

Суркова Светлана Юрьевна

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

03.02.07 – генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург
2014

Работа выполнена в отделе компьютерной биологии центра перспективных исследований Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный Политехнический университет, г. Санкт-Петербург.

Научный руководитель:

Доктор биологических наук
Мария Георгиевна Самсонова

Официальные оппоненты:

Леонид Владимирович Омелянчук
Доктор биологических наук,
зав. лабораторией генетики клеточного цикла,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт молекулярной и клеточной биологии
СО РАН, г. Новосибирск

Милана Анатольевна Кулакова
Кандидат биологических наук,
зав. лабораторией экспериментальной эмбриологии,
старший научный сотрудник кафедры эмбриологии,
Санкт-Петербургский государственный университет,
г. Санкт-Петербург

Ведущее учреждение:

Московский государственный университет
г. Москва

Защита диссертации состоится “__” _____ 2014 г. на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 003.011.01 в ИЦиГ СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 10.

Тел. (383) 363-49-06(1321); факс (383) 333-12-78; e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/obrazovanie/dissertacionnyi-совет/dissertaczii/>

Автореферат разослан “__” _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т. М. Хлебодарова

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 бластомеры 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 гар 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 концепцию 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., 2007). 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 вариабельности экспрессии генов у эмбрионов дикого типа, а именно, вариабельности уровней экспрессии, времени, скорости и типа формирования областей экспрессии генов, а также пространственной вариабельности областей экспрессии.

Особенный интерес представила задача анализа вариабельности экспрессии генов сегментации у нуль-мутантов по генам *gar*. Гены *gar* 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 вариабельностью (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Wieschaus et al., 1984). Целью исследования было понять, насколько эта вариабельность 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 Nüsslein-Volhard, 1988b,a).

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 ин-

терпретации позиционной информации. Как уже упоминалось, нуль-мутации в генах *gar* 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 *gar*, 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 *gar*;
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 экспрессии, 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 приводило к ошибкам 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 *гар* 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. Уоллингтона 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 *гар*, 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 *гар* у эмбрионов дикого типа (Manu et al., 2009a), а также пространственные сдвиги постериорных областей экспрессии генов *гар* 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 *гар*, 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 *gap* подтверждают на молекулярном уровне концепцию канализации развития К. Уоддингтона, в основе которой лежит идея о подавлении вариабельности 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 искреннюю благодарность М.Г. Самсоновой, Л.А. Мамон, Е.В. Голубковой, К.Н. Козлову, Е.М. Мясниковой, Ману, Л. Панок, Д.П. Фурман, В.А. Скобеевой, Дж. Райницу, а также лаборатории генетики животных СПбГУ, ЦКП ХРОМАС СПбГУ и Центру генетики развития (Университет Стони Брук).

Введение

Сформулированы цели и задачи исследования, обоснованы актуальность темы, ее научная новизна, теоретическое и практическое значение.

Глава 1. Обзор литературы

Обзор начинается с рассмотрения преимуществ дрозофилы как модельного объекта по изучению механизмов генетического контроля детерминации сегментов. В отличие от позвоночных и насекомых, у которых формирование постериорных сегментов тела происходит последовательно после начала гаструляции, у дрозофилы детерминация сегментов осуществляется одновременно на регуляторном уровне посредством действия иерархического каскада взаимодействий транскрипционных факторов, кодируемых генами сегментации. Экспрессия генов сегментации приводит к делению А-П оси эмбриона на все более пространственно четкие области. Этот регуляторный каскад функционирует в течение первых 3-х часов развития эмбриона дрозофилы.

В обзоре приводится характеристика раннего эмбрионального развития дрозофилы. В циклах дробления ядер 9–13 эмбрион представляет собой синцитий, ядра которого расположены на поверхности эмбриона в общей цитоплазме. С начала цикла 14А начинается постепенное формирование клеточных мембран, заканчивающееся перед гаструляцией. Таким образом, гены сегментации экспрессируются еще до образования клеток, и регуляторные взаимодействия в рассматриваемой системе могут происходить путем диффузии транскрипционных факторов без подключения межклеточных сигнальных путей.

Далее следует описание литературных данных по экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа и у эмбрионов, мутантных по генам *gap*, *Kr* и *kni*. Показано, что описательные данные дают весьма противоречивые и неточные представления о характере экспрессии генов. Биологически важной информацией является не общая характеристика картины экспрессии гена, а информация о количестве генных продуктов, присутствующих в каждом ядре эмбриона а также о пространственном расположении ядра в эмбрионе. Кроме того, 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, стало получение точных количественных данных по экспрессии генов.

Следующая часть обзора посвящена вопросу о природе позиционной информации, определяющей положение клетки в морфогенетическом поле. Теория позиционной информации (Wolpert, 1969) предполагает четкое разделение между установлением и интерпретацией позиционной информации, задавая полностью статическую систему координат, которая пассивно интерпретируется клетками-мишенями. В предыдущих исследованиях было показано, что для раннего развития дрозофилы дикого типа свойственна динамическая интерпретация позиционной информации зиготическими

генами, что ближе к концепции морфогенетического поля с его регуляторными свойствами, чем к теории статического определения позиционной информации Л. Волперта (Jaeger et al., 2004a, Surkova et al., 2008a, Самсонова, 2008). В данной работе важным являлось исследовать, каким образом осуществляется интерпретация позиционной информации при существенном изменении характера регуляторных взаимодействий в сети генов сегментации на примере эмбрионов, нуль-мутантных по генам *gap*.

В заключительной части обзора литературы представлены теоретические концепции, лежащие в основе исследований устойчивости развития организмов. Изложена концепция канализации развития, предложенная К. Уоддингтоном для объяснения того факта, что фенотипическая вариабельность подавляется в процессе развития у организмов дикого типа, но не у мутантных (Waddington, 1942). Опубликованные данные об уменьшении высокого уровня позиционной вариабельности материнского градиента *Vcd* на уровне экспрессии зиготических генов у эмбрионов дрозофилы дикого типа позволили предположить, что система генов сегментации может быть использована для исследования вариабельности и канализации на уровне экспрессии генов.

Глава 2. Материалы и методы

Линии дрозофилы, использованные в работе. Эмбрионы *Drosophila melanogaster* дикого типа были получены с использованием линии Oregon-R; эмбрионы, мутантные по гену *Kr* – линии *Kr*¹ (Wieschaus et al., 1984); по гену *kni* – линии 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.

Получение изображений картин экспрессии генов. Эмбрионы дрозофилы в возрасте 3–4-х часов развития собирали и фиксировали в соответствии со стандартным протоколом (Frasch et al., 1987; Kosman et al., 1998), метили первичными антителами, специфичными к продуктам генов сегментации и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофорами. Для маркирования ядер эмбрионы дополнительно метили антителами, специфичными к гистонам или ДНК-красителем Hoechst (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013).

Изображения картин экспрессии генов получали с помощью конфокального микроскопа, причем сканировались только латерально ориентированные эмбрионы. Параметры конфокального микроскопа “gain” и “offset” настраивали так, чтобы пиксели, лежащие вне эмбриона, имели значение 0, а пиксели, имеющие наибольшую яркость, – значение 255. Настройки производили отдельно для каждого белка, выбирая время развития, когда интенсивность флуоресценции максимальна. Такая настройка позволила количественно (в относительных единицах) оценивать 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. Остальные каналы сканировали с настройками, сделанными для эмбрионов дикого типа (Surkova et al., 2013).

Для установления возраста эмбрионов на основе морфологии бластодермы их до-

полнительно сканировали в режиме дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) в сагиттальной проекции (Surkova et al., 2008a).

Классификация эмбрионов по времени развития. Для реконструкции временной динамики экспрессии генов на основе индивидуальных фиксированных эмбрионов было необходимо их классифицировать по времени развития. Длина цикла 14A примерно 50 минут, поэтому эмбрионы были разделены на восемь временных классов продолжительностью 6.5 минут на основе динамики экспрессии гена *eve* (разной для всех исследуемых генотипов) и изменения морфологии бластодермы, что включает в себя удлинение ядер в раннем цикле 14A и степень инвагинации клеточных мембран (Рис. 1А–Н) (Surkova et al., 2008a, Самсонова, 2008, Surkova et al., 2013).

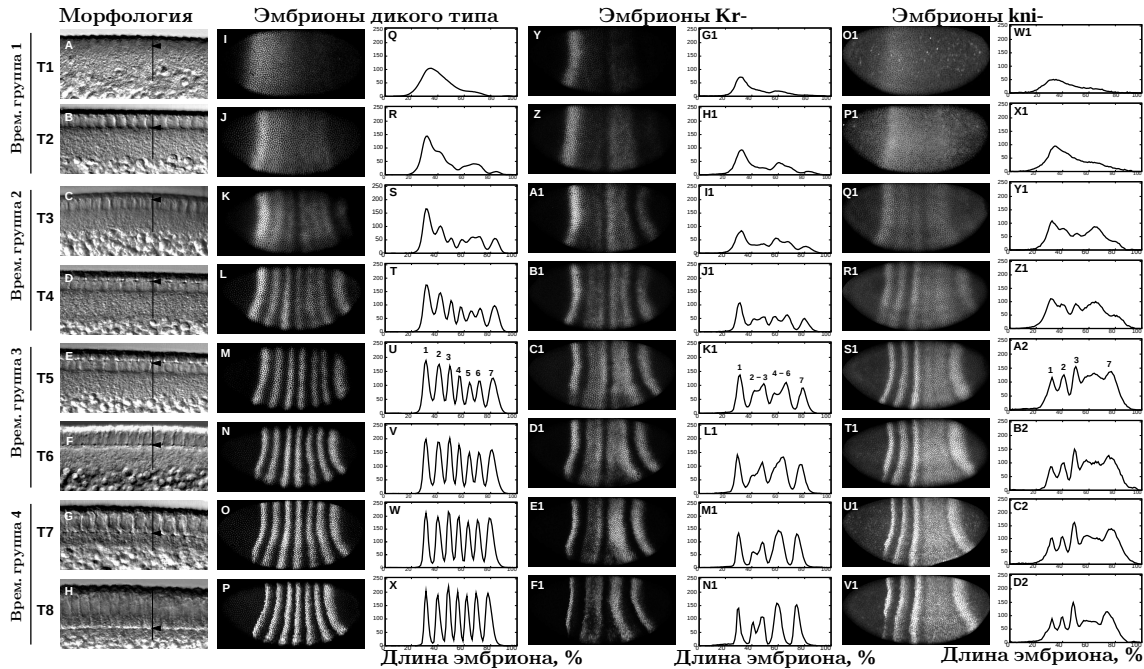


Рис. 1: Экспрессия гена pair-rule *eve* в 8 временных классах (Т) цикла 14А у эмбрионов дикого типа и эмбрионов *Kr-* и *kni-*. Временная группа включает два соседних временных класса. (А–Н) Изображения морфологии бластодермы. Вертикальными черными линиями показана кортикальная цитоплазма, черными стрелками – удлинение ядер (Т1–Т2) и позиция фронта растущей мембраны (Т3–Т8). (I–P) Изображения картин экспрессии *eve* в типичных эмбрионах дикого типа, (Y–F1) *Kr-* и (O1–V1) *kni-* в обозначенном временном классе. (Q–X), (G1–N1), (W1–D1) - одномерные интегрированные картины экспрессии *eve*. Рисунки (А–Х) были опубликованы ранее (Самсонова, 2008, Surkova et al., 2008a), рисунки (Y–D2) впервые представлены в статье (Surkova et al., 2013).

Получение и обработка количественных данных

Сегментация изображений и удаление фонового сигнала. Гены сегментации кодируют транскрипционные факторы, локализующиеся в ядрах эмбриона. Использованный метод обработки изображений позволил выделять отдельные ядра одновременно у нескольких изображений, полученных в разных каналах микроскопа. Для этого на основе изображения эмбриона, прокрашенного ядерным маркером, строилась так называемая “ядерная маска”, то есть бинарное изображение, в котором “включены” только пиксели, соответствующие ядрам эмбриона. Информация о координатах ядер и средних уровнях экспрессии генов в каждом ядре извлекалась в виде текстовых таблиц (Janssens et al., 2005, Самсонова, 2008, Суркова и др. 2008a, Surkova et al., 2011, Козлов, 2012).

Возникновение неспецифического фонового сигнала на изображениях обусловлено многими факторами, в частности, качеством первичных и вторичных антител. Области эмбриона, где отсутствует экспрессия генов, используются для аппроксимации фонового сигнала, который затем удаляется масштабированием картин экспрессии (Myasnikova et al., 2005, Самсонова, 2008, Суркова и др. 2008a, Surkova et al., 2011).

Регистрация картин экспрессии генов и построение интегрированного набора данных. Для приведения картин экспрессии каждого гена у разных эмбрионов одного временного класса к общей системе А–П координат используется метод пространственной регистрации. Этот метод основан на выделении контрольных точек картин экспрессии генов – как правило, координат максимумов и минимумов экспрессии. Выделение контрольных точек производилось в программе BREReA (Kozlov et al., 2009, Козлов, 2012) на основе аппроксимации картин экспрессии квадратичными сплайнами (Myasnikova et al., 2001) или применения вейвлетного преобразования (FRDWT) (Kozlov et al., 2002). Для мутантных эмбрионов метод был модифицирован с учетом измененных картин экспрессии генов (Surkova et al., 2013).

При построении интегрированных данных координаты ядер каждой картины экспрессии группировались вдоль оси А–П по R интервалам и внутри каждого интервала вычислялось среднее значение относительного уровня экспрессии по всем эмбрионам данного временного класса (Kozlov et al., 2002, Самсонова, 2008, Surkova et al., 2008b, Surkova et al., 2011).

Выделение характерных черт картин экспрессии и статистический анализ данных. В качестве характерных черт для статистического анализа данных использовались А–П позиции максимумов и минимумов экспрессии, а также позиции точек, где уровень экспрессии достигает определенного порогового значения. Метод извлечения характерных черт картин экспрессии во многом аналогичен использовавшемуся при пространственной регистрации данных (Самсонова, 2008, Surkova et al., 2008a).

Для проверки статистической значимости пространственных сдвигов областей экспрессии использовался метод ANOVA в пакете StatSoft Statistica. Пространственная вариабельность картин экспрессии генов оценивалась путем анализа значений стандартных отклонений (SD) А–П позиций характерных черт. Статистическая достоверность различий в уровнях вариабельности характерных черт у эмбрионов дикого типа и мутантных оценивалась с помощью двухвыборочного F-теста (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013).

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

Характеристика набора данных. Для анализа были использованы данные по экспрессии генов *hb*, *kni*, *gt*, *eve*, *ftz*, *bcd*, *cad* и *tll* у 237 нуль-мутантов и 89 гетерозигот по гену *Kr*; по 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*, а также, по экспрессии

eve, *bcd*, *cad*, *Kr*, *kni*, *gt*, *hb*, *tll*, *ftz*, *h*, *run*, *odd*, *prd* и *slp* примерно для 1500 эмбрионов дрозофилы дикого типа (подробнее в разделе "Личный вклад автора").

Закономерности экспрессии генов, выявленные на основе интегрированных данных

Экспрессия материнских генов. Показано, что область распространения антериорно–постериорного градиента экспрессии гена *bcd* остается практически постоянной с цикла дробления 11 до конца цикла 14А, однако уровень экспрессии перед гастрულიей снижается. В отличие от *bcd*, ранняя постериорно-антериорная экспрессия *cad* в цикле 13 - середине цикла 14А дополняется экспрессией в абдоминальной области, которая исчезает к концу цикла 14А, оставляя занижающуюся полосу экспрессии в постериорной части эмбриона. Экспрессия *bcd* и *cad* у эмбрионов, мутантных по генам *gar*, не изменена относительно таковой у эмбрионов дикого типа (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013).

Экспрессия генов *gar*. Зиготическая экспрессия генов *gar* на уровне белка (Рис. 2А) начинается в цикле дробления 13, но мы обнаружили экспрессию *Kr* у нескольких эмбрионов из цикла 12. Выявлено, что интенсивность во всех областях экспрессии генов *gar* достигает максимума в середине – конце цикла 14А, а затем либо начинает убывать, либо не меняется до начала гастрულიи. Это может объясняться снижением уровней позитивных регуляторов генов *gar* – *Vcd* и *Cad*. При этом уровни экспрессии генов *gar* высоковариабельны между индивидуальными эмбрионами ранних временных классов, во время интенсивного увеличения экспрессии в рассматриваемых областях, и снижаются в более поздних временных классах после того, как интенсивность экспрессии достигает максимума.

У эмбрионов, мутантных по генам *gar*, экспрессия других генов *gar* существенно изменена. У нуль-мутантов по гену *Kr* уровень постериорной экспрессии гена *kni* значительно занижен и составляет всего 1/10 от наблюдаемого у эмбрионов дикого типа (Рис. 2А,В). При этом постериорная область экспрессии *gt* у эмбрионов *Kr*– и *Kr;kni*– в ходе цикла 14А существенно сдвигается к позиции области экспрессии *kni* (Рис. 2В,Д,Е).

Снижение интенсивности экспрессии по сравнению с таковой у эмбрионов дикого типа обнаружено для всех генов *gar* у эмбрионов *Kr*–, *kni*– и *Kr;kni*–. При этом, как и у эмбрионов дикого типа, у мутантных эмбрионов наблюдается дальнейшее падение интенсивности экспрессии генов во второй половине цикла 14А. Снижение уровней экспрессии генов *gar* у эмбрионов, нуль-мутантных по генам *Kr* и *kni* является необычным явлением, так как существует множество доказательств того, что регуляция в системе генов *gar* основана на репрессирующих взаимодействиях между этими генами (Jaeger, 2011). Системный характер этого явления подчеркивает необходимость интактной системы взаимодействий для поддержания уровней экспрессии генов *gar*.

Экспрессия генов *pair-rule*

Эмбрионы дикого типа. Для эмбрионов дикого типа проанализирована экс-

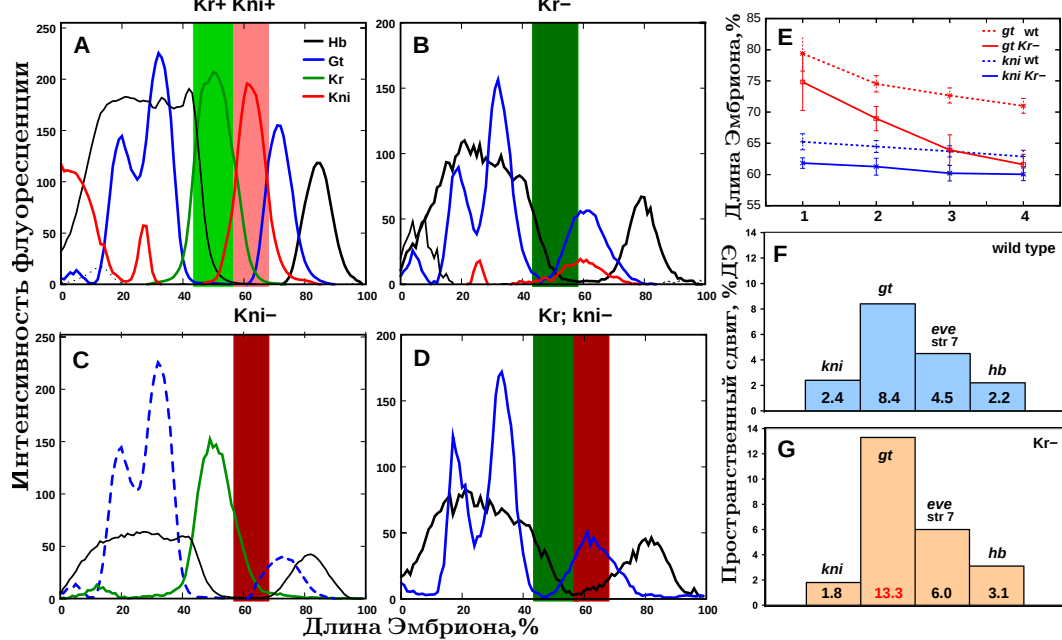


Рис. 2: Взаимное расположение и пространственные сдвиги постериорных областей экспрессии генов гар. (А) Интегрированные паттерны генов гар у эмбрионов дикого типа (wild type), (В) *Kr*⁻, (С) *kni*⁻ и (D) *Kr*; *kni*⁻ из временного класса 7. Вертикальными полосы обозначают позиции областей экспрессии *Kr* и *kni* в эмбрионах дикого типа (светлым цветом на А), и в мутантах, где они отсутствуют (темным цветом на В–D). (Е) Пространственные сдвиги постериорных областей экспрессии *kni* и *gt* у эмбрионов дикого типа и *Kr*⁻ во временных группах 1–4. Вертикальными линиями показаны стандартные отклонения средних позиций областей экспрессии в каждой временной группе. (F,G) Значения пространственных сдвигов максимумов постериорных областей экспрессии генов *kni*, *gt*, *hb* и полосы 7 (str 7) *eve* у эмбрионов дикого типа (F) и мутантов по *Kr* (G). ДЭ–длина эмбриона. Значения сдвигов отражают движение в anteriорном направлении, все значения являются статистически значимыми при $p < 0.05$.

прессия генов *eve*, *ftz*, *h*, *run*, *odd*, *prd* и *slp*. Экспрессия генов pair-rule на уровне белка впервые обнаруживается в циклах деления ядер 12–13. Формирование полос начинается, как правило, во временных классах 2–3 цикла 14А. Процесс образования полос имеет сложную динамику и индивидуален для каждого гена. Полосы могут образовываться разными способами, в разное время и в разной последовательности (Surkova et al., 2008a).

Эмбрионы *Kr*⁻ и *kni*⁻. У эмбрионов, мутантных по гену *Kr*, существенные изменения затрагивают практически весь паттерн гена *eve*, а именно, полосы 2–6 (Рис. 1Y-N1). Ширина этой территории вдоль anteriорно–постериорной оси значительно больше ширины отсутствующей области экспрессии *Kr* (Рис. 2А), что предполагает влияние других генов гар – *kni* и *gt* (Surkova et al., 2013).

Напротив, у нуль-мутантов по гену *kni* изменения выражаются только в отсутствии полос *eve* 4–6 (Рис. 1O1-D2). Эта территория как раз меньше той, которую должна затрагивать мутация по *kni*, так как у эмбрионов дикого типа *Kni* устанавливает также границы полос 3 и 7 (Clyde et al., 2003). Выявлено, что у эмбрионов *kni*⁻ границы полос 3 и 7 тем не менее формируются. Это не может полностью объясняться репрессией со стороны других генов pair-rule в конце цикла 14А, т.к. мы обнаруживаем полосу 3 *eve* уже в ранних временных классах 3 и 4 (Surkova et al., 2013).

Гетерозиготы $Kr+ / Kr-$ и $kni+ / kni-$. Обнаружено, что у гетерозигот $Kr+ / Kr-$ форма и размер раннего паттерна *eve* сходны с таковыми у нуль-мутантов, тогда как поздние паттерны *eve* сходны с паттернами, характерными для эмбрионов дикого типа (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Это явление может объясняться тем, что крайне низкие концентрации K γ у ранних эмбрионов способны формировать только паттерн *eve*, сходный с мутантным. Однако последующее повышение уровня K γ приблизительно до 1/2 от присутствующего у эмбрионов дикого типа оказывается достаточным для формирования паттерна, состоящего из 7-ми полос, обеспечивая таким образом выживаемость гетерозигот. Тем не менее, наши данные отрицают влияние пониженных концентраций K γ у гетерозигот на постериорное смещение задней границы полосы 2 *eve*, предложенное в более ранних работах (Warrior and Levine, 1990).

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

Ранее было показано, что большинство областей экспрессии зиготических генов динамически сдвигаются в ходе развития эмбриона (Jaeger et al., 2004a, Surkova et al., 2008a). При этом, сдвиги областей экспрессии генов в постериорной части эмбриона не зависят от морфологических перемещений ядер бластодермы и обусловлены репрессивными взаимодействиями между зиготическими генами. Эти репрессивные взаимодействия асимметричны, т.е. гены, экспрессирующиеся более постериорно, репрессируют гены, экспрессирующиеся более антериорно, но не наоборот (Jaeger et al., 2004a, Самсонова, 2008). Следовало ожидать, что нуль-мутации в генах *gar*, являющихся важнейшими регуляторами процесса детерминации сегментов, окажут влияние на характер интерпретации позиционной информации. Для проверки этой гипотезы был проведен сравнительный анализ позиционной динамики экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа и мутантных в цикле 14А с особым акцентом на позиции областей экспрессии, их сдвиги и ширину.

Выявлено, что наиболее существенно сдвигается задняя область экспрессии гена *gar* *gt*, при этом её сдвиг в антериорном направлении у нуль-мутантов по *Kr* составляет 13.3% длины эмбриона (ДЭ), что на 5% ДЭ больше наблюдаемого у эмбрионов дикого типа (Рис. 2Е–Г). Это очень существенный сдвиг, величина которого сравнима с шириной области экспрессии гена *gar* в цикле 14А. Несмотря на то, что сдвиги постериорных областей экспрессии экспрессии *kni* и *hb* намного меньше сдвига *gt*, они являются статистически значимыми и у эмбрионов дикого типа и у мутантных (Рис. 2F, G) (Surkova et al., 2013).

У генов *pair-rule* наибольшие сдвиги также наблюдаются в постериорной области эмбриона. Так, полоса 7 *eve* сдвигается на 4.5, 6 и 6.7% ДЭ, соответственно, у эмбрионов дикого типа, у нуль-мутантов по гену *Kr*, и нуль-мутантов по *kni*. В отличие от постериорных областей, сдвиги антериорных областей экспрессии как генов *gar*, так и генов *pair-rule*, как правило, не являются статистически значимыми.

В целом, пространственная динамика у эмбрионов дикого типа и у нуль-мутантов сходна по трем важным аспектам: (1) сдвиги в основном происходят в постериорной части эмбриона; (2) области экспрессии движутся в anteriорном направлении; (3) сдвиги в разных генотипах приводят к сужению областей экспрессии за счет более существенного сдвига постериорной границы (Surkova et al., 2008a, Surkova et al., 2013). Таким образом, несмотря на существенное влияние нуль-мутаций в генах *gar* на экспрессию генов сегментации, эти мутации не меняют характер интерпретации позиционной информации в эмбрионе. Это предполагает наличие сходных регуляторных механизмов, определяющих сдвиги областей экспрессии зиготических генов после их изначального установления пороговыми концентрациями материнских градиентов, у эмбрионов дикого типа и мутантных. Данная гипотеза была частично подтверждена в исследованиях *in silico*. Показано, что эмбрионов *Kr*– значительный сдвиг задней области экспрессии *gt* происходит за счет репрессии со стороны постериорной области *hb*, т.е., как и у эмбрионов дикого типа, обусловлен репрессией со стороны более постериорно локализованной области экспрессии (Kozlov et al., 2012).

Глава 5. Вариабельность экспрессии генов сегментации

Эмбрионы дикого типа. Выявлено, что в цикле 13 – раннем цикле 14А наблюдается существенная вариабельность уровней экспрессии как генов *gar*, так и генов *pair-rule* между индивидуальными эмбрионами дикого типа.

Вариабельность уровней экспрессии генов *pair-rule* максимальна во время образования полос, когда обнаруживается широкое разнообразие форм паттернов, наблюдаемых у разных эмбрионов одного возраста (Рис. 3В). Это включает в себя вариабельность (а) способа формирования одной и той же полосы, что показано на примере полосы 3 *ftz* (Рис. 3D,E); (b) скорости формирования полос, которая составляет примерно 6 минут для полосы 1 *run* и 24 минуты для полосы 4 *ftz* и anteriорных областей экспрессии генов *gar* (Рис. 3F,G); (c) последовательности формирования полос. Например, после полосы 5 *ftz* может образоваться как полоса 1, так и полоса 2, полоса 3 может появиться как до, так и после полосы 6, а последней сформированной полосой в паттерне может быть как полоса 4, так и полоса 7.

Нами выявлено, что все перечисленные выше формы вариабельности паттернов генов *pair-rule* (Рис. 3С), а также вариабельность интенсивности экспрессии генов *gar*, снижаются в конце цикла 14А (Surkova et al., 2008a, Суркова и др. 2008b).

На рисунке 3А высокая пространственная вариабельность экспрессии материнских генов *bcd* и *cad* сравнивается с низкой вариабельностью гена *gar kni*, что показывает снижение вариабельности материнских градиентов на уровне зиготических генов-мишеней, подтверждая выводы, сделанные ранее (Houchmandzadeh et al., 2002). Однако мы обнаружили, что подобное снижение вариабельности происходит динамически. В цикле 13 пространственная вариабельность характерных черт картин экспрессии зиготических генов *hb*, *Kr* и *eve* существенно повышена ($SD = 2.3\text{--}3.7\%$ ДЭ), но в конце цикла 14А составляет уже $0.7\text{--}1.8\%$ ДЭ, что в несколько раз меньше, чем у материнских градиентов ($SD = 3.5\text{--}6.6\%$ ДЭ) (Surkova et al., 2008a, Суркова и др. 2008b). С помощью математического моделирования в работе Ману и др. бы-

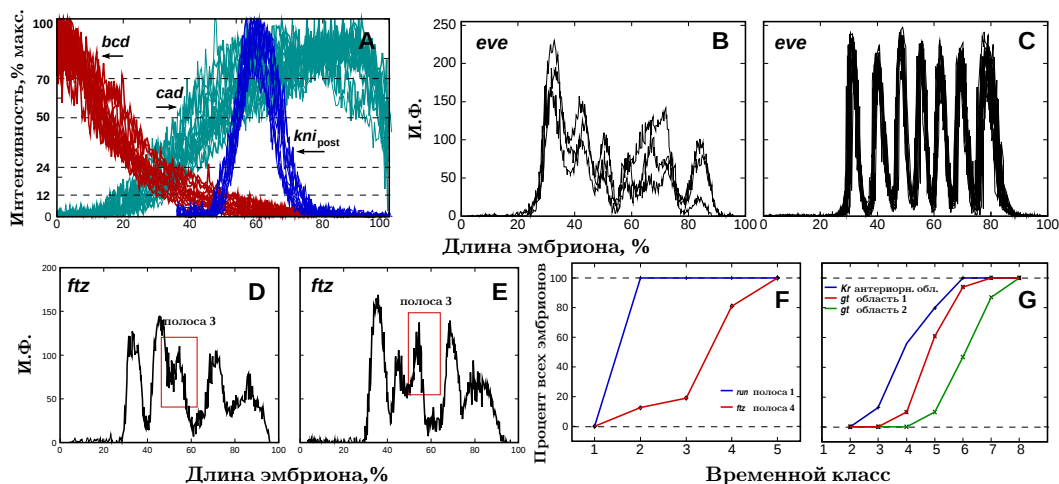


Рис. 3: Вариабельность картин экспрессии генов у эмбрионов дикого типа. (А) Пространственная вариабельность областей экспрессии *bcd*, *cad* и *kni* в выборках индивидуальных эмбрионов в цикле 14А. Обозначены разные пороговые уровни экспрессии. (В,С) Экспрессия гена *eve* у индивидуальных эмбрионов во временном классе 3 (В) и 8 (С). (D,E) Вариабельность способа формирования полосы 3 *ftz* у двух эмбрионов из временного класса 3 (F,G) Временная вариабельность формирования областей экспрессии генов pair-rule (F) и генов gap (G). Для каждого временного класса показан процент эмбрионов, у которых появилась обозначенная область экспрессии. И.Ф. - интенсивность флуоресценции

ло 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)

Уменьшение всех типов вариабельности экспрессии генов сегментации у эмбрионов дикого типа, происходящее к концу цикла 14А, может служить иллюстрацией феномена канализации, предложенного К. Уоддингтоном (Waddington, 1942). Детерминация сегментов на стадии бластодермы не осуществляется по фиксированному пути, т.е. по одной траектории развития. Напротив, существует целый ряд траекторий развития, совместимых с жизнеспособностью, которые сходятся к моменту начала гаструляции и приводят к формированию устойчивых фенотипов личинок.

Эмбрионы *Kr*–, *kni*– и *Kr;kni*–. 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 (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Wieschaus et al., 1984). Таким образом, всесторонне анализируя вариабельность экспрессии генов сегментации у мутантных эмбрионов, можно предположить, какой тип вариабельности (т.е. вариабельность уровней экспрессии, позиционная вариабельность, см. выше) ответственен за вариабельность фенотипов личинок.

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. 4А-D). Однако к моменту гаструляции вариабельность в области полос 4–6 значительно снижается, тогда как область 2–3 все еще остается вариабельной (Рис. 4Е-Н). Более того,

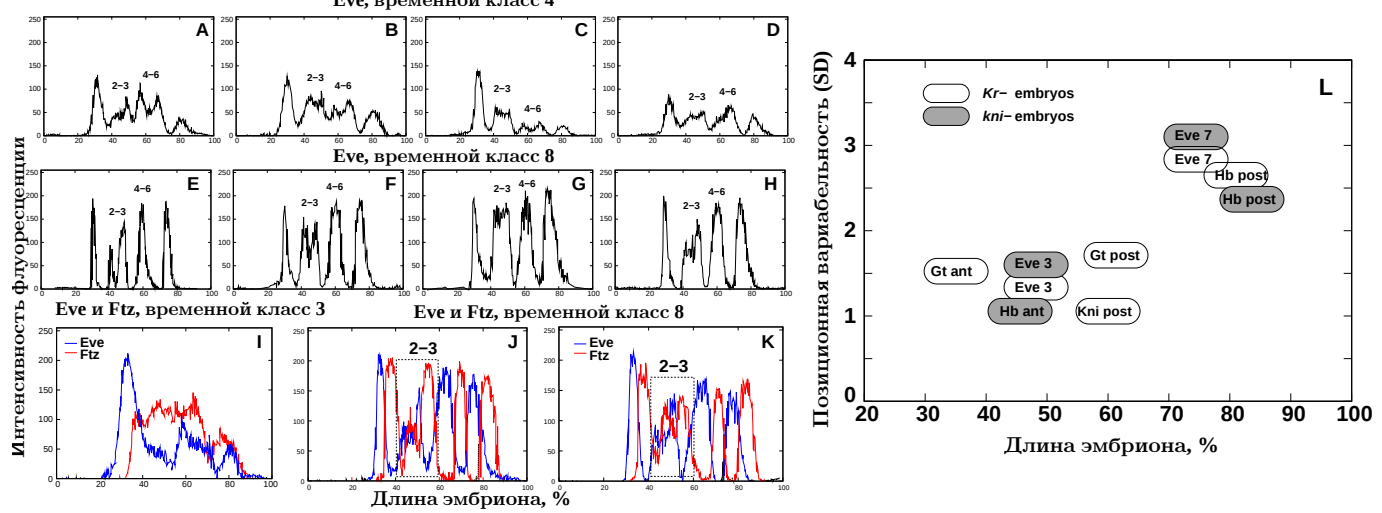


Рис. 4: (A-H) Картины экспрессии *eve* во временных классах 4 (A-D) и 8 (E-H). (I-K) Совмещенные картины экспрессии *eve* и *ftz* у эмбриона из временного класса 3 (I) и двух эмбрионов из временного класса 8 со сходной экспрессией *eve*, но различающейся экспрессией *ftz* в области полос 2-3 (пунктирная рамка). (L) Зависимость уровня пространственной вариабельности от А-П позиций областей экспрессии у одиночных мутантов. Значения стандартных отклонений А-П позиций областей экспрессии генов у эмбрионов *Kr-* и *kni-* показаны для позднего цикла 14А.

в области 2-3 сохраняется вариабельность относительных уровней экспрессии *eve* и *ftz* (Рис. 4J,K) (Surkova et al., 2013).

Известно, что у эмбрионов дикого типа относительные уровни экспрессии комплементарных паттернов *eve* и *ftz* в середине-конце цикла 14А определяют относительные размеры нечетных и четных парасегментов (Fujioka et al., 1995; Hughes and Krause, 2001; Fujioka et al., 2002). Таким образом, вариабельность относительных уровней *Eve* и *Ftz* в области 2-3, наблюдаемая у эмбрионов *Kr-*, может влиять на точность детерминации границ парасегментов. Эта гипотеза находится в соответствии с тем, что фенотипы личинок *Kr-* вариабельны именно в anteriорной области.

Анализ пространственной вариабельности картин экспрессии у мутантных эмбрионов показал, что у одиночных мутантов по *Kr* и *kni* в anteriорной и центральной частях эмбриона уровень позиционной ошибки, наблюдаемый в раннем цикле 14А, уменьшается со временем, и в конце цикла 14А не превышает такового у эмбрионов дикого типа. Однако в постериорной части эмбриона позиционная ошибка не снижается со временем, и в случае полосы 7 *eve* перед началом гаструляции составляет 3.0% ДЭ как у эмбрионов *Kr-*, так и *kni-* (Рис. 4L), (Surkova et al., 2013).

У двойных нуль-мутантов *Kr;kni* уровень позиционной вариабельности экспрессии генов завышен по сравнению с таковым у эмбрионов дикого типа как в anteriорных, так и в постериорных областях экспрессии ($SD = 2-3\%$ ДЭ), и не снижается со временем. Таким образом, можно заключить, что если продукты двух генов гар удаляются из регуляторной системы сегментации, пространственная точность экспрессии других генов нарушается вдоль всей А-П оси эмбриона (Surkova et al., 2013).

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 публикаций по теме диссертации 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 // *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. Hofstaedt), 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.