенных на рисунке. Для каждого временного класса показан процент эмбрионов, у которых появилась обозначенная область экспрессии. (G–I). Вариабельность последовательности формирования полос областей экспрессии гена *ftz* во временных классах 2 (G), 3 (H), и 4 (I). Каждый столбец гистограммы обозначает процент эмбрионов, в котором сформировалась обозначенная полоса.

5.3 Вариабельность последовательности и типа формирования областей экспрессии у эмбрионов дикого типа

У генов pair-rule полосы экспрессии не формируются в фиксированной последовательности. Прекрасной иллюстрацией подобного явления может служить паттерн *ftz*. Несмотря на то, что полоса 5 всегда формируется пер-

вой, следующей сформированной полосой может быть как полоса 1, так и полоса 2. Полоса 3 может формироваться как до, так и после полосы 6, а последней сформированной полосой в паттерне может быть как полоса 4, так и полоса 7 (Рис. 24G–I).

При этом, уровень временного разрешения нашего набора данных позволил обнаружить еще один источник вариабельности формирования паттерна *pair-rule*. Одна и та же полоса может формироваться более чем одним способом. Например, полоса 3 *ftz* может образовываться либо делением, либо формироваться на границе полосы 2 (Рис. 24C,D).

5.4 Вариабельность формы картин экспрессии гена *eve* у эмбрионов, мутантных по *Kr*

Как было показано ранее, форма паттерна гена *eve* у эмбрионов дикого типа сильно вариабельна во время формирования полос во временных классах 2 и 3, и эта вариабельность уменьшается со временем (Рис. 9D,E), (Surkova et al., 2008a).

В отличие от эмбрионов дикого типа и эмбрионов *kni*⁻, у эмбрионов, мутантных по гену *Kr*, усредненный паттерн *eve* меняется в течение всего цикла 14A, при этом одни полосы разделяются, а другие сливаются (Рис. 5G1-N1). Мы решили проверить, до какой степени эта сложная динамика отражается на уровне вариабельности формы паттерна между индивидуальными эмбрионами. У большинства эмбрионов, мутантных по *Kr*, полосы *eve* начинают формироваться во временном классе 4, т.е. позже, чем у эмбрионов дикого типа (Рис. 5B1,J1). На рисунке 25A–D показаны четыре паттерна экспрессии *eve* у индивидуальных эмбрионов из временного класса 4. Высокий уровень вариабельности очевиден, в основном, для полос, появляющихся в областях 2–3 и 4–6. Таким образом, как и у эмбрионов дикого типа, форма паттернов *pair-rule* в наибольшей степени варьирует между индивидуальными эмбрионами в период формирования полос. Вариабельность ранней экспрессии *ftz* у нуль-мутантов по *Kr* имеет те же закономер-

ности. Более того, ранние паттерны *eve* и *ftz* варьируют независимо друг от друга (Рис. 25I).

На рисунке 25E-H показаны четыре паттерна *eve* у эмбрионов *Kr-*, принадлежащих временному классу 8. Несмотря на то, что в позднем цикле 14A паттерн *eve* у таких эмбрионов все еще динамически меняется (как описано в главе 2), его вариабельность значительно ниже, чем во временном классе 4 (Рис. 25A-D). При этом в области 4–6 вариабельность формы паттернов уменьшается со временем, однако в области 2–3 паттерны *eve* остаются высоковариабельными.

Более того, поздние паттерны *eve* и *ftz* у эмбрионов *Kr-*, как у эмбрионов дикого типа, становятся строго комплементарными, за исключением “нестабильной” области 2–3. На рисунке 25J,K показаны два эмбриона из позднего класса 14A со сходной формой паттернов *eve* в области 2–3, но сильно различающимися паттернами *ftz* в этой области. Это означает, что у поздних эмбрионов *Kr-* в антериорной части паттернов концентрации *Eve* и *Ftz* могут варьировать независимо друг от друга, что обычно свойственно только для ранних эмбрионов (Рис. 25I).

5.5 Пространственная вариабельность областей экспрессии генов у эмбрионов дикого типа

Изучение пространственной вариабельности экспрессии генов сегментации в последние годы вызывает особый интерес. Ранее было показано, что у эмбрионов дикого типа высокая пространственная вариабельность пороговой концентрации материнского градиента *Bcd*, обуславливающей формирование границы антериорной области гена *hb*, существенно снижается на уровне экспрессии *hb* (Houchmandzadeh et al., 2002). Однако в других работах утверждалось обратное – что *bcd* экспрессируется с высокой пространственной точностью (Crauk and Dostatni, 2005, Gregor et al., 2007a).

Мы оценивали пространственную вариабельность экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа и мутантных путем анализа характер-

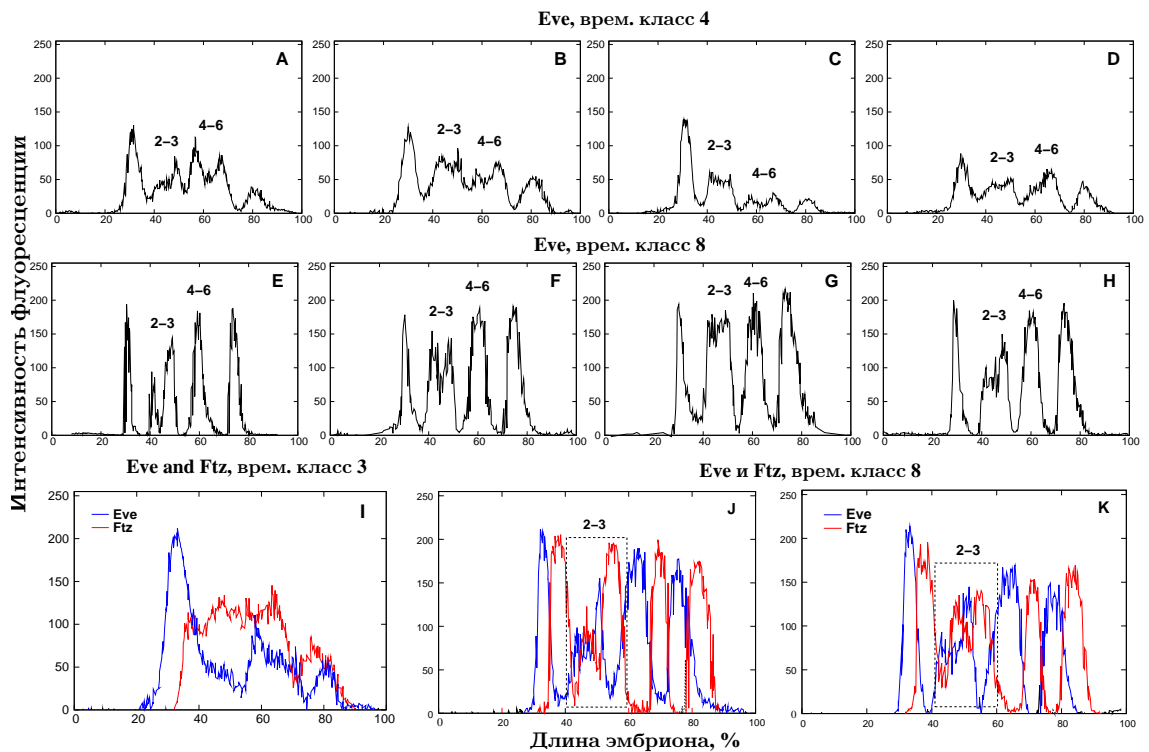


Рис. 25: Количественные данные по экспрессии *eve* и *ftz* у индивидуальных эмбрионов *Kr-*. (А–Н) Картины экспрессии *eve* во временных классах 4 (А–D) и 8 (Е–Н). Картины экспрессии пространственно зарегистрированы для лучшей визуализации варибельности уровня экспрессии отдельных полос. Полосы 2–3 остаются варибельными в позднем цикле 14А. (I–K) Совмещенные картины экспрессии *eve* и *ftz* у эмбриона из временного класса 3 (I) и двух эмбрионов из временного класса 8 со сходной экспрессией *eve* в области 2–3, но различающейся экспрессией *ftz* в этой области (обозначено пунктирной рамкой).

ных черт картин экспрессии (см. главу 2). Большие выборки данных для эмбрионов дикого типа позволили нам анализировать уровни варибельности в каждом из 8-ми временных классов цикла 14А. Данные для мутантных эмбрионов, а также их сравнение с таковыми у эмбрионов дикого типа, приведены для 4-х временных групп.

Ген/Время развития	<i>bcd</i> /C13				<i>hb</i> /C13	<i>Kr</i> /C13
	(N=80)				(N=25)	(N=20)
А–П позиция	70%	50%	24%	12%	П	Пик
SD	3.1	4.4	4.0	3.8	2.3	2.5

Ген/Время развития	<i>eve</i> /C13			<i>eve</i> /T1			<i>eve</i> /T2	
	(N=75)			(N=78)			(N=63)	
А–П позиция	А	Пик	П	А	Пик	П	А	Пик
SD	2.4	2.4	3.7	2.0	2.2	3.4	1.4	1.6

Таблица 7: Пространственная вариабельность картин экспрессии *bcd*, *hb*, *Kr* и *eve* у эмбрионов дикого типа в цикле 13 (C13) и ранних временных классах (T1, T2) цикла 14А. “А–П позиция” обозначает позиции характерных черт картины экспрессии каждого гена. Характерными чертами *bcd* являются позиции точек для четырех обозначенных пороговых уровней экспрессии. Для областей экспрессии других генов “Пик” обозначает позицию максимальной экспрессии, а “А” и “П” - позиции антериорной и постериорной границы. SD-стандартное отклонение, *N*- размер выборки.

Ген	<i>bcd</i> (N=170)				<i>cad</i> (N=78)	
А–П позиция	70 %	50 %	24 %	12 %	24 %	12 %
SD	3.5	4.4	5.6	5.8	6.6	4.4

Таблица 8: Пространственная вариабельность градиентов *Vcd* и *Cad* в цикле 14А у эмбрионов дикого типа. Показаны стандартные отклонения (SD) позиций точек в четырех обозначенных пороговых уровнях экспрессии. *N*-размер выборки.

Для картин экспрессии *bcd* у индивидуальных эмбрионов мы выделили А–П позиции точек, где концентрация *Vcd* составляла, соответственно, 70%, 50%, 24% и 12% от максимальной. В цикле дробления 14А, стандартные отклонения этих позиций имеют значения от 3 до 6% ДЭ, при этом большие значения соответствуют более низким уровням экспрессии (Табл. 8 и Рис. 24А). Пространственная вариабельность точек, в которых уровень экспрессии *bcd* составлял 70% и 50% от максимального уровня, примерно одинакова в циклах 13 и 14А и составляет 4.4 % ДЭ для позиции 50% от максимума. Однако для более низких концентраций *Vcd* наблюдается некоторое увеличение значений стандартных отклонений от цикла 13 у циклу 14А (Табл. 7

и 8) (Surkova et al., 2008a).

Вариабельность экспрессии *cad* значительно отличается от таковой у *bcd*. В задней части эмбриона, где уровень экспрессии высокий, экспрессия *cad* не может быть охарактеризована как градиент. Позиционная вариабельность экспрессии *cad* имеет, в целом, такой же высокий уровень, как и у *bcd*, однако в отличие от *bcd*, вариабельность *cad* снижается с уменьшением уровня экспрессии (Табл. 8 и Рис. 24А).

Для оценки пространственной вариабельности экспрессии зиготических генов-мишеней *Vcd* мы измерили стандартные отклонения позиций пиков экспрессии *Kr* и *eve*, а также границ областей экспрессии *eve* и *hb* в цикле дробления 13 (Табл. 7). Полученные значения разделились на два класса. Стандартное отклонение позиций постериорной границы области экспрессии *eve* в цикле 13 было настолько же высоким, как и у градиента *Vcd* в этой части эмбриона (SD= 3.7% ДЭ). Напротив, вариабельность позиций максимума и anteriорной границы раннего паттерна *eve*, а также постериорной границы anteriорной области экспрессии *hb* и максимума *Kr* была значительно ниже (SD=2.3–2.5% ДЭ) (Табл. 7 и Рис. 24В). Таким образом, для всех характерных черт картин экспрессии зиготических генов, кроме постериорной границы *eve*, наблюдается более низкий уровень позиционной вариабельности по сравнению с наблюдаемым у материнских генов, являющихся их прямыми регуляторами (Surkova et al., 2008a).

Обл.	Gt(ant) P			Hb(ant) P				Kni(post) M	
Гено-тип	WT	<i>Kr</i> ⁻	<i>Kr;kni</i> ⁻	WT	<i>kni</i> ⁻	<i>Kr</i> ⁻	<i>Kr;kni</i> ⁻	WT	<i>Kr</i> ⁻
Гр.1	1.6 N=39	-	-	1.8 N=33	2.2 N=9	2.0 N=15	-	1.3 N=29	0.8 N=8
Гр.2	1.5 N=37	1.7 N=17	2.2 N=17	1.7 N=41	1.2 N=14	1.7 N=25	1.9 N=17	1.0 N=25	1.4 N=12
Гр.4	1.1 N=32	1.5 N=26	1.9 N=12	1.0 N=39	1.1 N=23	2.4 N=27	2.0 N=11	1.0 N=33	1.0 N=11
Обл.экспр.	Gt(post) M			Hb(post) M					
Генотип	WT	<i>Kr</i> ⁻	<i>Kr;kni</i> ⁻	WT	<i>Kr</i> ⁻	<i>kni</i> ⁻	<i>Kr;kni</i> ⁻		
Гр.1	2.8 N=38	4.6 N=25	-	-	-	-	-		
Гр.2	1.3 N=39	2.0 N=17	4.2 N=17	1.4 N=25	2.1 N=25	2.8 N=14	2.9 N=17		
Гр.4	1.2 N=29	1.7 N=27	2.9 N=12	1.0 N=36	2.4 N=27	2.1 N=23	3.3 N=11		

Таблица 9: Пространственная вариабельность областей экспрессии генов *gap* у эмбрионов дикого типа (WT) и нуль-мутантов по *Kr,kni* и *Kr;kni*. Приведены стандартные отклонения А–П позиций следующих характерных черт областей экспрессии: “Gt(ant) P” и “Hb(ant) P” обозначает постериорные границы антериорных областей экспрессии *gt* и *hb*, “Kni(post) M”, “Gt(post) M”, “Hb(post) M” – соответственно, максимумы постериорных областей экспрессии *kni*, *gt* и *hb*. Гр. 1,2 и 4 – рассматриваемые временные группы. N- размер выборки (Surkova et al., 2013).

Генотип	wild type		<i>Kr</i> ⁺ / <i>Kr</i> ⁻		<i>Kr</i> ⁻		<i>kni</i> ⁻	
Врем. группа	2	4	2	4	2	4	2	4
Полоса 3	1.2 N=176	1.2 N=168	1.3 N=10	1.6 N=26	1.8 (N=22)	1.3 N=32	1.7 (N=13)	1.5 (N=25)
Полоса 7	1.7 N=172	1.6 N=168	2.8 N=17	1.7 N=26	3.0 N=36	2.8 N=35	3.0 N=9	3.0 N=25

Таблица 10: Пространственная вариабельность максимумов полос *eve* у эмбрионов дикого типа (wild type) и нуль-мутантов по *Kr* и *kni*, а также гетерозигот *Kr*⁺/*Kr*⁻. Показаны стандартные отклонения А–П позиций максимумов полос 3 и 7 *eve* во временных группах 2 and 4, N- размер выборки (Surkova et al., 2013)

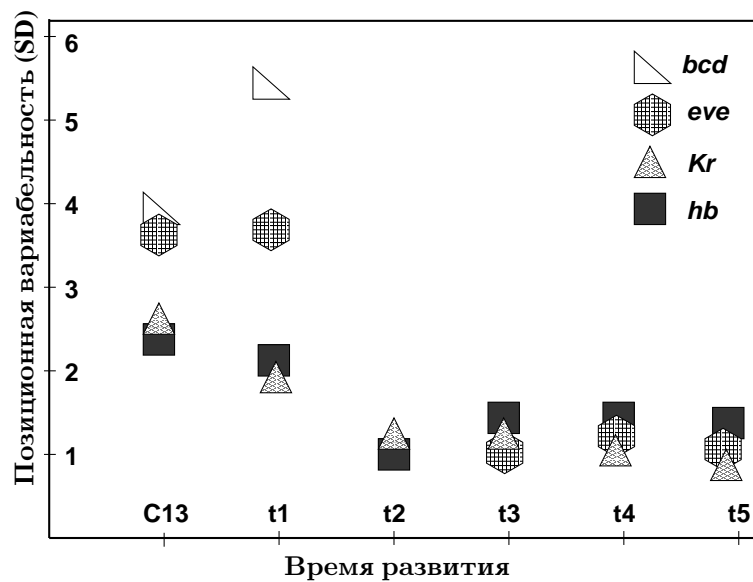


Рис. 26: Динамическое снижение высокого уровня позиционной вариабельности материнских градиентов на уровне экспрессии зиготических генов у эмбрионов дикого типа. Мы рассматриваем стандартные отклонения (SD) А–П позиций задней границы anteriorной области экспрессии *hb*, максимума центральной области экспрессии *Kr*, а также задней границы ранней области экспрессии *eve*, которая в дальнейшем соответствует позиции полосы 3 *eve*. Изменения позиционной вариабельности этих областей экспрессии во времени сравниваются с уровнем пространственной вариабельности позиции 12% порога максимальной концентрации градиента белка *Bcd*. Все перечисленные черты занимают приблизительно одну и ту же позицию вдоль А–П оси эмбриона (45-55% ДЭ). В цикле 14А вариабельность *Bcd* показана только для временного класса 1, т.к. она в дальнейшем остается приблизительно на таком же уровне (Surkova et al., 2008a)

В ходе дальнейшего развития эмбрионов дикого типа уровень позиционной ошибки экспрессии зиготических генов продолжает уменьшаться вплоть до временных классов 2–3 цикла 14А (Табл. 7 и 9). В таблице 9 приведены значения позиционной вариабельности характерных черт областей экспрессии генов *gap* в цикле 14А. Видно, что в начале цикла 14А уровень вариабельности постериорной области экспрессии *gt* составляет 2.8 % ДЭ, но снижается в 2 раза во временной группе 2, составляя 1.3 % ДЭ. В середине и конце цикла 14А уровень вариабельности имеет низкие значения для всех рассматриваемых областей экспрессии генов *gap* (Табл. 9), (Surkova et al., 2008a).

Вариабельность полосы 3 *eve*, формирующейся в позиции, соответствующей постериорной границе раннего паттерна, уже во временном классе 2 составляет примерно 1 % ДЭ – тем самым, вариабельность экспрессии *eve*

в этой А–П позиции со временем снижается более чем в 3 раза (Рис. 26). Уровень позиционной вариабельности экспрессии *eve*, как и таковой у генов *gar*, не меняется статистически значимо начиная с середины цикла 14А (Суркова и др. 2008а, Surkova et al., 2008а). В таблице 10 приведены значения стандартных отклонений для максимумов полос 3 и 7 *eve* во временных группах 2 и 4.

Позиционирование полос экспрессии остальных рассмотренных генов pair-rule (*ftz*, *h*, *run* и *odd*) в середине цикла 14А также достигает точности в 1% ДЭ (Табл. 11). В некоторых случаях мы видим некоторое увеличение позиционной ошибки на краях эмбриона, однако это, по-видимому, обусловлено некоторой экспериментальной вариабельностью, связанной с Д–В ориентацией эмбрионов на препаратах (Surkova et al., 2008а).

Ген/Полоса	1	2	3	4	5	6	7
<i>ftz</i> (N=28)	1.4	1.1	1.0	1.1	1.3	1.7	1.8
<i>h</i> (N=19)	1.3	1.2	1.1	0.8	0.9	0.9	1.6
<i>run</i> (N=7)	0.7	0.8	0.6	1.0	0.9	1.1	1.6
<i>odd</i> (N=16)	1.0	1.3	1.0	0.7	0.9	1.9	–

Таблица 11: Пространственная вариабельность полос экспрессии генов pair-rule у эмбрионов дикого типа во временном классе T5. Показаны стандартные отклонения А–П позиций максимумов полос, *N* – размер выборки (Surkova et al., 2008а).

5.6 Пространственная вариабельность экспрессии генов у мутантов по генам *gar*

Ниже будет показано, как мутации в генах *Kr* и *kni* влияют на пространственную вариабельность экспрессии других генов сегментации. Как было показано в предыдущем разделе, у эмбрионов дикого типа высокий уровень позиционной вариабельности экспрессии материнских генов *bcd* и *cad* динамически уменьшается на уровне экспрессии зиготических генов (Surkova et al., 2008а, Суркова и др. 2008а).

Уровень пространственной вариабельности задней области экспрессии

зиготического гена *gt* существенно меняется со временем как у эмбрионов дикого типа, так и у мутантов по *Kr*. У эмбрионов дикого типа уровень ранней вариабельности, равный 2.8 % ДЭ, к моменту гаструляции падает до 1.2 % ДЭ. У мутантов по *Kr* мы наблюдаем похожую тенденцию, но ранняя вариабельность *gt* имеет крайне высокий уровень (SD = 4.6 % ДЭ), сравнимый с таковым у генов материнского происхождения *bcd* и *cad* (Табл. 9 и 8), (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Однако к концу цикла 14А стандартное отклонение снижается до 1.7% ДЭ, и, в соответствии с результатами F-теста, его значение статистически значимо не отличается от наблюдаемого у эмбрионов дикого типа в данный момент времени. Причем, такое снижение пространственной вариабельности во времени коррелировано со сдвигом области Gt более чем на 13% ДЭ в anteriорном направлении (Табл. 9, Рис. 22С) и 28).

У двойных мутантов по *Kr;kni* уровень позиционной ошибки постериорной области экспрессии *gt* является очень высоким, но, в отличие от такового у одиночных мутантов по *Kr*, он не снижается с течением времени (Табл. 9).

Позиционная вариабельность задней области экспрессии *hb* у мутантных эмбрионов в первой половине цикла 14А в 2–3 раза выше, чем у эмбрионов дикого типа (Табл. 9). Интересно, что этот уровень не снижается со временем как у одиночных мутантов по *Kr* и *kni*, так и у двойных мутантов *Kr;kni*.

Как и в случае постериорной области экспрессии *hb*, у одиночных мутантов позиционная вариабельность полосы 7 Eve остается высокой в течение всего цикла 14А (Табл. 10) и статистически значимо отличается от таковой у эмбрионов дикого типа (Surkova et al., 2013). Однако в отличие от нуль-мутантов, у *Kr+ / Kr-* гетерозигот вариабельность полосы 7 Eve уменьшается к концу цикла 14А (Табл. 10). Это снижение происходит параллельно с изменением формы паттерна *eve* от мутантной к приближенной к дикому типу (см. выше, Рис. 16).

Полосы Eve, расположенные более anteriорно, не обнаруживают высо-

кой пространственной вариабельности во всех генотипах, как показано в таблице 10 на примере полосы 3.

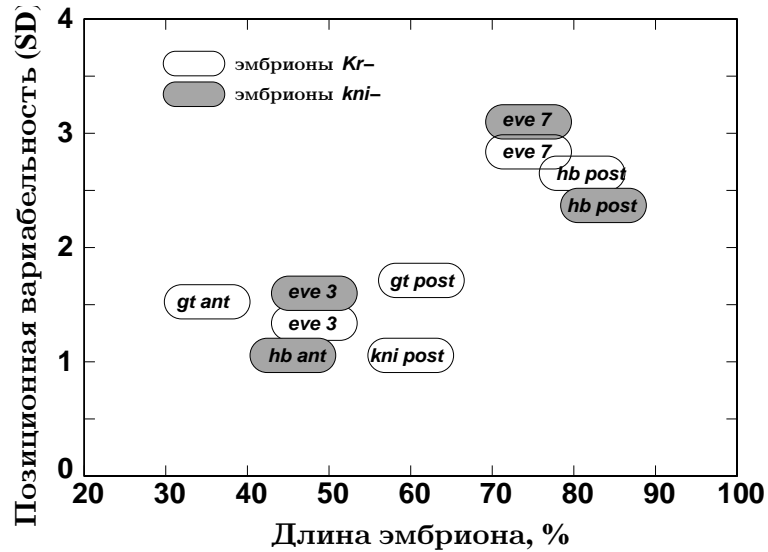


Рис. 27: Зависимость уровня пространственной вариабельности от А–П позиций областей экспрессии у одиночных нуль-мутантов по *Kr* и *kni*. Вариабельность позиций областей экспрессии генов у нуль-мутантов по *Kr* и *kni* показана для временной группы 4. Значения стандартных отклонений (SD) соответствуют характерным чертам областей экспрессии генов, показанных в таблицах 9 и 10. Задняя граница anteriорного домена Hb у нуль-мутантов по *Kr* имеет высокий уровень позиционной вариабельности равный 2.4% ДЭ, но он здесь не визуализирован, т.к., по всей видимости, обусловлен дефектом формирования полосы PS4 у этих мутантов (см. Рис. 13M).

Пространственная вариабельность anteriорной области экспрессии *gt* и постериорной области *kni* у нуль-мутантов по *Kr* (Табл. 9), а также центральной области экспрессии *Kr* у нуль-мутантов по *kni*, тоже имеет низкий уровень, сравнимый с таковым у эмбрионов дикого типа. Антериорная область экспрессии *hb* у эмбрионов *Kr*- и *kni*- имеет высокий уровень вариабельности во временной группе 1, но у эмбрионов *kni*- этот уровень уменьшается в два раза в более позднем цикле 14A, и в это время не имеет статистически значимого отличия от такового эмбрионов дикого типа (Табл. 9). Однако обнаружилось, что у нуль-мутантов по *Kr* пространственная вариабельность anteriорной области *hb* увеличивается в конце цикла 14A. (Табл. 9). Это предположительно связано с дефектом постериорной границы полосы PS4 *hb*, наблюдаемого у этих мутантов (Рис. 13M). Отсутствие увеличения вариабельности anteriорной области *hb* в конце цикла 14A у нуль-мутантов по *kni* подтверждает эту гипотезу (Surkova et al., 2013).

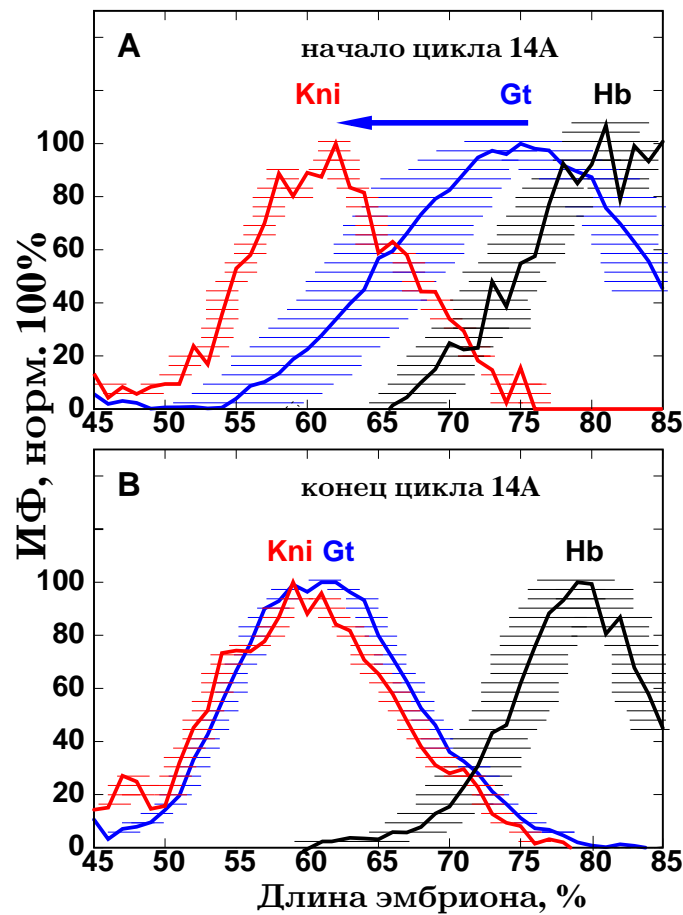


Рис. 28: Зависимость пространственной вариабельности от А–П позиций областей экспрессии у одиночных мутантов. (А–В) Задние области экспрессии *kni*, *gt* и *hb* у нуль-мутантов по *Kr* показаны для (А) временного класса 1 и (В) временного класса 8. Экспрессия во всех областях нормирована на максимальный уровень. Пунктирными горизонтальными линиями обозначен разброс позиций границ областей экспрессии в А–П направлении. Вариабельность постериорной области экспрессии *gt* уменьшается по мере её сдвига к позиции области экспрессии *kni* перед гастрულიацией (Surkova et al., 2013).

У двойных мутантов *Kr;kni* позиционная ошибка anteriорных областей экспрессии *gt* и *hb*, увеличена по сравнению с эмбрионами дикого типа, и при этом ее уровень не снижается со временем – так же, как и в постериорных областях экспрессии этих генов (Табл. 9). Во временной группе 4 уровни вариабельности позиций областей экспрессии у двойных мутантов и эмбрионов дикого типа различаются статистически значимо (Surkova et al., 2013).

5.7 Заключение по главе 5

В данной главе была подробно рассмотрена вариабельность экспрессии генов сегментации, принадлежащих к разным уровням этого регуляторного каскада. Исследование было проведено как для эмбрионов дикого типа, так и для нуль-мутантов и гетерозигот по генам *gap*. Последнее позволило выяснить, насколько вариабельность фенотипов личинок, наблюдаемая у мутантов, проявляется на молекулярном уровне в раннем эмбриональном развитии в период детерминации сегментов.

В результате, показано, что все типы вариабельности, присущие картинам экспрессии генов дикого типа, динамически снижаются к началу гаструляции – времени детерминации парасегментов. Однако у нуль-мутантов в это время наблюдалась повышенная пространственная вариабельность экспрессии, а также вариабельность относительных уровней экспрессии *eve* и *ftz*, определяющих относительную ширину четных и нечетных парасегментов.

Ниже данные выводы будут рассмотрены подробнее в контексте концепции канализации Уоддингтона, а также современных представлений о механизмах регуляции сегментации у насекомых.

5.7.1 Динамическое уменьшение вариабельности экспрессии генов у эмбрионов дикого типа в процессе развития

В главе 5 показано, что ранние картины экспрессии генов у эмбрионов дикого типа иллюстрируют собой разнообразие возможных траекторий развития. Это четко продемонстрировано на примере ранних паттернов *pair-rule*, где полосы могут образовываться в разной последовательности, в разное время и разными способами (Рис. 9D,F, 18). Такая вариабельность представляет собой разительный контраст с низковариабельными паттернами, наблюдаемыми у эмбрионов в конце цикла 14А и состоящими из 7-ми полос практически одинаковой формы (Рис. 9E,G), (Суркова и др. 2008b, Surkova et al., 2008a, Суркова и др. 2011).

Эти результаты могут служить иллюстрацией феномена канализации, предложенного К. Уоддингтоном (Waddington, 1942) (см. Обзор литературы), демонстрируя, что детерминация сегментов на стадии бластодермы не осуществляется по фиксированному пути, т.е. по одной траектории развития. Напротив, существует целый ряд траекторий, совместимых с жизнеспособностью, которые сходятся к моменту начала гаструляции.

Исследование пространственной вариабельности экспрессии позволяет сделать аналогичные заключения. У эмбрионов дикого типа высокий уровень позиционной вариабельности, свойственный материнским градиентам, динамически уменьшается в процессе развития на уровне экспрессии зиготических генов-мишеней (Рис. 26). Очевидно, что частичное снижение позиционной вариабельности, свойственной градиенту *Vcd*, уже происходит на уровне экспрессии генов *gap* к циклу деления 13. Уменьшение вариабельности продолжается во временном классе 1, и завершается во временном классе 2. На уровне экспрессии генов *pair-rule* снижение вариабельности начинается позже, но происходит быстрее: во временном классе 1 вариабельность экспрессии *eve* сравнима с таковой у *bcd*, но к временному классу 3 ее уровень сравним с наблюдаемым у генов *gap* (Surkova et al., 2008a, Суркова и др. 2008b), (Рис. 26).

5.7.2 Повышенная вариабельность экспрессии генов сегментации у мутантов по генам *gap*

Несмотря на то, что экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа свойственны разные формы вариабельности, буферизация вариабельности в процессе развития приводит к формированию устойчивых фенотипов личинок. В отличие от эмбрионов дикого типа, у эмбрионов, нullo-мутантных по генам *Kr* и *kni* наблюдаются пространственно локализованные дефекты кутикулы личинки, которые в случае эмбрионов *Kr*- существенно варьируются от эмбриона к эмбриону (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980, Wieschaus et al., 1984) (Рис. 2B). Таким образом, изучение разных ви-

дов вариабельности экспрессии генов сегментации у этих мутантов позволяет предположить, какой из них ответственен за вариабельность фенотипов личинок.

Как было показано в главе 3, у нуль-мутантов по *Kr* паттерн экспрессии гена *eve* претерпевает существенные изменения в течение всего цикла 14А, при этом какие-то полосы разделяются, а какие-то сливаются. Мы изучили, в какой степени эта динамика сказывается на вариабельности формы паттернов.

Как и у эмбрионов дикого типа, у эмбрионов *Kr*- форма паттернов экспрессии *eve* существенно варьирует между индивидуальными эмбрионами в период формирования полос. Это наблюдается как в области 2–3, так и в области 4–6 (Рис. 25А–D). Однако к моменту гаструляции вариабельность в области 4–6 значительно снижается, тогда как область 2–3 все еще остается вариабельной (Рис. 25Е–Н). Более того, у индивидуальных эмбрионов *Kr*- поздние паттерны *eve* и *ftz* в этой области не являются коплементарными и уровни их экспрессии варьируют независимо друг от друга (Рис. 25J,К), что обычно свойственно для ранних паттернов этих генов (Рис. 25I), (Surkova et al., 2013).

Из ранее опубликованных работ хорошо известно, что у эмбрионов дикого типа относительные уровни экспрессии *eve* и *ftz* до окончания формирования клеточных мембран в цикле 14А определяют относительные размеры нечетных и четных парасегментов (Fujioka et al., 1995, Hughes and Krause, 2001, Fujioka et al., 2002). Это осуществляется путем регуляции гена *segment-polarity en* посредством промежуточных регуляторов, включающих *odd*, *slp* и *prd* (Jaynes and Fujioka, 2004, Swantek and Gergen, 2004). Однако детали механизма, лежащего в основе включения генов *segment-polarity* генами *pair-rule*, до конца не исследованы.

На основе результатов, описанных в этой главе, можно предположить, что вариабельность относительных уровней Eve и Ftz в районе 40–55 % ДЭ, наблюдаемая в течение цикла 14А (Рис. 25), может влиять на точность детерминации границ парасегментов. Это предположение находится

в соответствии с тем, что вариабельность фенотипов личинок, обнаруживаемая у нуль-мутантов по *Kr*, повышена именно в антериорной части измененной кутикулы. Таким образом, высоковариабельная область экспрессии, включающая полосы 2 и 3, предположительно, дает начало вариабельным структурам, расположенным антериорно, и характеризуемым в литературе как 6-й абдоминальный сегмент (A6) (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980, Wieschaus et al., 1984, Ingham et al., 1986), (Рис. 2В). Постериорная часть измененной кутикулы, имеющая значительно меньшую фенотипическую вариабельность, а также нормальный, но увеличенный сегмент А7 могут соответствовать области 4–6, вариабельность которой канализируется к гастрюляции.

Несмотря на описанный выше эффект, определяемый вариабельностью уровней экспрессии генов в антериорной части эмбриона, пространственная вариабельность экспрессии генов у одиночных мутантов четко показала отсутствие канализации в постериорной части эмбриона (Табл. 9 и 10, Рис. 27), (Surkova et al., 2013).

Это повышение вариабельности также сопровождается нарушениями в зиготической регуляции, проявляющейся у мутантов по *Kr* в сильно заниженной постериорной экспрессии *kni* и большим сдвигом постериорной области экспрессии *gt* (Рис. 11). Нелокальная природа этих эффектов позволяет предположить, что они являются производными общей регуляторной структуры постериорной части бластодермы. Это подтверждает тот факт, что позиционная вариабельность увеличена не только у нуль-мутантов по *Kr* и *kni*, но и у нуль-мутантов по терминальному гену *gap tll* (Janssens et al., 2013).

Это явление может быть интерпретировано с эволюционной точки зрения. Как и у других насекомых, имеющих тип развития с длинной зародышевой полоской, предками дрозофилы являются насекомые с короткой зародышевой полоской, у которых детерминация сегментов не происходит одновременно, а сегменты добавляются последовательно к постериорному концу эмбриона после гастрюляции (Damen, 2007). У позвоночных этот процесс ре-

гулируется механизмом, характеризуемым осциллирующей экспрессией генов. Недавно циклическая экспрессия генов pair-rule *odd* (*Tc-odd*) и *eve* (*Tc-eve*) была обнаружена в постериорной зоне роста жука *Tribolium castaneum*, имеющего тип развития с короткой зародышевой полоской (Sarrazin et al., 2012, El-Sherif et al., 2012). Более того, волны экспрессии *Tc-eve*, распространяющиеся от постериорного полюса, были обнаружены даже на стадии бластодермы (El-Sherif et al., 2012). Эти результаты находятся в соответствии с гипотезой о том, что функция генов pair-rule была наследственно связана с часами сегментации, а впоследствии в ходе эволюции сформировался механизм регуляции генами гар, лежащий в основе сегментации у дрозофилы (Peel and Akam, 2003). Таким образом, наследственно определенная нестабильность экспрессии генов сегментации в постериорной части эмбриона дрозофилы может определять повышенную вариабельность экспрессии генов у одиночных мутантов по генам гар.

В отличие от одиночных мутантов по генам гар, у двойных мутантов *Kr;kni* позиционная вариабельность экспрессии генов является высокой как для антериорных, так и для постериорных областей экспрессии, и ее уровень не уменьшается со временем. Таким образом, можно заключить, что если продукты двух генов гар удаляются из регуляторной системы сегментации, пространственная точность экспрессии теряется вдоль всей А–П оси эмбриона (Surkova et al., 2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей диссертационной работе впервые проведен комплексный анализ количественных данных по экспрессии генов сегментации у эмбрионов, мутантных по генам *Kr* и *kni*, в сравнении с эмбрионами дикого типа. Таким образом, представлена количественная характеристика основных детерминант морфогенетического поля сегментации у дрозофилы. Особое внимание уделено применению точных количественных данных к исследованию таких важных биологических вопросов, как влияние мутаций на характер интерпретации позиционной информации в раннем эмбрионе, а также варибельности и канализации экспрессии генов.

Первый этап работы заключался в описании количественных данных по экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа и мутантных с временным разрешением в 6.5 минут развития и пространственным разрешением в 1 ядро эмбриона (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Опубликованные ранее данные, в основном, имели качественный характер, т.е. были основаны на визуальном анализе изображений картин экспрессии. Этапы получения и обработки количественных данных описаны в главе 2 “Материалы и Методы”. Для мутантных эмбрионов была произведена модификация методов построения пространственно–временного набора данных экспрессии генов в части регистрации картин экспрессии генов.

На основе количественных данных детально охарактеризована динамика экспрессии 14-ти генов сегментации у эмбрионов дикого типа (Surkova et al., 2008a) и 5-ти генов у нуль-мутантов по *Kr* и *kni*, двойных мутантов *Kr;kni*, а также, гетерозигот *Kr+ / Kr-* и *kni+ / kni-* (Surkova et al., 2013). Ниже приведены несколько примеров новых результатов, полученных на основе анализа количественных данных. Результаты анализа изложены в главе 3.

В данной работе показано, что в конце цикла дробления 14А уровни экспрессии генов *gar* у эмбрионов дикого типа убывают, что предположительно связано с убыванием материнских градиентов, являющихся положительными

ми регуляторами этих генов. Однако было выявлено, что у нуль-мутантов по генам *Kr* и *kni* происходит общее снижение уровней экспрессии генов *gap*, причем в большей степени, чем у эмбрионов дикого типа (Рис. 12) (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Этот результат является неожиданным, так как существует множество доказательств, что в основе взаимодействий между генами *gap* лежит взаимная репрессия (Jaeger, 2011). Результаты исследований *in silico* дали объяснение этому факту в отношении некоторых постериорных областей экспрессии. Согласно этим результатам, снижение уровня экспрессии в постериорной области *gt* у нуль-мутантов по гену *Kr* зависит от её смещения в район более низких концентраций активатора *Cad* (Рис. 8B). При этом А-П позиция области *gt* совмещается с позицией постериорной области экспрессии *kni* и репрессирует экспрессию в этой области, что и вызывает резкое снижение уровня экспрессии *kni* (Рис. 22C,F) (Kozlov et al., 2012, Козлов, 2012). Тем не менее, у нуль-мутантов по гену *kni* А-П позиция постериорной области экспрессии *gt* не смещена в сторону низких концентраций *Cad*, однако уровень экспрессии *gt* у этих мутантов существенно занижен – как и у эмбрионов *Kr*- (Kraut and Levine, 1991a). Таким образом, явление снижения уровней экспрессии генов *gap* у мутантов имеет системный характер и подчеркивает необходимость интактной системы взаимодействий для поддержания уровней экспрессии генов *gap* (Surkova et al., 2013).

К существенным закономерностям, выявленным в данной работе с помощью количественных данных, также принадлежит впервые детально рассмотренная временная динамика экспрессии гена *eve* у гетерозигот *Kr+ / Kr-*. Показано, что у эмбрионов, принадлежащих к ранним временным классам цикла 14А, форма паттернов *eve* близка к таковой у нуль-мутантов по *Kr*, но как к концу цикла 14А форма паттернов становится близкой к таковой у эмбрионов дикого типа (Surkova et al., 2013). Предложена гипотеза, что данное явление может иллюстрировать понятие канализации, введенное К. Уоддингтоном (Waddington, 1942), при котором в процессе развития происходит коррекция мутантного фенотипа. Это явление может объясняться

тем, что крайне низкие концентрации *Kr* в ранний период времени способны формировать только паттерн *eve*, сходный с мутантным. Однако последующее повышение уровня *Kr* приблизительно до 1/2 от присутствующего в диком типе, оказывается достаточным для формирования паттерна, состоящего из 7-ми полос. и обеспечивая таким образом выживаемость гетерозигот (Frasch and Levine, 1987).

На следующем этапе, результаты которого изложены в главе 4, был произведен анализ пространственной динамики экспрессии генов сегментации у эмбрионов, мутантных по генам *Kr* и *kni*, в сравнении с эмбрионами дикого типа. Ранее было показано, что в эмбрионах дрозофилы дикого типа позиционная информация устанавливается динамически, т.е. материнские морфогенетические градиенты обладают скорее инструктирующей, чем определяющей ролью в установлении позиционной информации в эмбрионе. Это выражается в том, что области экспрессии зиготических генов существенно сдвигаются после изначального определения их позиций материнскими градиентами (Jaeger et al., 2004a, Самсонова, 2008, Surkova et al., 2008a).

В данной работе был рассмотрен характер интерпретации позиционной информации у эмбрионов, несущих нуль-мутации в генах *gar*, которые являются важнейшими зиготическими регуляторами процесса детерминации сегментов. Рассматриваемые мутации приводят к существенным дефектам развития, а именно, к делеции у мутантных личинок протяженных участков, включающих несколько смежных сегментов. В эмбрионах на стадии бластодермы отсутствие экспрессии генов *gar* выражается в существенном изменении характера экспрессии других зиготических генов. Целью данного этапа работы было выявить, как устанавливается позиционная информация в эмбрионе при наличии столь существенных дефектов сегментации. Следовало ожидать, что характер сдвигов областей экспрессии будет существенно изменен в сравнении с эмбрионами дикого типа.

Тем не менее было выявлено, что у нуль-мутантов по *Kr*, *kni*, и двойных мутантов *Kr;kni*, как и у эмбрионов дикого типа, сдвиги наиболее выражены в постериорной области эмбриона, направлены к anteriорному концу

эмбриона, и у одиночных мутантов приводят к сужению областей экспрессии генов со временем (Surkova et al., 2013). Можно предположить, что у нуль-мутантов позиционная информация устанавливается путем действия регуляторных механизмов, сходных с выявленными ранее для эмбрионов дикого типа, у которых сдвиги областей экспрессии генов в anteriорном направлении происходят за счет репрессии со стороны соседних областей, расположенных более постериорно (Jaeger et al., 2004a). Эта гипотеза нашла частичное подтверждение в исследованиях, осуществленных с помощью математического моделирования, где было показано, что существенный сдвиг постериорной области *gt* у эмбрионов *Kr*- происходит за счет репрессии со стороны постериорной области экспрессии *hb* (Kozlov et al., 2012).

Анализ пространственных сдвигов у нуль-мутантов по генам *gap* также позволяет предположить, что у этих эмбрионов, как и у эмбрионов дикого типа, наиболее сильная репрессия свойственна для областей экспрессии генов *gap*, не граничащих друг с другом (Jaeger et al., 2004b, Surkova et al., 2013).

В целом можно отметить, что для мутантных эмбрионов, так же, как и для эмбрионов дикого типа, свойственен динамический характер интерпретации генами-мишенями пространственной информации, заложенной в морфогенетических градиентах. Таким образом, характер позиционирования в данной системе ближе к концепции морфогенетического поля с его регуляторными свойствами, чем к теории статического определения позиционной информации Л. Волперта (Wolpert, 1969).

На заключительном этапе работы было произведено исследование вариабельности экспрессии на разных уровнях действия регуляторного каскада генов сегментации. Высокоточные данные по экспрессии генов сегментации позволили проверить концепцию канализации развития К. Уоддингтона о том, что организмы дикого типа, в отличие от мутантов, обладают способностью подавлять на уровне фенотипа как генетическую вариабельность, так и вариабельность, обусловленную влиянием окружающей среды (Waddington, 1942, Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Результаты

этой части работы изложены в главе 5.

Установлено, что в процессе развития эмбриона дрозофилы дикого типа происходит динамическое уменьшение всех видов вариабельности, свойственной системе генов сегментации (Суркова и др. 2008b, Surkova et al., 2008a, Суркова и др. 2011). Показано, что экспрессия материнских генов, лежащих в основе каскада экспрессии генов сегментации, характеризуется высоким уровнем пространственной вариабельности (Houchmandzadeh et al., 2002, Surkova et al., 2008a, Суркова и др., 2011). Тем не менее эта вариабельность значительно снижается на уровне экспрессии зиготических генов-мишеней, причем, это снижение происходит постепенно, и к концу цикла дробления 14А все гены *gap* и *pair-rule* экспрессируются с высокой пространственной точностью (Surkova et al., 2008a, Суркова и др. 2008b, Manu et al., 2009b, Суркова и др. 2011). С помощью математического моделирования в работе Ману и др. было показано, что в основе механизма уменьшения пространственной вариабельности экспрессии генов *gap* у эмбрионов дикого типа лежат кросс-регуляторные взаимодействия между этими генами (Manu et al., 2009a).

Также установлено, что у эмбрионов дикого типа к моменту начала гаструляции происходит снижение не только пространственной вариабельности экспрессии зиготических генов, но также и вариабельности уровней экспрессии, времени, типа и последовательности формирования областей экспрессии. В контексте концепции канализации Уоддингтона это может показывать, что в системе сегментации не существует фиксированного пути развития, а есть целый ряд траекторий развития, совместимых с жизнеспособностью, которые сходятся к моменту начала гаструляции (Surkova et al., 2008a, Суркова и др., 2011).

Канализация экспрессии генов в процессе развития эмбрионов дикого типа приводит к формированию устойчивых фенотипов личинок. В отличие от эмбрионов дикого типа, у эмбрионов, нуль-мутантных по генам *gap* *Kr* и *kni*, наблюдаются пространственно локализованные дефекты кутикулы личинки, которые в случае эмбрионов *Kr*- существенно варьируют от

эмбриона к эмбриону (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980, Wieschaus et al., 1984), (Рис. 2В). Таким образом, изучение разных форм варибельности экспрессии генов сегментации у мутантов по генам *gar* позволяет выявить, какие из них могут определять варибельность фенотипов личинок. В данной работе выявлено, что у эмбрионов, мутантных по гену *Kr*, наблюдается варибельность относительных концентраций продуктов генов *eve* и *ftz* в области полос 2 и 3, которая не снижается в течение всего цикла 14А (Surkova et al., 2013). Этот результат является важным, так как известно, что у эмбрионов дикого типа именно относительные уровни экспрессии *eve* и *ftz* определяют относительные размеры нечетных и четных парасегментов (Fujioka et al., 1995, Hughes and Krause, 2001, Fujioka et al., 2002). В работе предложена гипотеза, что именно варибельность относительных уровней *Eve* и *Ftz* в области полос 2 и 3 может определять варибельность фенотипов мутантных личинок, так как территориально совпадает с областью варибельных кутикулярных фенотипов (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980, Wieschaus et al., 1984, Ingham et al., 1986), (Рис. 2В и 25).

Тем не менее, исследование пространственной варибельности экспрессии генов у одиночных мутантов по *Kr* и *kni* показало, что у этих эмбрионов варибельность позиций областей экспрессии повышена в постериорной части эмбриона (Surkova et al., 2013). Предложена гипотеза, позволяющая интерпретировать отсутствие канализации в постериорной части эмбриона у одиночных мутантов по генам *gar* с эволюционной точки зрения. Она основана на недавних исследованиях характера экспрессии генов *pair-rule* у жука *Tribolium castaneum*, принадлежащего к насекомым, имеющим тип развития с короткой зародышевой полоской, и являющимися предками дрозофилы. Эти исследования показали, что в постериорной зоне роста *Tribolium castaneum* экспрессия генов *odd* (*Tc-odd*) и *eve* (*Tc-eve*) имеет циклический характер, что аналогично осциллирующей экспрессии генов, лежащей в основе сегментации у позвоночных (Sarrazin et al., 2012, El-Sherif et al., 2012). Таким образом, повышенная варибельность экспрессии генов у одиночных мутантов по генам *gar* может являться проявлением наслед-

ственно детерминированной нестабильности экспрессии генов сегментации в постериорной части эмбриона.

В отличие от одиночных мутантов по генам *gar*, у двойных мутантов *Kr;kni* пространственная точность экспрессии теряется вдоль всей А–П оси эмбриона (Surkova et al., 2013).

Результаты, изложенные в главе 5, на уровне экспрессии генов подтверждают концепцию канализации развития К. Уоддингтона, в основе которой лежит идея о подавлении вариабельности у организмов дикого типа, но не у мутантных (Waddington, 1942).

Представленные в главах 2–5 результаты полностью обосновывают основные положения и выводы, сформулированные в данной диссертации. Результаты работы опубликованы в 14-ти статьях в рецензируемых научных изданиях.

ВЫВОДЫ

1. Определено, что нуль-мутации в генах *gar*, приводящие к существенным изменениям экспрессии генов сегментации в эмбрионе дрозофилы, не меняют направление и локализацию пространственных сдвигов областей экспрессии зиготических генов. Это предполагает действие сходных регуляторных механизмов интерпретации позиционной информации зиготическими генами у эмбрионов дикого типа и мутантных;
2. Выявлено, что уровни экспрессии всех генов *gar* у эмбрионов, нуль-мутантных по генам *Kr*, *kni* и у двойных мутантов *Kr;kni*, существенно занижены по сравнению с таковыми у эмбрионов дикого типа, что не согласуется с ролью этих генов как репрессоров транскрипции;
3. Установлено, что в процессе развития эмбриона дрозофилы дикого типа происходит динамическое уменьшение всех видов вариабельности экспрессии, свойственной системе генов сегментации. Это включает уменьшение вариабельности уровней экспрессии генов, времени и последовательности формирования областей экспрессии, а также пространственной вариабельности областей экспрессии;
4. Выявлено, что у эмбрионов дрозофилы, нуль-мутантных по гену *gar* *Kr*, относительные уровни экспрессии генов *pair-rule eve* и *ftz*, которые определяют относительные размеры нечетных и четных парасегментов, остаются вариабельными в течение всего цикла 14А в области полос 2–3, что соответствует локализации вариабельных дефектов кутикулы у личинок *Kr*-;
5. Определено, что у одиночных нуль-мутантов по генам *Kr* и *kni* высокий уровень пространственной вариабельности экспрессии зиготических генов сегментации в процессе развития не снижается в постериорной части эмбриона дрозофилы, а двойных мутантов *Kr;kni* – во

всем эмбрионе. Выводы 3–5 служат подтверждением концепции канализации развития К. Уоддингтона, в основе которой лежит идея о подавлении вариабельности у организмов дикого типа, но не у мутантных.

Список цитированной литературы

1. Белоусов Л. В. Основы общей эмбриологии.- Наука, Изд-во Московского университета, Москва, Россия, 2005.
2. Гилберт С. Биология развития.- Изд-во Мир, Москва, Россия, 1994.
3. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика.- Сибирское университетское изд-во, Новосибирск, Россия, 2003.
4. Козлов К. Н. Реконструкция регуляторной сети генов сегментации в эмбрионе дрозофилы по экспериментальным данным - изображениям картин активности генов; Санкт-Петербург. – 2012.
5. Самсонова М. Г. Динамика экспрессии генов сегментации у дрозофилы : Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук; Санкт-Петербург. – 2008.
6. Суркова С.Ю., Мясникова Е.М., Козлов К.Н., Самсонова А.А., Райниц Дж. и Самсонова М.Г. Методы получения количественных данных из кон окальных изображений картин экспрессии генов *in situ* // Цитология.- 2008а.- Т. 50, 4.- С. 352- 369.
7. Суркова С. Ю., Мясникова Е. М., Райниц Дж., Самсонова М. Динамическая фильтрация вариабельности картин экспрессии зиготических генов сегментации у дрозофилы // Биофизика.- 2008b.- Т. 53, N 3.- С. 475-81.
8. Суркова С. Ю., Гурский В. В., Райниц Дж., Самсонова М. Изучение механизмов устойчивости раннего эмбрионального развития плодовой мушки дрозофилы // Онтогенез.- 2011.- Т. 42, 1.- С. 3-19.
9. Akam Mihael. The Moleular Basis for Metameric Pattern in the *Drosophila* Embryo // Development. – 1987. – Vol. 101. – P. 1-22.
10. Berleth T., Burri M., Thoma G., Bopp D. Richstein S., Frigerio G., Noll M. and C. Nusslein-Volhard. The role of localization of *bicoid* RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo // The EMBO Journal. – 1988. – Vol. 7. – P. 1749-1756.
11. Boring L., Weir M., Schubiger G. Egg ligation alters the Bcd protein gradient and segmentation gene expression in embryo of *Drosophila* // Mechanisms

of Development. – 1993. – Vol. 42. – P. 97-111.

12. Brown L. G. A survey of image registration techniques // ACM Computing Surveys. – 1992. – Vol. 24, no. 4. – P. 325-376.

13. Brunner G., Jakle H. Control and function of terminal gap gene activity in the posterior pole region of the *Drosophila* embryo // Mechanisms of Development. – 1991. – Vol. 35. – P. 205-211.

14. Brunner G., Jakle H. Regulation and function of the terminal gap gene huckebein in the *Drosophila* blastoderm // International Journal of Developmental Biology. – 1996. – Vol. 40. – P. 157-165.

15. Campos-Ortega J. A., Hartenstein V. The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. – Heidelberg, Germany : Springer, 1985.

16. Capovilla M., Eldon E. D., Pirrotta V. The *giant* gene of *Drosophila* encodes a b-ZIP DNA-binding protein that regulates the expression of other segmentation gap genes // Development. – 1992. – Vol. 114. – P. 99-112.

17. Carroll S. B., Laughon A., S. Thalley B. Expression, function and regulation of the *hairy* segmentation protein in the *Drosophila* embryo // Genes and Development. – 1988. – Vol. 2. – P. 883-890.

18. Clyde D. E., Corado M. S., Wu X., Pare A., Papatsenko D. and Small S. A self-organizing system of repressor gradients establishes segmental complexity in *Drosophila* // Nature. – 2003. – Vol. 426. – P. 849-853.

19. Coulter Douglas E., Swaycus Elizabeth A., Beran-Koehn Monica A., Goldberg David, Wieschaus Eric and Schedl Paul. Molecular analysis of *odd-skipped*, a zinc-finger encoding segmentation gene with a novel pair-rule expression pattern // The EMBO Journal. – 1990. – Vol. 8. – P. 3795-3804.

20. Crauk O., Dostatni N. Bicoid determines sharp and precise target gene expression in the *Drosophila* embryo // Current Biology. – 2005. – Vol. 15. – P. 1888-1898.

21. Crick F. Diffusion in embryogenesis // Nature. – 1970. – Vol. 225. – P. 420-422.

22. Damen W. G. M. Evolutionary Conservation and Divergence of the Segmentation Process in Arthropods // Developmental Dynamics. – 2007. –

cVol. 236. – P. 1379-1391.

23. Davis G. K., Patel N. H. Short, long and beyond: Molecular and embryological approaches to insect segmentation // Annual Reviews in Entomology. – 2002. – Vol. 47. – P. 669-699.

24. Dequin R., Saumweber H., J J. Sedat. Proteins shifting from the cytoplasm into the nuclei during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster* // Developmental Biology. – 1984. – Vol. 104. – P. 37- 48.

25. DiNardo S., O'Farrell P. H. Establishment and refinement of segmental pattern in the *Drosophila* embryo: spatial control of engrailed expression by pair-rule genes // Genes and Development. – 1987. – Vol. 1. – P. 1212- 1225.

26. Drean B. Saulier-Le, Nasiadka A., Dong J., Krause H. M. Dynamic changes in the functions of Odd-skipped during early *Drosophila* embryogenesis // Development. – 1998. – Vol. 125. – P. 4851-4861.

27. Driever W., Nusslein-Volhard C. A gradient of Bicoid protein in *Drosophila* embryos // Cell. – 1988a. – Vol. 54. – P. 83-93.

28. Driever W., Nusslein-Volhard C. The Bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner // Cell. – 1988b. – Vol. 54. – P. 95-104.

29. Driesch Hans. The History and Theory of Vitalism. – London : MacMillan and Company, 1914. – Translated by C. K. Ogden.

30. Eldon E. D., Pirrotta V. Interactions of the *Drosophila* gap gene *giant* with maternal and zygotic pattern-forming genes // Development. – 1991. – Vol. 111. – P. 367-378.

31. El-Sherif E., Averof M., Brown S. J. A segmentation clock operating in blastoderm and germband stages of *Tribolium* development // Development. – 2012. – Vol. 139. – P. 4341-4346.

32. Ephrussi A., Johnston D. St. Seeing is believing: The Bicoid morphogen gradient matures // Cell. – 2004. – Vol. 116. – P. 143-152.

33. Foe V. E., Alberts B. M. Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis // The Journal of Cell Science. – 1983. – Vol. 61. – P. 31-70.

34. Frasch Manfred, Hoey Tim, Rushlow Christine and Levine Michael. Characterization and localization of the *even-skipped* protein of *Drosophila* // The EMBO Journal. – 1987. – Vol. 6. – P. 749-759.
35. Frasch M., Levine M. Complementary patterns of *even-skipped* and *fushi tarazu* expression involve their differential regulation by a common set of segmentation genes in *Drosophila* // Genes and Development. – 1987. – Vol. 1. – P. 981-995.
36. Fujioka M., Jaynes J. B., Goto T. Early *even-skipped* stripes act as morphogenetic gradients at the single cell level to establish engrailed expression // Development. – 1995. – Vol. 121. – P. 4371-4382.
37. Fujioka M., Emi-Sarker Y., Yusibova G. L. T., Goto T. and Jaynes J. B. Analysis of an even-skipped rescue transgene reveals both composite and discrete neuronal and early blastoderm enhancers, and multi-stripe positioning by gap gene repressor gradients // Development. – 1999. – Vol. 126. – P. 2527-2538.
38. Fujioka M., Yusibova G. L., Patel N. H., Brown S. J. and Jaynes J. B. The repressor activity of Even-skipped is highly conserved, and is sufficient to activate *engrailed* and to regulate both the spacing and stability of parasegment boundaries // Development. – 2002. – Vol. 129. – P. 4411-4421.
39. Gaul U., Jackle H. Pole region-dependent repression of the *Drosophila* gap gene *Krüppel* by maternal gene products // Cell. – 1987. – Vol. 51. – P. 549-555.
40. Gergen J. P., A. Butler B. Isolation of the *Drosophila* segmentation gene *runt* and analysis of its expression during embryogenesis // Genes and Development. – 1988. – Vol. 2. – P. 1179-1193.
41. Gilbert S. F., Opitz J. M., Raff R. A. Resynthesizing Evolutionary and Developmental Biology // Developmental Biology.– 1996. – Vol. 173. – P. 357-372.
42. Gilbert S. F. Developmental Biology. – Third edition. – Sunderland, MA : Sinauer Associates, 1991.
43. Gilbert S. F. Developmental Biology. – Seventh edition. – Sunderland, MA : Sinauer Associates, 2003.
44. Gregor T., Bialek W., de Ruyter van Steveninck R. R., Tank D. W. and

Wieschaus E. F. Diffusion and scaling during early embryonic pattern formation // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2005. – Vol. 102, no. 51. – P. 18403-18407.

45. Gregor T., Wieschaus E. F., McGregor A. P., Bialek W and Tank D. W. Stability and nuclear dynamics of the Bicoid morphogen gradient // Cell. – 2007a. – Vol. 130. – P. 141-152.

46. Gregor T., Tank D. W., Wieschaus E. F., Bialek W. Probing the limits to positional information // Cell. – 2007b. – Vol. 130. – P. 153-164.

47. Grossniklaus U., Pearson R. Kurth, Gehring W. J. The *Drosophila sloppy paired* locus encodes two proteins involved in segmentation that show homology to mammalian transcription factors // Genes and Development. – 1992. – Vol. 6. – P. 1030-1051.

48. Grossniklaus U., Cadigan K. M., Gehring W. J. Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the *Drosophila* head // Development. – 1994. – Vol. 120. – P. 3155-3171.

49. Gurdon J. B., Bourillot P.-Y. Morphogen gradient interpretation // Nature. – 2001. – Vol. 413. – P. 797-803.

50. Gutjahr T., Frei E., Noll M. Complex regulation of early paired expression: Initial activation by gap genes and pattern modulation by pair-rule genes // Development. – 1993. – Vol. 117. – P. 609-623.

51. Hafen E., Kuroiwa A., Gehring W. J. Spatial distribution of transcripts from the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* embryonic development // Cell. – 1984. – Vol. 37. – P. 833-841.

52. He F., Wen Y., Deng J. Lin X., Lu L. J., Jiao R. and Ma J. Probing Intrinsic Properties of a Robust Morphogen Gradient in *Drosophila* // Developmental Cell. – 2008. – Vol. 15. – P. 558-567.

53. Houchmandzadeh B., Wieschaus E., Leibler S. Establishment of developmental precision and proportions in the early *Drosophila* embryo // Nature. – 2002. – Vol. 415. – P. 798-802.

54. Hughes S. C., Krause H. M. Establishment and maintenance of parasegmental compartments // Development. – 2001. – Vol. 128. – P. 1109-18.

55. Hulskamp M., Lukowitz W., Beermann A., Glaser G. and Tautz D. Differential regulation of target genes by different alleles of the segmentation gene *hunchback* in *Drosophila* // Genetics. – 1994. – Vol. 138. – P. 125-134.
56. Ingham P. W., Ish-Horowicz D., Howard K. R. Correlative changes in homeotic and segmentation gene expression in *Kruppel* mutant embryos of *Drosophila* // The EMBO Journal. – 1986. – Vol. 5. – P. 1659-1665.
57. Ingham P. W. The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila* // Nature. – 1988. – Vol. 335. – P. 25-34.
58. Ingham P. W., Baker N. E., Martinez-Arias A. Regulation of segment polarity genes in the *Drosophila* blastoderm by *fushi tarazu* and *even skipped* // Nature. – 1988. – Vol. 331. – P. 73-75.
59. Jackle H., Tautz D., Schuh R., Seifert E. and Lehmann R. Cross-regulatory interactions among the gap genes of *Drosophila* // Nature. – 1986. – Vol. 324. – P. 668-670.
60. Jacob Y., Sather S., Martin J. R., Ollo R. Analysis of *Kruppel* control elements reveals that localized expression results from the interaction of multiple subelements // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1991. – Vol. 88. – P. 5912-5916.
61. Jaeger J., Surkova S., Blagov M., Janssens H., Kosman D., Kozlov K., Manu, Myasnikova E., Vanario-Alonso C.E., Samsonova M., Sharp D.H. and Reinitz J. Dynamic control of positional information in the early *Drosophila* embryo // Nature. – 2004a. – Vol. 430. – P. 368-371.
62. Jaeger J., Blagov M., Kosman D., Kozlov K. N., Manu, Myasnikova E., Surkova S., Vanario-Alonso C. E., Samsonova M., Sharp D. H., Reinitz J. Dynamical analysis of regulatory interactions in the gap gene system of *Drosophila melanogaster* // Genetics. – 2004b. – Vol. 167. – P. 1721-1737.
63. Jaeger J., Sharp D. H., Reinitz J. Known maternal gradients are not sufficient for the establishment of gap domains in *Drosophila melanogaster* // Mechanisms of Development. – 2007. – Vol. 124. – P. 108-128.
64. Jaeger Johannes. The gap gene network // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2011. – Vol. 68. – P. 243-274.

65. Janssens H., Kosman D., Vanario-Alonso C. E., Jaeger J., Samsonova M. and Reinitz J. A high- throughput method for quantifying gene expression data from early *Drosophila* embryos // Development, Genes and Evolution. – 2005. – Vol. 215. – P. 374-381.
66. Janssens H., Crombach A., Wotton K.R., Cicin-Sain D., Surkova S., Lu Lim C., Samsonova M., Akam M. and Jaeger J. Lack of *tailless* leads to an increase in expression variability in *Drosophila* embryos // Developmental Biology. – 2013. – Vol. 377(1). – P.305-17.
67. Jaynes J. B., Fujioka M. Drawing lines in the sand: *even-skipped* et al. and parasegment boundaries // Developmental Biology. – 2004. – Vol. 269. – P. 609-622.
68. Johnston D. St, Driever W., Berleth T., Richstein S. and Nusslein-Volhard C. Multiple steps in the localization of *bicoid* mRNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte // Development (Supplement). – 1989. – Vol. 107. – P. 13-19.
69. Kania M. A., Bonner A. S., Du-y Joseph P., Gergen J. Peter. The *Drosophila* segmentation gene *runt* encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system // Genes and Development. – 1990. – Vol. 4. – P. 1701-1713.
70. Karr T. L., Weir M. P., Ali Z., Kornberg T. Patterns of *engrailed* protein in early *Drosophila* embryos // Development. – 1989. – Vol. 105. – P. 605-612.
71. Keraenen Soile V. E., Fowlkes C., Luengo C., Sudar D., Knowles D. W., Malik J. and Biggin M. D. 3D Morphology and Gene Expression in the *Drosophila* Blastoderm at Cellular Resolution II: Dynamics // Genome Biology. – 2006. – Vol. 7. – P. R124.
72. Kilchherr F., Bopp S., Frei D., Noll M. Isolation of the *paired* gene in *Drosophila* and its spatial expression during early embryogenesis // Nature. – 1986. – Vol. 321. – P. 493-499.
73. Knipple D. C., Seifert E., Rosenberg U. B., Preiss A. and Jackle H. Spatial and temporal patterns of *Kruppel* gene expression in early *Drosophila* embryos // Nature. – 1985. – Vol. 317. – P. 40-44.

74. Kosman D., Small S., Reinitz J. Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to *Drosophila* segmentation proteins // Development, Genes and Evolution. – 1998. – Vol. 208. – P. 290-294.
75. Kozlov K., Myasnikova E., Pisarev A., Samsonova, M., Reinitz, J. A method for two-dimensional registration and construction of the two-dimensional atlas of gene expression patterns *in situ* // In Silico Biology. – 2002. – Vol. 2. – P. 125-141.
76. Kozlov Konstantin. ProStack: a new platform for image analysis // Proceedings of the CSHL Conference Computational Cell Biology. – 2008.
77. Kozlov K. N., Myasnikova E., Samsonova A. A., Surkova S., Reinitz J. and Samsonova M. GCPReg package for registration of the segmentation gene expression data in *Drosophila* // Fly. – 2009. – Vol. 3. – P. 151-156.
78. Kozlov K., Surkova S., Myasnikova E., Reinitz J., Samsonova M. Modeling of gap gene expression in *Drosophila Kruppel* mutants // PLoS Comput. Biol. – 2012. – Vol. 8. – P. e1002635.
79. Kraut R., Levine M. Mutually repressive interactions between the gap genes giant and *Kruppel* define middle body regions of the *Drosophila* embryo // Development. – 1991b. – Vol. 111. – P. 611-621.
80. Krause H., Klemenz R., Gehring W. Expression, modification, and localization of the *fushi tarazu* protein in *Drosophila* embryos // Genes and Development. – 1988. – Vol. 2. – P. 1021-36.
81. Kraut R., Levine M. Spatial regulation of the gap gene *giant* during *Drosophila* development // Development. – 1991a. – Vol. 111. – P. 601-609.
82. Lardelli M., Ish-Horowicz D. *Drosophila hairy* pair-rule gene regulates embryonic patterning outside its apparent stripe domains // Genes and Development. – 1993. – Vol. 2. – P. 1021-1036.
83. Lecuit T., Wieschaus E. Polarized insertion of new membrane from a cytoplasm reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2000. – Vol. 150. – P. 849- 860.
84. Li L. M., Arnosti D. N. Long- and Short-Range Transcriptional Repressors Induce Distinct Chromatin States on Repressed Genes // Current Biology. –

2011. – Vol. 21. – P. 406-412.

85. Liu S., Jack J. Regulatory interactions and role in cell type specification of the Malpighian tubules by the *cut*, *Kruppel*, and *caudal* genes of *Drosophila* // *Developmental Biology*. – 1992. – Vol. 150. – P. 133-143.

86. Luengo-Hendriks Cris L., Keranen Soile V.E., Fowlkes Charless C., Simirenko L., Weber G. H., DePace A. H., Henriquez C., Kaszuba D. W., Hamann B., Eisen M. B., Malik J., Sudar D., Biggin M. D. and Knowles D. W. 3D Morphology and Gene Expression in the *Drosophila* Blastoderm at Cellular Resolution I: Data Acquisition Pipeline // *Genome Biology*. – 2006. – Vol. 7. – P. R123.

87. Macdonald P. M., Ingham P., Struhl G. Isolation, structure, and expression of *even-skipped*: a second pair-rule gene of *Drosophila* containing a homeo box // *Cell*. – 1986. – Vol. 47. – P. 721-734.

88. Macdonald P. M., Struhl G. A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern // *Nature*. – 1986. – Vol. 324. – P. 537-545.

89. Mahoney P. A., Lengyel J. A. The zygotic segmentation mutant *tailless* alters the blastoderm fate map of the *Drosophila* embryo // *Developmental Biology*. – 1987. – Vol. 122. – P. 464-470.

90. Manu, Surkova S., Spirov A., Gursky V., Janssens H, Kim A-R., Radulescu O., Vanario-Alonso C.E., Sharp D.H., Samsonova M. and Reinitz J.

Canalization of gene expression in the *Drosophila* blastoderm by gap gene cross regulation // *PLoS Biology*.–2009a.–V. 7.–P. e1000049.

91. Manu, Surkova S., Spirov A., Gursky V., Janssens H., Kim A-R, Radulescu O., Vanario-Alonso C.E., Sharp D.H., Samsonova M. and Reinitz J. Canalization of gene expression and domain shifts in the *Drosophila* blastoderm by dynamical attractors // *PLoS Comp. Biology*.–2009b.–V. 5.–P. e1000303.

92. Martinez C. A., Arnosti D. N. Spreading of a Corepressor Linked to Action of Long-Range Repressor Hairy // *Molecular and Cellular Biology*. – 2008. – Vol. 28, no. 8. – P. 2792-2802.

93. McGregor Alistair P. How to get ahead: the origin, evolution and function of *bicoid* // *BioEssays*. – 2005. – Vol. 27. – P. 904-913.

94. Merrill P. T., Sweeton D., Wieschaus E. Requirements for autosomal gene activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster* // Development. – 1988. – Vol. 104. – P. 495-509.
95. Mlodzik M., Fjose A., Gehring W. J. Isolation of *caudal*, a *Drosophila* homeo box-containing gene with maternal expression, whose transcripts form a concentration gradient at pre-blastoderm stage // The EMBO Journal. – 1985. – Vol. 4. – P. 2961-2969.
96. Mlodzik M., Gehring W. J. Expression of the caudal gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis // Cell. – 1987. – Vol. 48. – P. 465-478.
97. Mohler J., Eldon E. D., Pirrotta V. A novel spatial transcription pattern associated with the segmentation gene, *giant*, of *Drosophila* // The EMBO Journal. – 1989. – Vol. 8. – P. 1539-1548.
98. Myasnikova E., Samsonova A., Kozlov K., Samsonova M. and Reinitz J. Registration of the Expression Patterns of *Drosophila* Segmentation Genes by Two Independent Methods // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17. – P. 3-12.
99. Myasnikova E., Samsonova M., Kosman D., Reinitz J. Removal of background signal from in situ data on the expression of segmentation genes in *Drosophila* // Development, Genes and Evolution. – 2005. – Vol. 215. – P. 320-326.
100. Neumann C., Cohen S. Morphogens and pattern formation // BioEssays. – 1997. – Vol. 19. – P. 721-729.
101. Nusslein-Volhard C., Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* // Nature. – 1980. – Vol. 287. – P. 795-801.
102. Pankratz M. J., Hoch M., Seifert E., Jakle H. *Krüppel* requirement for *knirps* enhancement reflects overlapping gap gene activities in the *Drosophila* embryo // Nature. – 1989. – Vol. 341. – P. 337-340.
103. Payankaulam S., Arnosti D. Groucho corepressor functions as a cofactor for the Knirps short-range transcriptional repressor // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2009. – Vol. 106, no. 41. – P. 415-418.
104. Peel A., Akam M. Evolution of Segmentation: Rolling Back the Clock // Current Biology. – 2003. – Vol. 13. – P. R708R710. 141

105. Pisarev A., Poustelnikova E., Samsonova M., Reinitz J. FlyEx, the quantitative atlas on segmentation gene expression at cellular resolution // Nucl. Acids Res.– 2009. – Vol. 37. – P. D560-D566.
106. Pignoni F., Steingrimsson E., Lengyel J. A. *bicoid* and the terminal system activate *tailless* expression in the early *Drosophila* embryo // Development. – 1992. – Vol. 115. – P. 239-251.
107. Preiss A., Rosenberg U. B., Kienlin A., Seifert E., Jackle H. Molecular genetics of *Kruppel*, a gene required for segmentation of the *Drosophila* embryo // Nature. – 1985. – Vol. 313. – P. 27-32.
108. Reinitz J., Levine M. Control of the initiation of homeotic gene expression by the gap genes *giant* and *tailless* in *Drosophila* // Developmental Biology. – 1990. – Vol. 140. – P. 57-72.
109. Rivera-Pomar R., Lu X., Perrimon N., Taubert H., Jackle H. Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm // Nature. – 1995. – Vol. 376. – P. 253-256.
110. Rothe M., Nauber U., Jackle H. Three hormone receptor-like *Drosophila* genes encode an identical DNA-binding finger // The EMBO Journal. – 1989. – Vol. 8. – P. 3087-3094.
111. Rothe M., Wimmer E. A., Pankratz M. J., Gonzalez-Gaitan M., Jackle H. Identical transacting factor requirement for *knirps* and *knirps-related* gene expression in the anterior but not in the posterior region of the *Drosophila* embryo // Mechanisms of Development. – 1994. – Vol. 46. – P. 169-181.
112. Rutherford S. L., Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution // Nature. – 1998. – Vol. 396. – P. 336-342.
113. Sarrazin A. F., Peel A. D., Averof M. A Segmentation Clock with Two-Segment Periodicity in Insects // Science. – 2012. – Vol. 336. – P. 338-341.
114. Saunders P. T. The organism as a dynamical system // Thinking about Biology (SFI Studies in the Sciences of Complexity, Lecture Notes Vol. III) / Ed. by F. Varela, W. Stein. – Addison Wesley, Reading, 1993. – P. 41-63.
115. Schulz C., Tautz D. Zygotic *caudal* regulation by hunchback and its role in abdominal segment formation of the *Drosophila* embryo // Development. –

1995. – Vol. 121. – P. 1023-1028.

116. Schroeder M. D., Greer C., Gaul U. How to make stripes: deciphering the transition from non-periodic to periodic patterns in *Drosophila* segmentation // Development. – 2011. – Vol. 138. – P. 3067-3078.

117. Slack J. M. W. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? // Nature Reviews Genetics. – 2002. – Vol. 3. – P. 889-895.

118. Slack J. M. W. Morphogenetic gradients - past and present // Trends in Biochemical Sciences. – 1987. – Vol. 12. – P. 200-204.

119. Small S., Kraut R., Hoey T., Warrior R. and Levine M. Transcriptional regulation of a pair- rule stripe in *Drosophila* // Genes and Development. – 1991. – Vol. 5. – P. 827-839.

120. Small S., Blair A., Levine M. Regulation of two pair-rule stripes by a single enhancer in the *Drosophila* embryo // Developmental Biology. – 1996. – Vol. 175. – P. 314-324.

121. Sollars V., Lu X., Xiao L., Wang X., Garfinkel M. D. and Ruden D. M. Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution // Nature Genetics. – 2002. – Vol. 33. – P. 70-74.

122. Spirov A. V., Holloway D. Making the body plan: precision in the genetic hierarchy of *Drosophila* embryo segmentation // In Silico Biology. – 2003. – Vol. 3. – P. 0009. – <http://www.bioinfo.de/isb/2003/03/0009/>.

123. Stanojevic D., Small S., Levine M. Regulation of a segmentation stripe by overlapping activators and repressors in the *Drosophila* embryo // Science. – 1991. – Vol. 254. – P. 1385-1387.

124. Stauber M., Taubert H., Schmidt-Ott U. Function of *bicoid* and *hunchback* homologs in the basal cyclorrhaphan fly *Megaselia* (Phoridae) // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 10844-10849.

125. Strecker T. R., Kongsuwan K., Lengyel J. A., Merriam J. R. The zygotic mutant *tailless* affects the anterior and posterior ectodermal regions of the *Drosophila* embryo // Developmental Biology. – 1986. – Vol. 113. – P. 64-76.

126. Strecker T. R., Merriam J. R., Lengyel J. A. Graded requirement for the zygotic terminal gene, *tailless*, in the brain and tail region of the *Drosophila*

embryo // Development. – 1988. – Vol. 102. – P. 721-734.

127. Struffi P., Corado M., Kaplan L., Yu, D., Rushlow, C., Small, S. Combinatorial activation and concentration-dependent repression of the *Drosophila even skipped* stripe 3+7 enhancer // Development. – 2011. – Vol. 138. – P. 4291-4299.

128. Strunk B., Struffi P., Wright K., Pabst B., Thomas J., Qin L. and Arnosti D. N. Role of CtBP in transcriptional repression by the *Drosophila* Giant protein // Developmental Biology. – 2001. – Vol. 239. – P. 229-240.

129. Surkova S., Kosman D., Kozlov K., Manu, Myasnikova E., Samsonova A., Spirov A., Vanario-Alonso C.E., Samsonova M. and Reinitz J. Characterization of the *Drosophila* Segment Determination Morphome // Developmental Biology. – 2008. – Vol. 313, no. 2. – P. 844-862.

130. Surkova S., Myasnikova E., Janssens H., Kozlov K., Samsonova A., Reinitz J. and Samsonova M. Pipeline for acquisition of quantitative data on segmentation gene expression from confocal images // Fly. – 2008. – Vol. 2. – P. 58-66.

131. Surkova S., Myasnikova E., Kozlov K., Pisarev A., Reinitz J. and Samsonova M. Quantitative imaging of gene expression in *Drosophila* embryos. // Imaging in developmental biology: a laboratory manual / Ed. by J. Sharpe, R.O. Wong eds. – Cold Spring Harbor, NY : CSH Laboratory Press, 2011. – P. 683-697.

132. Surkova S., Golubkova E., Manu, Panok L., Mamon L., Reinitz J., Samsonova M.

Quantitative dynamics and increased variability of segmentation gene expression in the *Drosophila Kruppel* and *knirps* mutants (2013) // Developmental Biology.– 2013.–V. 376.–P. 99–112.

133. Swantek D., Gergen J. P. Ftz modulates Runt-dependent activation and repression of segment-polarity gene transcription // Development. – 2004. – Vol. 131. – P. 2281-2290.

134. Tautz D., Lehmann R., Schnurch H., Schuh R., Seifert E., Kienlin A., Jones K., Ackle H. Finger protein of novel structure encoded by *hunchback*, a second member of the gap class of *Drosophila* segmentation genes // Nature. – 1987. – Vol. 327. – P. 383-389.

135. Tautz D. Regulation of the *Drosophila* segmentation gene *hunchback* by two maternal morphogenetic centres // Nature. – 1988. – Vol. 332. – P. 281-284.
136. Tautz D., Sommer R. J. Evolution of segmentation genes in insects // Trends in Genetics. – 1995. – Vol. 11. – P. 23-27.
137. Tautz D. Segmentation // Developmental Cell. – 2004. – Vol. 7. – P. 301-312.
138. Turing A. M. The chemical basis of morphogenesis // Transactions of the Royal Society London, Series B. – 1952. – Vol. 237. – P. 37-72.
139. Waddington C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters // Nature. – 1942. – Vol. 150. – P. 563-565.
140. Waddington C. H. The Strategy of Genes. – London : George Allen Unwin, 1957.
141. Warrior R., Levine M. Dose-dependent regulation of pair-rule stripes by gap proteins and the initiation of segment polarity // Development. – 1990. – Vol. 110. – P. 759-767.
142. Weigel D., Jurgens G., Klingler M., Jackle H. Two gap genes mediate maternal terminal pattern information in *Drosophila* // Science. – 1990. – Vol. 248. – P. 495-498.
143. Wieshaus E., Nusslein-Volhard C., Kluding H. *Krüppel*, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation // Developmental Biology. – 1984. – Vol. 104. – P. 172-186.
144. Wolpert L. Positional Information and the Spatial Pattern of Cellular Differentiation // The Journal of Theoretical Biology. – 1969. – Vol. 25. – P. 1-47.
145. Wolpert L. One hundred years of positional information // Trends in Genetics. – 1996. – Vol. 12. – P. 359-364.
146. Wu X., Vakani R., Small S. Two distinct mechanisms for differential positioning of gene expression borders involving the *Drosophila* gap protein Giant // Development. – 1998. – Vol. 125. – P. 3765-3774.
147. Wu Xuelin, Vasisht Vikram, Kosman David et al. Thoracic Patterning by the *Drosophila* Gap Gene *hunchback* // Developmental Biology. – 2001. –

Vol. 237. – P. 79-92.

148. Yu Y., Pick L. Non-periodic cues generate seven *ftz* stripes in the *Drosophila* embryo // Mechanisms of Development. – 1995. – Vol. 50. – P. 163-175.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых изданиях

1. **Surkova S.**, Golubkova E., Manu, Panok L., Mamon L., Reinitz J., Samsonova M. Quantitative dynamics and increased variability of segmentation gene expression in the *Drosophila Kruppel* and *knirps* mutants (2013) // *Developmental Biology*.–2013.–V. 376.–P. 99–112.
2. Gursky V.V., **Surkova S.Y.**, Samsonova M.G. Mechanisms of developmental robustness // *Biosystems*.– 2012.–V. 109.–P. 329–35.
3. Kozlov K., **Surkova S.**, Myasnikova E., Reinitz J., Samsonova M. Modeling of gap gene expression in *Drosophila Kruppel* mutants // *PLoS Comput. Biol.*–2012.–V. 8.–P. e1002635.
4. **Суркова С.Ю.**, Гурский В.В., Райниц Дж., Самсонова М.Г. Изучение механизмов устойчивости раннего эмбрионального развития плодовой мушки дрозофилы // *Онтогенез*.–2011.–Т. 42.–С. 3–19.
5. **Surkova S.**, Myasnikova E., Kozlov K., Pisarev A., Reinitz J. and Samsonova M. Quantitative imaging of gene expression in *Drosophila* embryos // *In Imaging in Developmental Biology: A Laboratory Manual* (ed. J. Sharpe and RO. Wong). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.–2011.–P. 683–697.
6. Kozlov K., Myasnikova E., Samsonova A., **Surkova S.**, Reinitz J. and Samsonova M. GCPReg package for registration of the segmentation gene expression data in *Drosophila* // *Fly*.–2009.–V. 2.–P. 151–156.
7. Manu, **Surkova S.**, Spirov A., Gursky V., Janssens H, Kim A-R., Radulescu O., Vanario-Alonso C.E., Sharp D.H., Samsonova M. and Reinitz J. Canalization of gene expression in the *Drosophila* blastoderm by gap gene cross regulation // *PLoS Biology*.–2009a.–V. 7.–P. e1000049.
8. Manu, **Surkova S.**, Spirov A., Gursky V., Janssens H., Kim A-R, Radulescu O., Vanario-Alonso C.E., Sharp D.H., Samsonova M. and Reinitz J. Canalization of gene expression and domain shifts in the *Drosophila* blastoderm by dynamical

attractors // PLoS Comp. Biology.–2009b.–V. 5.–P. e1000303.

9. Surkova S., Kosman D., Kozlov K., Manu, Myasnikova E., Samsonova A., Spirov A., Vanario-Alonso C.E., Samsonova M. and Reinitz J. Characterization of the *Drosophila* segment determination morphome // Developmental Biology.–2008a.– V. 313.–P. 844–862.

10. Surkova S., Myasnikova E., Janssens H., Kozlov K., Samsonova A., Reinitz J. and Samsonova M. Pipeline for acquisition of quantitative data on segmentation gene expression from confocal images // FLY.–2008b.–V. 2.–P. 58–66.

11. Суркова С.Ю., Мясникова Е.М., Козлов К.Н., Самсонова А.А., Райниц Дж. и Самсонова М.Г. Методы получения количественных данных из конфокальных изображений картин экспрессии генов *in situ* // Цитология.–2008a.–Т. 50.–С. 352–369.

12. Суркова С.Ю., Мясникова Е.М., Райниц Дж., Самсонова М.Г. Динамическая фильтрация вариабельности картин экспрессии зиготических генов сегментации у дрозофилы // Биофизика.–2008b.–Т. 53.–С. 475–81.

13. Myasnikova E., Samsonova A., **Surkova S.**, Samsonova M. and Reinitz J. Determination of the developmental age of a *Drosophila* embryo from confocal images of its segmentation gene expression patterns // In: Bioinformatics of Genome Regulation and Structure II. (Eds. N.Kolchanov and R. Hofestaedt), Springer Science+Business Media, Inc.–2005.–P. 467–478.

14. Jaeger J., **Surkova S.**, Blagov M., Janssens H., Kosman D., Kozlov K., Manu, Myasnikova E., Vanario-Alonso C.E., Samsonova M., Sharp D.H. and Reinitz J. Dynamic control of positional information in the early *Drosophila* embryo // Nature.–2004.–V. 430.–P. 368–371.

Тезисы докладов

1. С.Ю. Суркова, Е.В.Голубкова, Ману, Л. Панок, Л.А. Мамон, Дж. Райниц, М.Г. Самсонова. Динамика и вариабельность экспрессии генов сегментации у эмбрионов дрозофилы, мутантных по генам *Kruppel* и *knirps* Все-

российская конференция с международным участием «Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция» 22–24 октября 2013 г., Санкт-Петербург.–P. 85–86.

2. S. Surkova, E. Golubkova, Manu, L. Panok, L. Mamon, J. Reinitz, M. Samsonova. Quantitative characterization of the segmentation gene expression in *Drosophila* gap mutants // Proceedings of the SysPatho Workshop “Systems biology and medicine”. St. Petersburg-Tsarskoe Selo, Russia, 11–14 September 2012.–P. 90–91.

3. Svetlana Surkova, Manu, Maria Samsonova and John Reinitz. Complex movements of segmentation gene expression domains in *Drosophila* homozygous *Kr* mutants // Proceedings of 16th International Society of Developmental Biologists Congress, Edinburgh, 6–10 September 2009.–P. S286.

4. S. Surkova and Manu. Quantitative study of segmentation gene expression in *Drosophila* homozygous *Kr* mutants // Proceedings of the Sixth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure, Novosibirsk–2008.–P. 235.

5. S. Surkova. Dynamic filtration of variability of gene expression in the *Drosophila* blastoderm // International Workshop on NanoBiotechnologies, Saint-Petersburg, November 27–29, 2006, Book of abstracts.–P. 112–113.

6. Surkova S., Samsonova M., Reinitz J. Study of the variation and canalization of gene expression in the *Drosophila* blastoderm // Proceedings of the 3rd EMBL Biennial Symposium: From Functional Genomics to Systems Biology, October 14–17, 2006, Heidelberg, Germany.–P. 84.

7. Svetlana Surkova, Maria Samsonova, Ekaterina Myasnikova and John Reinitz. Spatiotemporal Precision of Segmentation Gene Expression in *Drosophila* Early Embryo // 46th Annual *Drosophila* Research Conference, San Diego, California, March 30–April 3, 2005, Program and abstracts volume.–P. 107.

8. Surkova S. Yu. and Samsonova M.G. Temporal and spatial precision in formation of segmentation gene expression domains in *Drosophila* // Proceedings of the Fourth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure, Novosibirsk–2004.–V.2.–P. 142–145.