

УДК 574.24

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАННЕГО ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ПЛОДОВОЙ МУШКИ ДРОЗОФИЛЫ¹

© 2011 г. С. Ю. Суркова¹, В. В. Гурский², Дж. Райниц³, М. Г. Самсонова¹

¹ Отдел компьютерной биологии Центра перспективных исследований Санкт-Петербургского политехнического университета, 195251 Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

² Физико-технический институт РАН, 194021 Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26

³ Университет Чикаго, IL 60637-1546 Чикаго, США

E-mail: surkova@spbcas.ru

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 канализации. Данная работа представляет собою краткое обобщение результатов исследований, в которых экспериментальный и теоретический подходы были использованы для выяснения механизмов канализации вариабельности экспрессии генов сегментации.

Ключевые слова: биология развития, математическое моделирование, канализация развития, дрозофила, сегментация.

ВВЕДЕНИЕ

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 канализации.

Гипотеза о канализации экспрессии генов в процессе развития была выдвинута в 40-х годах XX века известным британским ученым Конрадом Уоддингтоном (Conrad Waddington). В основу этой гипотезы 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 постулировал, что в организмах, подвергающихся естественному отбору, процессы развития обычно канализованы и что существует конечное число траекторий развития, названных им креодами (Waddington, 1962). Эти траектории регулируются таким образом, чтобы обеспечить один и тот же конечный результат, независимо от вариабельности условий развития. Т.е. каждый креод должен оставаться стабильным при наличии небольших возмущений (Waddington, 1940, 1957).

Метафорическим представлением явления канализации явился эпигенетический ландшафт Уоддингтона, где развивающаяся система представлена горным ландшафтом, состоящим из хребтов и долин, по которому катится шар (рис. 1). 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 вариабельности на уровне фенотипа доказано как теоретическими, так и экспериментальными исследованиями. Последние позволили обнаружить гены, ответственные за канализацию (Rutherford, Lindquist, 1998; Sollars et al., 2002). Однако модельные системы для изучения канализации до сих пор отсутствуют. Такие системы должны отвечать определенным требованиям. Во-первых, высокая вариабельность компонентов системы должна существенно уменьшаться в процессе развития. Во-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке грантов NIH RR07801, АФГР RUB1-1578, РФФИ 08-04-00712-а, 08-01-00315-а, 10-01-00627-а.



Рис. 1. Эпигенетический ландшафт Уолдингтона. 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. Рисунок сделан на основе фотографии склона Монблан (© А.М. Самсонов).

вторых, подобное уменьшение вариабельности должно быть собственным свойством системы и не быть обусловленным воздействием других систем организма или внешних факторов.

Система генов сегментации у дрозофилы (Акам, 1987) полностью отвечает этим двум требованиям. Во-первых, естественным свойством этой системы является уменьшение фенотипической вариабельности в ходе развития (Surkova et al., 2008). Таким образом, в систему не нужно вносить искусственные возмущения для изучения буферизации вариабельности. Кроме того, для этой системы получены высокоточные количественные данные по экспрессии генов сегментации во времени и пространстве (Суркова и др., 2008). Детальный анализ этих данных показал, что экспрессия зиготических генов сегментации у индивидуальных эмбрионов высоко вариабельна в цикле 13 и раннем цикле 14А. Эта вариабельность проявляется в изменчивости уровней экспрессии генов, вариабельности порядка, типа и времени формирования индивидуальных областей экспрессии, а также в вариабельности положения этих областей. Все эти типы вариабельности канализируются в конце цикла 14А, перед началом гастрюляции в стабильные картины экспрессии, обладающие значительно меньшей вариабельностью (Surkova et al., 2008). Уменьшение вариабельности перед гастрюляцией имеет важное биологическое значение, т.к. картины экспрессии генов *wingless* и

engrailed, которые определяют позиции первичных компартментов тела дрозофилы (парасегментов), имеют ширину всего лишь в одно ядро. и являются мишенями зиготических генов *gap* и *pair-rule*.

Из всех типов вариабельности зиготических генов сегментации наибольший интерес представляет вариабельность положения границ областей экспрессии. Канализация вариабельности положения этих границ прежде всего выражается в том, что высокая вариабельность экспрессии материнского гена *bicoid* (*bcd*) в несколько раз уменьшается на уровне экспрессии зиготических генов *gap* и *pair-rule*, регулируемых *Bcd*. Экспрессия *bcd* представляет собой антеропостериорный градиент, большое количество экспериментальных данных свидетельствуют о том, что *Bcd* является морфогеном (Driever, Nusslein-Volhard, 1988). В простейшем представлении модели французского флага, границы областей экспрессии генов-мишеней должны формироваться в позициях фиксированных пороговых концентраций этого морфогена (Wolpert, 1969). Вопрос о механизмах уменьшения, или фильтрации вариабельности *Bcd* на уровне генов-мишеней оставался открытым.

Из всех границ областей экспрессии генов-мишеней *Bcd* наибольшее внимание исследователей было уделено низкой вариабельности задней границы антериорной области экспрессии гена *hunchback* (*hb*) (Houchmanzadeh et al., 2002, 2005; Gregor et al., 2007a; Hardway et al., 2008; He et al., 2008) (рис. 2д, е).

Однако, в большинстве случаев, *hb* рассматривался исключительно как мишень *Bcd*, без учета его взаимодействий с другими зиготическими генами. Это некорректно, т.к. положение его границы смещается у эмбрионов, мутантных по *giant (gt)*, *Kruppel (Kr)*, *Kr;kni* и у эмбрионов с отсутствием белка Nanos (Houchmanzadeh et al., 2002, Clyde et al., 2003). Таким образом, чтобы выявить механизмы канализации позиционной вариабельности в системе сегментации, необходимо принимать во внимание все генные взаимодействия, обеспечивающие формирование паттерна во времени и пространстве.

Данная работа представляет собою краткое обобщение результатов наших исследований, в которых экспериментальный и теоретический подходы были использованы для выяснения механизмов канализации вариабельности экспрессии генов сегментации (Surkova et al., 2008; Manu et al., 2009a, b). В качестве теоретического подхода в этих работах использовали математическое моделирование. Математическое моделирование позволяет реконструировать механизмы регуляции *in silico* и доказать достаточность найденных регуляторных механизмов без проведения экспериментов по реконструкции системы *ab initio*. Другой важной особенностью математического моделирования является его способность проследить *in silico* динамику вкладов всех регуляторов в регуляцию каждого гена исследуемой биологической системы. Современные экспериментальные методы не позволяют получить такую информацию в одном эксперименте: обычно информацию о функции гена в системе получают по результатам инактивации его при мутациях, а структура сети генов реконструируется на основании большого количества подобных экспериментов.

Важно подчеркнуть, что концепция эпигенетического ландшафта Уоддингтона появилась под влиянием теории динамических систем, в наибольшей мере связанной с именем Анри Пуанкаре (Henri Poincaré). Динамическая система составляет систему связей, описывающую эволюцию переменных системы во времени и их зависимость друг от друга. В каждый момент времени система может быть представлена одной точкой в многомерном пространстве состояний (фазовом пространстве), оси которого представляют значения каждой из переменных системы. Каждая точка в пространстве состояний ассоциирована с вектором, представляющим направление и скорость эволюции системы, начиная с этой точки. Несколько изолированных точек будут являться “аттракторами”, к которым система будет двигаться спонтанно с течением времени (Thom, 1983). Состояния аттрактора локально стабильны относительно небольших возмущений системы, и по этой причине было предложено, что конечные типы клеток являются аттракторами. Эпигенетический ландшафт Уоддингтона — это метафорическое представление динамической системы, в которой оси — это концентрации всех субстан-

ций, или всех генных продуктов в клетке. Все клетки эмбриона будут развиваться в соответствии с теми же законами, но из-за разницы в индуцирующих сигналах, клетки в разных частях организма будут следовать разным траекториям развития, и в результате придут к разным аттракторам, которые представляют собой разные состояния окончательной дифференцировки (Slack, 2002).

Таким образом, аттрактор — своего рода качественное свойство, которое может объяснить стабильность траекторий развития, а следовательно, и явление канализации. Анализ системы генов сегментации как динамической системы, выполненный в работе Manu et al., 2009b, позволяет рассматривать канализацию вариабельности как результат действия аттракторов в фазовом пространстве концентраций генных продуктов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Количественные данные по экспрессии генов

Для изучения механизмов канализации в системе генов сегментации было использовано около 1600 эмбрионов дрозофилы дикого типа (Oregon R), находящихся на стадии бластодермы. В эмбрионах методом непрямого иммунофлуоресцентного маркирования окрашивались белковые продукты 14-ти генов сегментации: *bcd*, *caudal (cad)*, *Kr*, *kni*, *tailless (tll)*, *giant (gt)*, *hb*, *even-skipped (eve)*, *fushi tarazu (ftz)*, *odd-skipped (odd)*, *hairy (h)*, *runt (run)*, *paired (prd)* и *sloppy paired (slp)* (Kosman et al., 1998; Surkova et al., 2008).

Двойные мутанты по генам *Kr* и *kni* (*Kr;kni*) были получены путем скрещивания одиночных мутантов *Kr¹* и *Df(3L)gi-79c*. Мутантные эмбрионы прокрашивали для выявления экспрессии *hb* и *gt*.

Цифровые изображения картин экспрессии генов мы получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP2, уровни сигнала настраивали в соответствии со шкалой 0–255 для обеспечения максимального динамического диапазона без эффекта насыщения (Janssens et al., 2005; Surkova et al., 2008).

Количественные данные по экспрессии генов получали с помощью методов и программ, описанных в ранее опубликованных работах (Myasnikova et al., 2001; Janssens et al., 2005; Суркова и др., 2008; Kozlov et al., 2009). Обработка изображений включала в себя (1) сегментацию изображений, (2) удаление фонового сигнала, (3) временную классификацию эмбрионов, (4) регистрацию изображений, (5) усреднение данных по временным классам для получения интегрированных, или эталонных данных по экспрессии каждого гена.

Поскольку гены сегментации действуют по большей части независимо от генов, контролирующих полярность эмбриона вдоль дорсовентральной оси (Carroll et al., 1987; Zeitlinger et al., 2007), корректным является рассмотрение экспрессии этих генов в од-

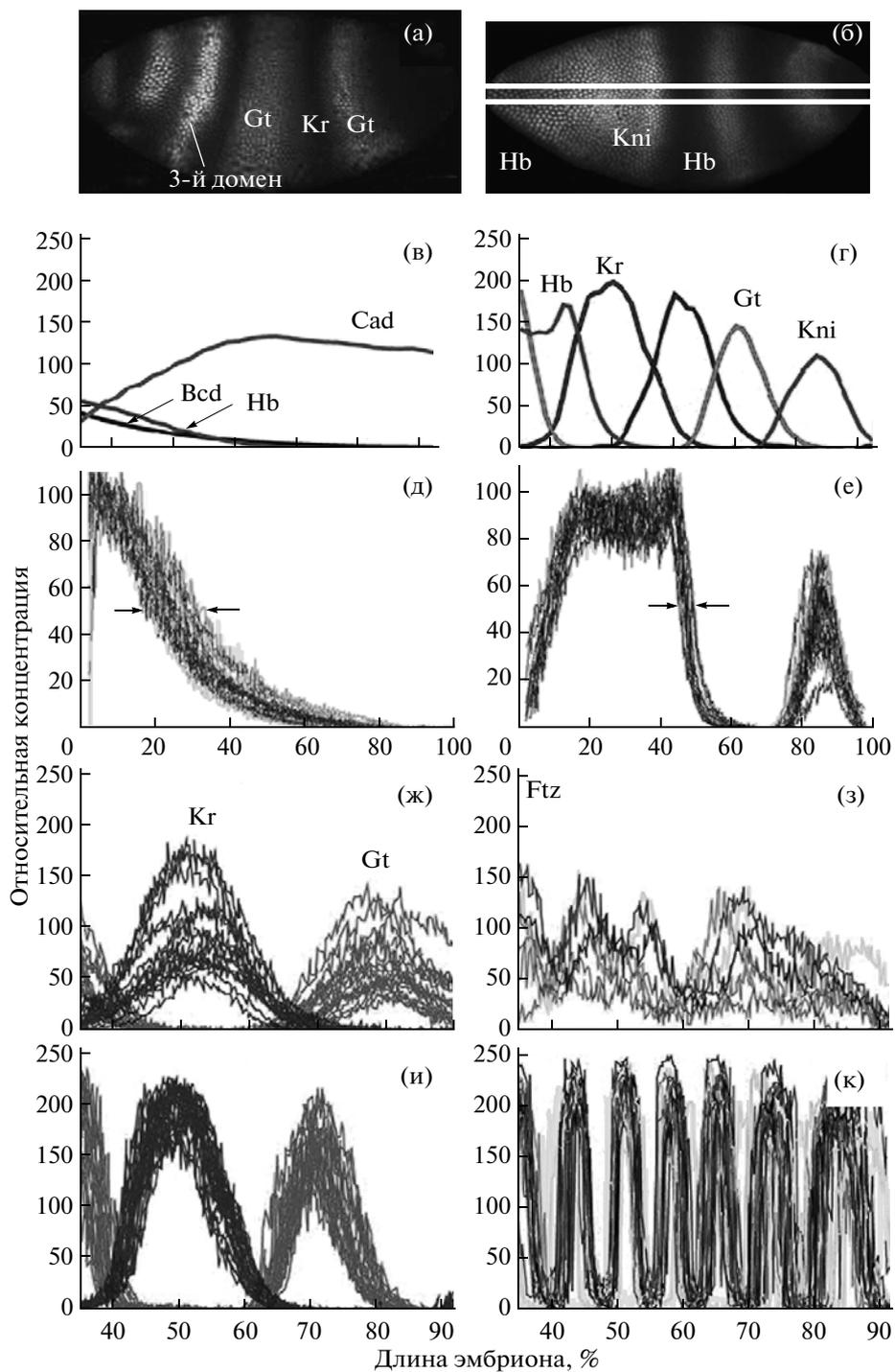


Рис. 2. Изображения картин экспрессии генов сегментации и одномерные количественные данные. (а, б). Изображения картин экспрессии генов *Kr* и *gt* (а), *hb* и *kni* (б) во временном классе 8 (~3 мин до начала гастрюляции). На рис. (а) белой стрелкой показан третий домен экспрессии *Gt*, белые полосы на рис. (б) обозначают 10% полосу в направлении А–П, из которой извлекались одномерные количественные данные. Антериорный конец эмбриона находится слева, дорсальная сторона сверху. (в, г). Одномерные усредненные количественные данные для материнских градиентов *Bcd* (цикл 13), *Hb* (цикл 12) и *Cad* (цикл 12) (в). Усредненные количественные данные по экспрессии генов *hb* во временном классе 8 (г). (д, е). Фильтрация варибельности градиента *Bcd* на уровне его гена-мишени *hb*. Показаны 43 картины экспрессии *Bcd* (д) и 19 картин экспрессии гена *hb* в цикле 14А (е). Размах А–П позиций пороговых концентраций показан стрелками. (ж–к). Уменьшение варибельности картин экспрессии генов сегментации во времени. (ж, и) Ранние (~ за 47 мин до начала гастрюляции) (ж) и поздние ~ за 3 мин до начала гастрюляции (и) картины экспрессии генов *Kr* и *gt*. (з, к) Ранние (~ за 34 мин до начала гастрюляции) (з) и поздние ~ за 3 мин до начала гастрюляции (к) картины экспрессии *pair-rule* гена *ftz*.

ном направлении — вдоль антеропостериорной оси (А–П). Поэтому в рассматриваемых в данном обзоре работах использовались количественные данные из полоски шириной 10%, вырезанной из центральной области эмбриона в направлении А–П (рис. 2). Количественные данные по экспрессии генов имеют временное разрешение в 6.5 мин развития и пространственное разрешение в 1 ядро и находятся в свободном доступе в сети Интернет (<http://urchin.spbcas.ru/flyex>) (Pisarev et al., 2009).

Математическое моделирование

Реконструкцию генных сетей проводят в рамках математической модели, описывающей экспериментальные данные. Обыкновенные дифференциальные уравнения — наиболее часто используемый формализм для моделирования процесса экспрессии в генных сетях. Уравнения модели формулируются на феноменологическом уровне описания биологической системы, в котором основные молекулярные процессы регуляции представляются разумно упрощенными математическими выражениями.

Для моделирования эффекта канализации высокой вариабельности в стабильный паттерн сегментации была использована модель, успешно примененная нами для моделирования динамики экспрессии генов *gar* (Jaeger et al., 2004 a, b) с небольшими модификациями (Manu et al., 2009 a, b).

Осуществлялось моделирование картин экспрессии *gar* генов *hb*, *Kr*, *gt* и *kni* в пространственной области от 35 до 92% длины эмбриона (ДЭ) вдоль А–П оси. Именно в этой пространственной области эмбриона в дальнейшем формируются сегменты.

Модель вычисляет изменение концентрации генных продуктов в ядрах во времени, начиная с цикла дробления 13, и заканчивая началом гаструляции, начальные условия определяются с использованием данных 12-го цикла дробления. Во время митоза, происходящего перед 13-м делением ядер, концентрация белков определяется исключительно диффузией и распадом, т.к. синтез белка выключен. Во время интерфазы синтез белка зависит от регуляции гена продуктами других генов *gar*, материнским градиентом *Vcd*, а также, продуктами генов *cad* и *ill*.

Модель описывает динамику концентраций белков генов *gar* вдоль переднезадней оси раннего эмбриона дрозофилы и имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{dv_i^a}{dt} = & R^a g \left(\sum_{b=1}^N T^{ab} v_i^b(t) + m^a v_i^{Bcd} + \right. \\ & \left. + \sum_{\beta=1}^{N_e} E^{a\beta} v_i^\beta(t) + h^a \right) - \lambda^a v_i^a + \\ & + D^a(n) [(v_{i-1}^a - v_i^a) + (v_{i+1}^a - v_i^a)], \end{aligned} \quad (1)$$

где $1 \leq a \leq N$, $1 \leq i \leq M$, $v_i^a = v_i^a(t)$ — концентрация *a*-го белка в *i*-м ядре на переднезадней оси, $N = 4$ — число генов *gar* в моделируемой генной сети.

В качестве функции синтеза *g* выбрана функция $g(y) = 1/2(1 + y/\sqrt{1 + y^2})$ с сигмоидным графиком. В качестве “внешних” факторов, которые регулируют гены *gar*, но не испытывают регуляторных воздействий со стороны последних, в модели учтены концентрация v_i^{Bcd} материнского белка *Vcd* и $N_e = 2$ зависящих от времени концентраций $v_i^\beta(t)$ транскрипционных факторов *Cad* и *Ill*. Параметры T^{ab} , m^a и $E^{a\beta}$ численно описывают характер (активация или репрессия) и силу регуляторного влияния на ген *a* со стороны, соответственно, других *gar* генов *b*, гена *bcd*, и генов *cad* и *ill*. Константа h^a модулирует положение порогового значения аргумента функции синтеза *g* и может интерпретироваться как регуляторный вклад от факторов, однородных по пространству и времени. Аргумент функции *g* суммирует все вклады в регуляцию *a*-го гена и, таким образом, представляет собой общий регуляторный вклад в данном ядре *i* и в данный момент *t*. Константы R^a и λ^a суть характеристические скорости синтеза и распада белков, соответственно. Число уравнений $N \times M$ в (2) удваивается после каждого деления, поскольку удваивается число ядер: $M = M(n)$, $M(n + 1) = 2M(n)$, где *n* — номер клеточного цикла. Коэффициент диффузии $D^a(n)$ также зависит от номера клеточного цикла, поскольку расстояния между ядрами уменьшается вдвое после каждого деления и коэффициент обратно пропорционально зависит от квадрата этого расстояния: $D^a(n + 1) = 4D^a(n)$.

Другая модификация модели заключалась в том, что вместо усредненных данных для *Vcd* использовали данные индивидуального эмбриона, у которого параметры градиента имели медианные значения. Отказ от использования усредненных данных обусловлен следующими соображениями: градиент *Vcd* меняется вдоль передне-задней оси по квазиэкспоненциальному закону, и среднее арифметическое нескольких экспонент имеет не экспоненциальное распределение; это не позволяет получить наиболее характерный градиент путем арифметического усреднения градиентов у индивидуальных эмбрионов. Очевидно, что для реконструкции генной сети необходимо не только найти, какие гены взаимодействуют друг с другом, но и определить параметры этих взаимодействий. Несмотря на огромный прогресс молекулярной биологии в последние годы, многие такие параметры все еще не могут быть измерены в эксперименте и, поэтому их приходится находить, решая обратную задачу, т.е. путем подгонки решений модельных уравнений к экспериментальным данным по экспрессии генов. При этом используется широкий арсенал методов оптимизации, таких, как метод численного отжига, различные ге-

нетические алгоритмы, градиентный метод. Часто для увеличения эффективности поиска эти методы комбинируют, например, в работах (Gursky et al., 2004; Ashyraliyev et al., 2009) сначала одним из методов глобального поиска находят приближенные значения параметров, а затем используют эти значения в качестве стартовой точки для метода наискорейшего спуска.

Для исследования стабильности траекторий развития был проведен динамический анализ поведения системы (Manu et al., 2009b). Исходная модель описывает поведение системы в 58 ядрах и для 4 генов *gar*, и, таким образом, размерность динамической системы равняется 232, что делает проблематичной визуализацию результатов динамического анализа. Вследствие этого было проведено уменьшение размерности системы путем исключения из модели диффузии (которая, согласно экспериментальным данным не играет значительной роли в бластомере дрозофилы (DeLotto et al., 2007) и сужение области моделирования до 35–71% ДЭ, что позволило исключить из рассмотрения терминальный ген *tl*. В такой упрощенной системе области экспрессии генов *gar* формируются в правильной последовательности и позициях, хотя и имеют более острые границы (Manu et al., 2009b). Позиционная информация задается концентрациями v^{bcd} и v^{cad} , $v^{bcd(x)}$ и $v^{cad(x)}$ соответственно; биологически реализуемые траектории решений уравнений для генов *gar* в ядре определяются начальными условиями — концентрацией материнского *Nb*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамическое уменьшение вариабельности картин экспрессии генов

Анализ количественных данных по экспрессии генов сегментации показывает, что на ранних стадиях формирования паттернов, в 13-м цикле деления эмбриона, а также в начале цикла 14А наблюдается существенная вариабельность картин экспрессии зиготических генов. Эта вариабельность выявляется при анализе картин экспрессии у индивидуальных эмбрионов и выражается в высокой изменчивости уровней экспрессии генов, положений границ областей их экспрессии, времени, типов и последовательности формирования областей. Однако нами было выявлено, что все эти виды вариабельности значительно уменьшаются к моменту окончания цикла 14А, т.е. к началу гастрюляции (Surkova et al., 2008).

На рис. 2ж, и показаны ранние и поздние картины экспрессии генов *Kr* и *gt*. Вариабельность (измеренная как стандартное отклонение) максимального уровня экспрессии *Kr* в цикле деления ядер 13 составляет 33, а перед гастрюляцией уменьшается до 17.4. В случае заднего домена *gt* стандартное откло-

нение максимального уровня экспрессии со временем уменьшается с 24.5 до 15.4 (рис. 2ж, и).

На рис. 2з видно, что форма и уровень экспрессии в ранних областях экспрессии *pair-rule* гена *ftz* очень сильно варьируют между индивидуальными эмбрионами, но к концу цикла 14А картины экспрессии у всех эмбрионов приобретают форму 7-ми полос (рис. 2к). Подобная закономерность свойственна всем исследованным генам *pair-rule*. Полосы *pair-rule* формируются в разной последовательности, таким образом, в одном и том же временном классе могут наблюдаться совершенно различные картины экспрессии одного и того же гена. Кроме того, полосы также могут формироваться разными способами, а именно, на границе (склоне) уже существующей полосы, делением полосы надвое, или появляться заново в области, где отсутствует экспрессия. При этом, одна и та же полоса может формироваться у разных эмбрионов в широком временном диапазоне от 6 до 24 минут. Это очень существенный уровень временной вариабельности, если учитывать, что области экспрессии генов *pair-rule* полностью формируются в течение примерно 50 минут развития (Surkova et al., 2008).

Подобное уменьшение вариабельности картин экспрессии происходит к моменту завершения детерминации сегментов и формирования клеточных мембран, обособливающих ядра в отдельные клетки.

Фильтрация пространственной вариабельности

Однако наиболее исследуемым и спорным типом вариабельности картин экспрессии генов сегментации, является позиционная вариабельность. Согласно теории позиционной информации, судьба клетки определяется ее положением в определенном пространственном поле зародыша, в котором существует градиент концентрации некой сигнальной молекулы, называемой морфогеном (Wolpert, 1969). Считывание информации о градиенте морфогена и ее интерпретация приводят к активации разных комбинаций генов в зависимости от уровня концентрации морфогена. Большое количество экспериментальных данных свидетельствуют о том, что у дрозофилы продукт материнского гена *bcd* является морфогеном (Driever, Nusslein-Volhard, 1988).

мРНК гена *bcd* локализована в anteriорном полюсе яйца и ее белковый продукт путем диффузии формирует градиент вдоль основной оси эмбриона. Этот белок координирует формирование паттернов вдоль А–П оси в зависимости от уровней концентрации путем прямого взаимодействия с генами *gar* и *pair-rule*. Многие авторы указывают на невозможность точного позиционирования доменов генов-мишеней путем прямого считывания информации, заложенной в морфогенетическом градиенте (Lacalli, Harrison, 1991). То есть, даже при очень точном считывании, позиционная ошибка генов-мишеней

должна оставаться такой же, как у градиента морфогена, но более вероятно, что молекулярный шум еще увеличит ее уровень. Особенно сильно подобная ошибка должна проявляться при удалении от источника градиента.

Однако, было показано, что позиционная ошибка градиента продукта материнского гена *bcd* существенно уменьшается (“фильтруется”) на уровне зиготических генов *gar* и *pair-rule*. Из всех границ областей экспрессии генов-мишеней *Vcd*, формирующихся с большей точностью, наибольшее внимание исследователей было уделено низкой вариативности задней границы anteriорной области экспрессии гена *hb* (Houchmanzadeh et al., 2002, 2005; Gregor et al., 2007a; Hardway et al., 2008; He et al., 2008) (рис. 2д, е).

Подобная фильтрация имеет динамический характер, как и другие виды вариативности: позиционная ошибка уменьшается у поздних картин экспрессии в сравнении с ранними (Surkova et al., 2008). В цикле дробления 13 уровень ошибки позиционирования генов *gar* еще достаточно высок, но все же значительно ниже, чем у градиента *Vcd*. Эта ошибка все еще завышена в начале цикла 14А, но к середине цикла она понижается и в дальнейшем остается стабильно низкой. В примере, приведенном на рис. 2, в начале цикла 14А стандартное отклонение положений границ областей экспрессии *Kr* и *gt* составляет соответственно 1.9 и 2.5% ДЭ, а в конце цикла – 1.0 и 1.2% ДЭ. Для сравнения, позиционная ошибка градиента *Vcd* в позиции, соответствующей 50% его максимальной концентрации в цикле 14А, составляет 4.6% ДЭ (рис. 2д).

Таким образом, позиционирование доменов экспрессии генов *gar*, являющихся мишенями действия материнского морфогена *Vcd*, происходит с точностью, превышающей ожидаемую при условии исключительного контроля положения областей экспрессии генов-мишеней градиентом морфогена.

Кросс-регуляция генов gar как механизм канализации экспрессии генов в бластодерме дрозофилы

Для исследования механизмов фильтрации позиционной вариативности материнского градиента *Vcd* на уровне зиготических генов нами были проведены численные эксперименты (Manu et al., 2009a) в рамках модели, описанной в разделе “Математическое моделирование”.

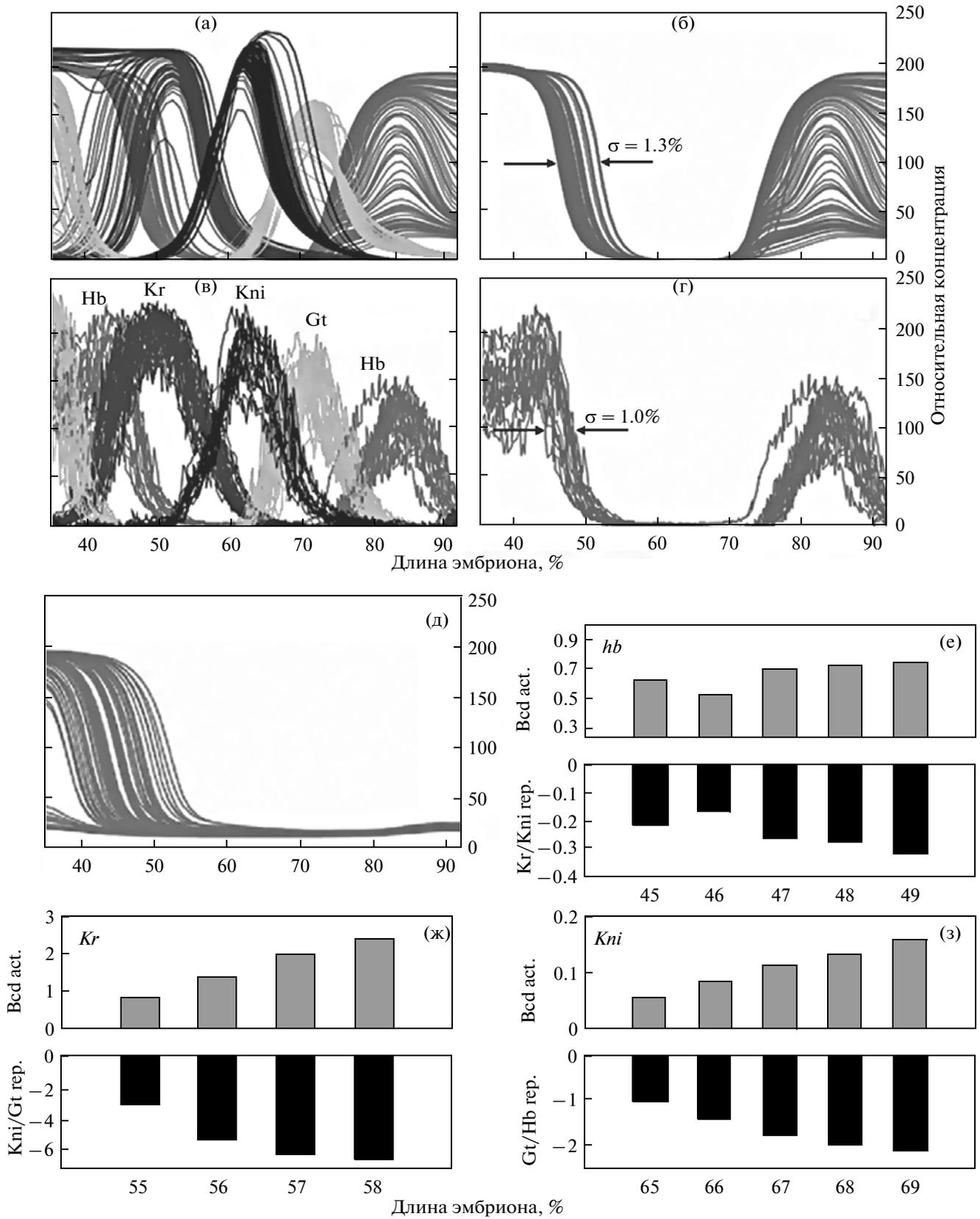
В каждом из 88 численных экспериментов был использован паттерн *Vcd* конкретного индивидуального эмбриона. Все параметры генной сети оставались фиксированными, и только вклад *Vcd* варьировал. Уровень пространственной вариативности границ областей экспрессии генов *gar* в модели сравнивали с вариативностью профилей *Vcd*. Положение границ областей экспрессии генов *gar*

определяли в точках, где уровень экспрессии достигал 50% от максимального; позиционной вариативностью границы считалось стандартное отклонение ее позиции в 88 численных экспериментах. Позиционной вариативностью профилей *Vcd* (x_{bcd}) считалось стандартное отклонение точки, где каждый профиль пересекал определенное пороговое значение концентрации (рис. 2д, е). Пороговым значением концентрации *Vcd* для конкретной границы домена *gar* являлась концентрация, при которой граница формировалась в генной сети с использованием медианного градиента *Vcd* (см. раздел “Математическое моделирование”).

Модель правильно воспроизводит позиционную вариативность 6-ти границ областей экспрессии генов *gar*: задней границы anteriорной области экспрессии *hb*, задней границы центральной области экспрессии *Kr*, обеих границ постериорных областей экспрессии *kni* и *gt* (рис. 3а, б). Так, например, задняя граница anteriорной области экспрессии *hb* в численных экспериментах имеет стандартное отклонение 1.3% длины эмбриона (ДЭ) и 1.0% ДЭ в экспериментальных данных (рис. 3), причем оба эти значения значительно меньше стандартного отклонения для пороговой концентрации *Vcd*, равного 4.6% ДЭ (рис. 2д). Четыре границы областей экспрессии, формирующихся на краях моделируемой области, имели высокую вариативность, т.к. модель не учитывала регуляторов, действующих в головном и хвостовом отделе эмбриона, которые необходимы для формирования этих границ (Gaul, Jäckle, 1987; Kraut, Levine, 1991; Rivera-Pomar et al., 1995).

Канализация высокой вариативности, присущей морфогену *Vcd*, в стабильную картину экспрессии генов *gar* является следствием регуляторных взаимодействий этих генов: модификация модели путем исключения регуляторных воздействий на ген *hb* со стороны других генов *gar* приводит к увеличению вариативности задней границы anteriорной области экспрессии *hb* до 4.3% ДЭ, т.е. практически достигает уровня вариативности позиции пороговой концентрации *Vcd* (рис. 3д).

Идентификацию регуляторных взаимодействий, ответственных за канализацию вариативности и формирование устойчивых границ экспрессии генов *gar*, осуществляли путем регуляторного анализа решений модели (Jaeger et al., 2004a, b; Manu et al., 2009a). Этот анализ показал, что каждая из правильно предсказываемых моделью границ областей экспрессии генов *gar*, формируется в результате действия активатора (*Vcd* или *Cad*) и двух репрессоров. Так, задняя граница anteriорной области экспрессии гена *hb* формируется в результате активации *Vcd* и репрессии под действием *Kr* и *Kni*. Влияние варьирования концентрации *Vcd* на регуляцию этой границы исследовали, группируя совокупность численных решений системы уравнений (1) для каждо-



го градиента Vcd у 88 индивидуальных эмбрионов по положению границы hb с интервалом, равным 1% ДЭ (рис. 3е), и вычисляя средние уровни активации Vcd и совместной репрессии под действием Kr и Kni внутри каждой группы. Оказалось, что при разных положениях границы hb уровни активации и репрессии остаются коррелированными, так, что эмбрионы, у которых граница hb формируется ближе к постериорному концу, имеют более высокие уровни активации Vcd и репрессии под действием Kr и Kni .

Данные результаты находятся в противоречии с ранее опубликованными данными о том, что стандартное отклонение положения границы экспрессии hb остается неизменным у одиночных мутантов по генам Kr или kni . Однако, у ранее не охарактеризованных двойных мутантов $Kr;kni$, стандартное отклонение положения задней границы антериорной области экспрессии hb удваивается, а вариабельность задней границы третьего домена экспрессии gt существенно увеличивается (рис. 4). Эти экспериментальные результаты подтверждают правильность выводов, полученных с помощью математического моделирования, опровергают утверждение о том, что Vcd вносит единственный вклад в регуляцию hb и свидетельствуют о том, что буферизация вариабельности формирования картин экспрессии генов gar является результатом специфических регуляторных взаимодействий между этими генами.

Аналогичный баланс между уровнями активации и репрессии наблюдается при формировании задних границ областей экспрессии Kr и kni (рис. 3ж, з).

Динамические аттракторы как механизм канализации экспрессии генов и сдвигов областей экспрессии во времени

Наблюдаемое в системе генов сегментации уменьшение вариабельности картин экспрессии во времени (рис. 2) указывает на устойчивость траекторий развития эмбриона дрозофилы к возмущениям. Наличие количественных данных, описывающих временную динамику экспрессии генов сегментации, и корректной математической модели позволяет выйти за рамки метафорического представления эпигенетического ландшафта, предложенного Уолдингтоном, и охарактеризовать стабильность траекторий развития в раннем эмбрионе дрозофилы.

Исследование стабильности траекторий системы генов gar было проведено в контексте теории динамических систем (Manu et al., 2009b). В рассматриваемой системе из N генов и M ядер ($M \times N$ переменных), ее состояние можно описать точкой в $M \times N$ -мерном пространстве концентраций, или фазовом пространстве. Концентрации белков gar меняются во времени, и, следовательно, численное решение уравнений — это траектория в этом фазовом пространстве. Динамическая система также может иметь решения, которые не меняются во времени. Подобные решения, называемые состояниями равновесия, представлены одной точкой в фазовом пространстве. Позиции точек равновесия в фазовом пространстве и свойства их устойчивости определяют стабильность общего численного решения, меняющегося во времени.

В окрестности точки равновесия в фазовом пространстве существуют принципиальные направления, по которым решения экспоненциально приближаются, либо удаляются от точки равновесия. Эти направления называются собственными векторами точки равновесия. *Аттрактор* (“узел”) — это точка равновесия, которая со временем притягивает все решения в некоторой окрестности фазового пространства, то есть все собственные вектора направлены к аттрактору (рис. 5б). Эта окрестная область называется *областью притяжения* аттрактора. Другими словами, если концентрации продуктов генов gar оказались в какой-то момент в области притяжения некоторого аттрактора, то спустя время концентрации примут значения, определяемые этим аттрактором. *Седловая точка* равновесия (“седло”) имеет собственные вектора, часть которых направлено к этой точке равновесия, а часть от нее (рис. 5в). В локальной окрестности седловой точки равновесия ее собственные вектора определяют так называемые *инвариантные многообразия* этой точки. Эти многообразия способны действовать в фазовом пространстве аналогично аттракторам, то есть притягивать к себе решения в отдалении от седловой точки.

Если система уравнений зависит от параметра, например, такого, как А–П позиция областей экспрессии генов gar , все решения уравнений, включая состояния равновесия, меняются при изменении значения параметра. Особенный интерес представ-

Рис. 3. Численное моделирование правильно предсказывает вариабельность границ областей экспрессии генов gar . (а) Результаты моделирования картин экспрессии hb , Kr , kni и gt во временном классе 8 (~3 мин до начала гастрюляции) в численном эксперименте с использованием 88 индивидуальных эмбрионов (для сравнения с (в)). (в) Экспериментальные данные по экспрессии генов gar у 83 эмбрионов дикого типа во временном классе 8. (б, г) Вариабельность позиции постериорной границы переднего домена Hb в модели составляет 1.3% ДЭ (б), а в эксперименте 1% ДЭ (г). (д) Контрольный эксперимент *in silico* по моделированию влияния вариабельности Vcd на границу hb при выключенной кросс-регуляции генов gar . Использовались те же паттерны Vcd , как для картин экспрессии, показанных на рис. а и б. При отсутствии кросс-регуляции стандартное отклонение границы Hb увеличивается до 4.6% ДЭ. (е–з) Уровни активации и суммарной репрессии для постериорных границ hb (е), Kr (ж) и kni (з) скоррелированы. Результаты 88 численных экспериментов сгруппированы по положению соответствующих задних границ с интервалом, равным 1% ДЭ, и внутри каждой группы вычислены средние уровни активации (серые прямоугольники) и совместной репрессии (черные прямоугольники).

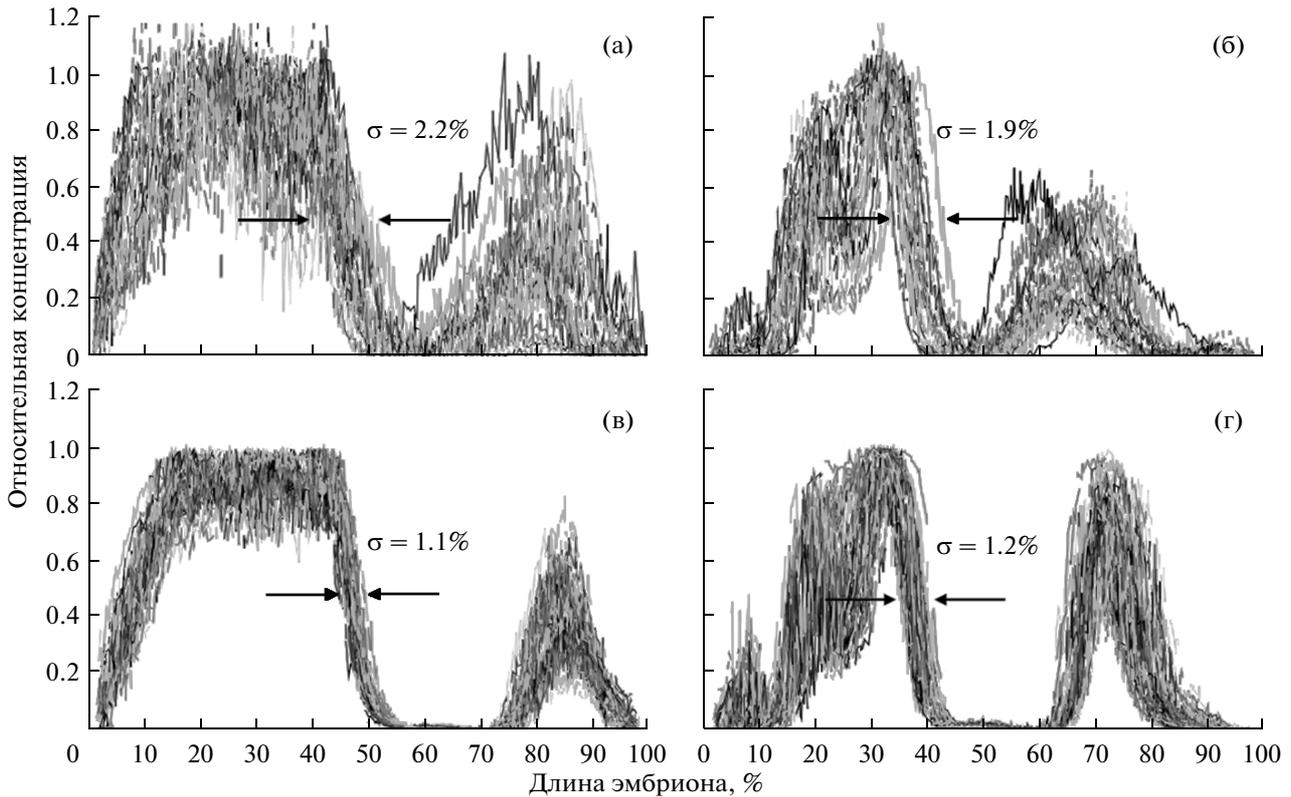


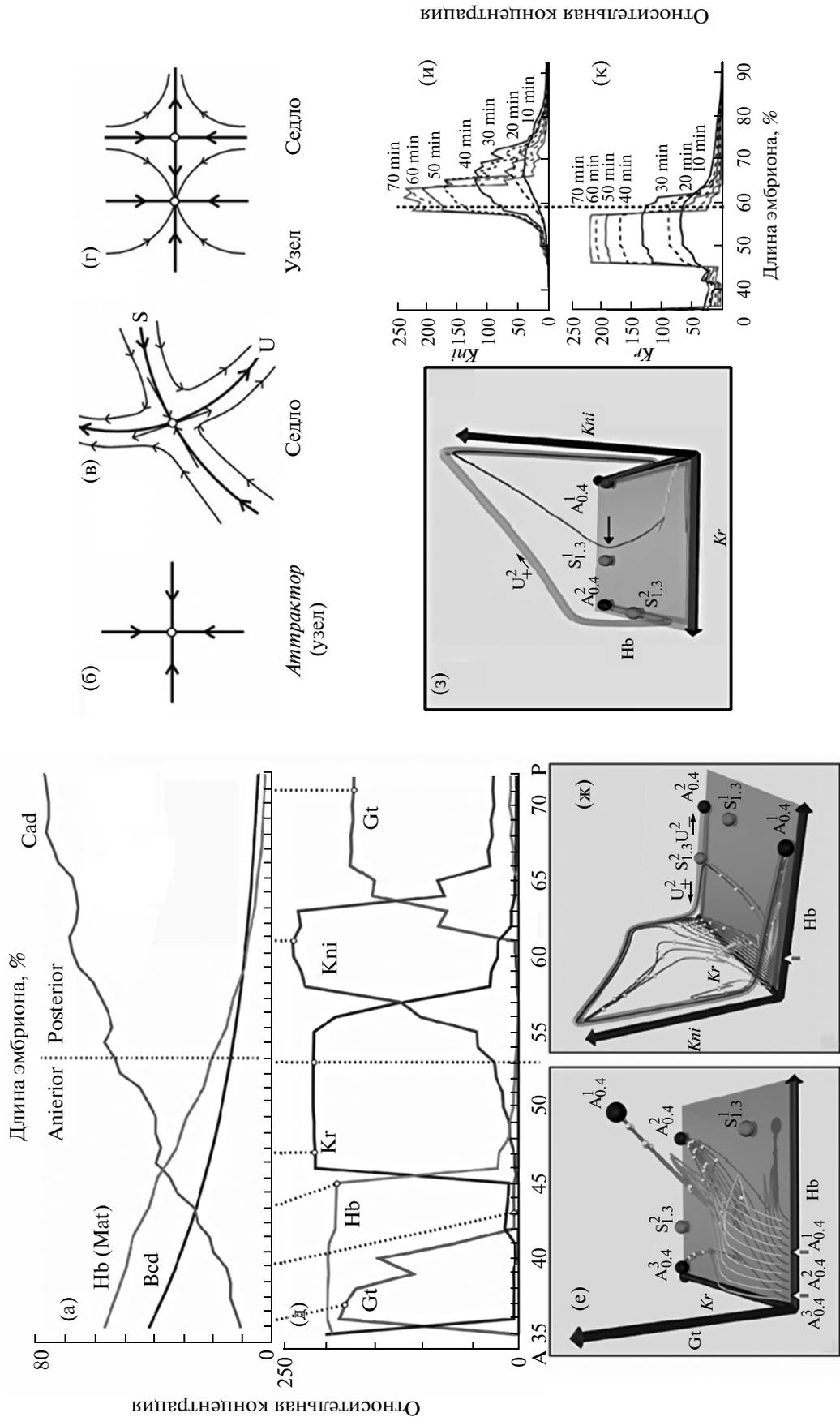
Рис. 4. Вариабельность задней границы anteriorной области экспрессии *hb* находится под контролем *Kr* и *Kni*. Картины экспрессии *hb* (а) и *gt* (б) у 28 эмбрионов, мутантных по генам *Kr* и *kni*, и у 68 эмбрионов дикого типа (в и г соответственно). Показанные картины экспрессии нормированы на максимальный уровень экспрессии в anteriorной области экспрессии *hb* (а, б) или в anteriorной области экспрессии *gt* (б, г). Уровень экспрессии выражен в процентах от максимального уровня.

ляют резкие изменения в поведении решений при вариации параметра, при которых меняется общее количество точек равновесия или их устойчивость. Такие изменения называются *бифуркациями*. Путем бифуркаций происходят качественные изменения в динамике системы. Из многих существующих типов бифуркаций, исследуемой 4-мерной системе генов *gap* с медианным градиентом *Vcd* присущ только

один тип – бифуркация “седло–узел”. В этой бифуркации при некотором значении параметров состояния равновесия аттрактор и седло сливаются друг с другом и оба перестают существовать или, наоборот, рождаются одновременно (рис. 5г).

Для каждого ядра эмбриона в А–П направлении были охарактеризованы аттракторы и области притяжения аттракторов, которые были рассчитаны ис-

Fig. 5. Динамические аттракторы как механизм канализации экспрессии генов *gap*, а также сдвигов областей экспрессии этих генов во времени. Материнские градиенты (а) и результаты моделирования картин экспрессии генов *gap* (д) в области 35–71% ДЭ (в модели с выключенной диффузией). Бифуркация в позиции 53% ДЭ, разделяющая anteriorную и posteriorную области, обозначена пунктирной линией. (б–г). Точки равновесия в фазовом пространстве: аттрактор (узел) (б), седловая точка (седло) с инвариантными многообразиями (в), седло и узел рядом друг с другом (г). При бифуркации типа “седло–узел” седловая точка и аттрактор в (г) постепенно сближаются (при изменении параметра в уравнениях модели), сливаются и перестают существовать. Если параметр меняется в другую сторону, то эти точки равновесия вместе появляются и постепенно отдаляются друг от друга. (е, ж) Anteriorный и posteriorный режимы канализации. Черные шарики – точечные аттракторы, серые – седловые точки равновесия. Траектории обозначены тонкими линиями, временная динамика показана градиацией серого цвета на траекториях. белый цвет соответствует циклу 13, черный – началу гастрюляции. (е) Фазовый портрет ядра в позиции 37% ДЭ (проекция на оси *Hb–Kf–Gt*), иллюстрирующая anteriorный динамический режим. (ж) Фазовый портрет ядра в позиции 57% ДЭ (проекция на оси *Hb–Kf–Kni*), иллюстрирующая posteriorный динамический режим. Одномерное инвариантное многообразие показано в виде серой трубки. (з–к). Пространственные сдвиги областей экспрессии, обусловлены притяжением к многообразию. (и, к) Динамика концентраций белка в ядре в позиции 59% ДЭ, которое области экспрессии *Kr* и *kni* пересекают, когда сдвигаются в anteriorном направлении в ходе цикла 14А. Позиция ядра обозначена вертикальной пунктирной линией. Низкие концентрации *Kr* и *Kni* соответствуют началу цикла 14А, высокие – концу цикла. (з) Проекция фазового портрета этого ядра на оси *Hb–Kf–Kni*. Траектория ядра обозначена градиентом цвета, как на рис. (е, ж). Стрелкой обозначено промежуточное состояние ядра с высокой концентрацией *Kf* перед тем, как оно достигает состояния с высоким содержанием *Kni* перед гастрюляцией.



ходя из наблюдаемого разброса начальных условий - концентрации материнского Hb (См. раздел “Математическое моделирование”). Чтобы охарактеризовать переходные состояния решений, были рассчитаны инвариантные многообразия седловых точек. Анализ фазового пространства показал, что в эмбрионе дрозофилы существуют два типа формирования паттерна в зависимости от положения вдоль оси А-П (Manu et al., 2009b). Антериорный и постериорный динамические режимы разделяет бифуркация седло-узел в положении 53% ДЭ, что соответствует пику центрального домена K_g (рис. 5д).

В антериорной области, заключенной между пиком третьего домена Gt (рис. 2а) и пиком центрального домена K_g, состояние ядра в момент гастрюляции близко к точечному аттрактору. Формирование паттерна в этой области происходит путем выбора одного состояния из множества возможных в фазовом пространстве модели и контролируется концентрациями Vcd и Cad путем определения размеров областей притяжения и положения аттракторов в фазовом пространстве модели. Концентрация материнского Hb отвечает за выбор конкретного аттрактора (рис. 5а). Согласно ранее полученным результатам, паттерн в передней области эмбриона формируется в результате синергетического взаимодействия Vcd и Hb; и проведенный анализ позволяет понять роль этих белков в антериорном паттернинге.

На рисунке 5е показан пример, характеризующий механизмы канализации в антериорной области. Приведен фазовый портрет ядра в А-П позиции 37% ДЭ, эта позиция соответствует пику третьего домена *gt* (рис. 2а) и передней области экспрессии *hb*. Так как фазовое пространство в каждом ядре 4-х мерно (по количеству исследуемых генов *gap*), показана его 3-х мерная проекция на оси Hb-K_g-Gt. Все траектории решений начинаются на оси Hb, в соответствии с начальными условиями во всех ядрах. Аттракторы обозначены черными шариками. Траектории показаны тонкими линиями, временная динамика показана градацией серого цвета на траекториях. Белый цвет соответствует циклу 13, черный - началу гастрюляции. Переход к черному цвету происходит очень близко к аттракторам, это значит, что решение во всех ядрах очень близко к точке равновесия перед гастрюляцией. На рисунке видно, что изначальная вариабельность траекторий очень сильно уменьшается к моменту гастрюляции, таким образом, траектории стабильны благодаря точечным аттракторам. Показанное ядро 37 в соответствии с концентрацией материнского Hb попадает в область притяжения аттрактора $A_{0,4}^1$ в состоянии Hb, Gt-ON (с высокими концентрациями Hb и Gt), что соответствует А-П позиции этого ядра относительно областей экспрессии этих генов (рис. 5е).

Всего в передней области эмбриона формируются три границы экспрессии генов *gap*: задняя грани-

ца третьего домена *gt*, задняя граница антериорного домена *hb* и передняя граница центрального домена *K_g*. Первая из них образуется в результате того, что аттрактор, притягивающий траектории развития в ядрах, расположенных в районе границы, переходит из состояния Gt-ON (с высокой концентрацией Gt) в состояние Gt-OFF. Образование перекрывающихся границ Hb и K_g в области 45–47% ДЭ является результатом переключения траекторий от одного аттрактора с состоянием Hb-ON (до 45% ДЭ) к другому с состоянием K_g-ON (после 47% ДЭ).

Задняя область эмбриона заключена между пиком центральной области экспрессии *K_g* и пиком постериорного домена экспрессии *gt* (Manu et al., 2009b) (рис. 5д). Хотя перед гастрюляцией траектории в этой области не сходятся к одному аттрактору, они сходятся к одной траектории в фазовом пространстве, а именно, к одномерному инвариантному многообразию U_-^2 седловой точки S^2 , показанному на рисунке 5ж в виде серой трубки. Перед гастрюляцией траектории близки к этому многообразию, это видно по изменению цвета на черный при приближении к многообразию. Данное многообразие в постериорной области играет ту же роль, что и аттракторы в антериорной, т.е. отвечает за стабильность траекторий и канализацию. Материнский Hb обеспечивает формирование паттерна в постериорной области, определяя какая часть многообразия U_-^2 будет достигнута решением уравнений в том или ином ядре к моменту гастрюляции: при высоких концентрациях материнского Hb решения уравнений приближаются к состоянию K_g-ON (с высокой концентрацией K_g и низкой концентрацией продуктов других генов *gap*), при промежуточных концентрациях Hb решения достигают состояния K_gi-ON, а при низких концентрациях реализуется состояние Gt-ON. Т.к. материнский Hb убывает монотонно в зависимости от А-П позиции, это приводит к формированию паттернов в постериорной области. Если зафиксировать концентрацию Vcd в постериорном ядре и менять только концентрацию материнского Hb, на выходе модели получаются правильные картины экспрессии генов *gap* (Manu et al., 2009b). Это согласуется с ранее полученными экспериментальными данными о том, что материнский Hb может формировать паттерн в эмбрионе при отсутствии антериорных и терминальных систем, образуя постериорные картины экспрессии по длине всего эмбриона (Struhl et al., 1992). Таким образом, результаты моделирования подтверждают ранее продемонстрированную в экспериментах роль Hb как морфогена, действующего в постериорной области эмбриона, и позволяют понять механизм действия этого транскрипционного фактора.

Притяжение траекторий решений уравнений к инвариантному многообразию обеспечивает также механизм динамических сдвигов областей экспрес-

сии генов *gar*, который является ключевой особенностью формирования паттерна в задней области эмбриона (Jaeger et al., 2004a, b, Surkova et al., 2008). Этот механизм можно проиллюстрировать с помощью ядра в положении 59% ДЭ, которое задняя граница *Kr* и передняя граница *Kni* пересекают, когда сдвигаются к антериорному концу эмбриона в ходе цикла 14А. На рис. 5и, к показана временная динамика концентраций *Kr* и *Kni* в этой А–П позиции, обозначенной вертикальной пунктирной линией. На проекции фазового портрета этого ядра (рис. 5з) видно, что его траектория начинается на оси *Hb* и притягивается к многообразию *U2+*, достигая перед гастрულიей состояния *Kni-ON* (с высокой концентрацией *Kni*). При этом траектория проходит через следующие промежуточные состояния: вначале воз-растает концентрация *Kr*. Затем происходит постепенное увеличение концентрации *Kni*, сопровождающееся уменьшением концентрации *Kr*. Отметим, что траектория решений уравнений в этом ядре является результатом асимметричной репрессии между генами *kni* и *Kr*. Механизмы, обеспечивающие сдвиги областей экспрессии в ядрах, расположенных в районе задней границы области экспрессии *kni* и передней границы постериорной области экспрессии *gt*, аналогичны показанным на рис. 5з–к.

Клеточные деления как механизм выбора стационарных состояний в развивающейся биологической системе

Описанные выше результаты показывают, какую фундаментальную роль в биологических исследованиях играют такие абстрактные математические понятия, как аттракторы и их области притяжения. Точечные аттракторы и другие притягивающие инвариантные многообразия, подобные изображенным на рис. 5, служат организующим элементом для фазового портрета системы, задающим его основные геометрические особенности. В этих терминах канализация начальной вариабельности состояний развивающейся системы естественным образом представляется в виде траекторий, сходящихся к одному и тому же аттрактору с различных начальных условий. Максимальное количество возможных аттракторов является важным свойством такой системы. Если система является многоклеточным организмом, то ее состояние будет определяться состоянием каждой из ее клеток, и, таким образом, пространство состояний может быть очень велико. Однако, явление канализации предполагает, что существуют механизмы, контролирующие количество возможных стационарных состояний, достижимых биологической системой. Для объяснения этого явления необходимо учитывать влияние на динамику конкретных биологических процессов, таких как деления клеток.

В работе Gursky et al., 2006 на примере модели вида (1) (см. раздел “Математическое моделирование”) показано, что деление ядер играет динамическую роль в развитии эмбриона дрозофилы, которая состоит в редукции общего числа аттракторов, доступных для динамики генных продуктов во всех ядрах. Этот эффект является математическим следствием того, что размерность пространства состояний в модели меняется вместе с изменением числа ядер в эмбрионе (Gursky et al., 2006). Подобный эффект редукции числа достижимых аттракторов не зависит от конкретной реализации модели и, очевидно, будет иметь место в любой биологической системе, в которой происходит образование паттернов на фоне клеточного деления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре суммированы результаты изучения механизмов канализации вариабельности экспрессии генов сегментации, опубликованные в работах Surkova et al., 2008; Manu et al., 2009a, b.

Эти исследования показали, что канализация вариабельности в системе генов *gar* происходит в результате взаимной регуляции этих генов. Поскольку взаимная регуляция генов является имманентным свойством системы генов *gar*, полученные результаты доказывают, что канализация вариабельности также внутренне присуща этой системе.

Важно, что выполненные исследования продемонстрировали недостаточность градиента *Vcd* для формирования точно позиционируемых границ областей экспрессии генов *gar*, а также необоснованность двух других классов теоретических моделей, предложенных для объяснения точного позиционирования границы экспрессии гена *hb*. В этих исследованиях были высказаны гипотезы о том, что причиной буферизации вариабельности *hb* может быть активный транспорт (Aegerter-Wilmsen et al. 2005), или некий дополнительный градиент, направленный от заднего конца эмбриона к переднему (Howard et al., 2005; McNHale et al., 2006; Houchmandzadeh et al., 2005). Отметим также, что в большинстве этих работ рассматривалась только граница *hb*, в то время как модель, предложенная в работе Manu et al., 2009a правильно воспроизводит уменьшение вариабельности градиента морфогена *Vcd* на уровне экспрессии не только *hb*, но и других генов *gar*.

Многие, подчас озадачивающие результаты, полученные в исследованиях вариабельности положения границ генов-мишеней *Vcd*, могут быть объяснены путем сопоставления результатов, полученных в рассмотренных в данном обзоре работах с данными о градиенте *Vcd in vivo* (Gregor et al., 2007b). Более наглядной характеристикой пространственной вариабельности, чем стандартное отклонение позиций пороговых концентраций белка, является непо-

средственно размах этих позиций вдоль оси А–П (рис. 2д, е). Размахи позиций *Vcd in vivo* и границы экспрессии *hb* у фиксированных эмбрионов составляют 10 и 5% длины эмбриона соответственно. Это очень важное наблюдение, поскольку очень многие экспериментальные воздействия могут увеличить размах позиций границы *hb* в два раза, делая его равным размаху позиций *Vcd*.

Прежде всего, полученные в работе Manu et al., 2009а результаты об удвоении размаха позиций границы экспрессии *hb* у двойных мутантов *Kr;Kni* можно объяснить тем, что в этом случае *Vcd* является единственным регулятором *hb*, поскольку из-за мутаций действие других регуляторов, в норме уменьшающих вариабельность, отсутствует. Во-вторых, 9% размах позиций границы экспрессии *hb* наблюдается у репортерных конструкторов с фрагментом промотора *hb*, который содержит только сайты присоединения *Vcd* (Bergmann et al., 2007). Наконец, делеция левого плеча третьей хромосомы удваивает вариабельность границы экспрессии *hb* (Houchmandzadeh et al., 2002). Мы считаем, что все эти экспериментальные воздействия выявляют немодифицированное действие *Vcd* на *hb* путем исключения других модуляторов.

Другие важные результаты могут быть объяснены, если принять во внимание, что максимальная точность градиента *Vcd* обратно пропорциональна корню квадратному из его концентрации (Berg, Purcell, 1977; Gregor et al., 2007а; Tostevin et al., 2007). Тогда граница экспрессии, находящаяся только под контролем *Vcd*, будет иметь тем меньшую вариабельность, чем ближе она находится к anteriорному концу эмбриона. Это объясняет, почему синтетический конструктор с экспрессией, запускаемой *Vcd*, имеет такую же вариабельность границы области экспрессии, как и *hb* (Crauk, Dostatni, 2005). Конструктор образует границу экспрессии в положении 28.6% длины эмбриона, где, по *in vivo* данным, концентрация *Vcd* в два раза выше по сравнению с таковой на границе области экспрессии *hb*. Если считать, что стандартное отклонение вариабельности этой границы у мутантов *Kr-kni*-, равное 2.2%, отражает немодифицированный ответ на действие *Vcd* в положении 47% длины эмбриона, то в положении 29% длины эмбриона стандартное отклонение должно быть 1.3%, что близко к наблюдаемому значению в 1.6% (Crauk, Dostatni, 2005). Меньшее возрастание вариабельности задней границы передней области экспрессии *gt* по сравнению с таковой у границы экспрессии *hb*, обнаруженное в нашей работе, также можно объяснить, если учесть, что граница *gt* формируется в положении 40% длины эмбриона. В этом положении по данным *in vivo* концентрация *Vcd* в 1.69 раз выше таковой на границе экспрессии *hb*. Таким образом, у мутантов *Kr-kni*- стандартное отклонение вариабельности границы *gt* должно быть 1.7%, что близко к наблюдаемому значению 1.9% длины эмбриона.

Открытым остается вопрос о причине правильного предсказания вариабельности границ областей экспрессии генов *gap* в модели Manu et al., 2009а, несмотря на завышенность вариабельности градиента *Vcd* в данных по экспрессии генов у фиксированных эмбрионов (Surkova et al., 2008). По всей видимости, высокая степень канализации, присущая как этой модели, так и самой системе генов *gap*, делает теоретическую модель довольно нечувствительной к начальной вариации морфогена. Данные по вариабельности градиента *Vcd in vivo* получены у изогенной линии мух и в строго контролируемых температурных условиях, в то время как естественные популяции характеризуются генотипической изменчивостью и развиваются в присутствии температурных флуктуаций. Эти факторы изменяют форму градиента *Vcd*, но не влияют на положение границ областей экспрессии генов-мишеней (Houchmandzadeh et al., 2002; Lucchetta et al., 2005). Весьма вероятно, что у индивидуальных градиентов *Vcd*, использованных в работе Manu et al., 2009а, уровень вариабельности приближается к уровню, свойственному естественным популяциям.

Высокая вариабельность генов *gap* на ранних стадиях развития может быть обусловлена событиями, имеющими стохастическую природу. Так например, известно, что выбор ядер, в которых начинает активироваться транскрипция генов *gap*, является чисто случайным (Jaeger et al., 2007; Pritchard, Schubiger, 1996). Более того, градиенты белков *Hb* и *Cad* образуются в результате репрессии на уровне трансляции соответственно под действием *Nanos* и *Vcd*, количество молекул которых в эмбрионе может быть подвержено флуктуациям в силу их малого числа (Gregor et al., 2007а, b). Буферизация фенотипической вариации, обусловленной флуктуацией малого числа молекул, хотя и не принималась во внимание Уолдингтоном, может быть важной разновидностью канализации в биологических системах.

Остается до конца не ясным, насколько генетическая вариабельность вносит вклад в наблюдаемую раннюю вариабельность генов *gap*, поскольку линия мушек Oregon R, использованная в данной работе, является инбредной и условно изогенной. Тем не менее, скрещивания *Hsp83* гетерозигот и мух Oregon R (Rutherford, Lindquist, 1998) продемонстрировали наличие у последних значительной скрытой генетической вариабельности, которая может быть переведена “в открытую форму” и закреплена как новый фенотипический признак в результате последовательных актов селекции. Поэтому, наблюдаемая в работе Surkova et al., 2008 фенотипическая вариабельность ранних картин экспрессии генов *gap* может быть частично обусловлена генотипической вариабельностью материнских или зиготических генов сегментации.

Важно подчеркнуть, что независимо от того, какую природу имеет ранняя вариабельность картин

экспрессии генов *gap*, дискретный и буферизованный ответ является отличительным признаком развивающейся системы, способной к канализации. В отсутствие молекулярных данных Уоддингтон пытался объяснить эти особенности ответа системы, предположив существование определенных, предпочтительных, стабильных траекторий развития, которые он называл креодами (Waddington, 1942; Rendel, 1959). Как показано в работе Manu et al., 2009b, траектории развития в системе генов *gap* стабильны из-за притяжения к аттракторам (в передней области эмбриона) или к инвариантному многообразию (в задней области). Ответ системы на начальную вариабельность является дискретным в силу того, что к моменту гастрюляции каждая траектория развития может приблизиться только к одному аттрактору или состоянию инвариантного многообразия. Причиной буферизованного ответа системы является стабильность траекторий развития. Даже если предположить, что ген может быть только в двух состояниях (включен — выключен), реальное число аттракторов в системе генов *gap* (равное двум или трем) гораздо меньше максимально возможного (2^4), из чего следует, что в результате естественного отбора произошел выбор вполне определенных траекторий развития из большого числа возможных. Таким образом, на основании результатов моделирования, мы можем заключить, что траектории развития в системе генов *gap* являются креодами.

Доказательство корректности рассмотрения траекторий развития в системе генов *gap* как креодов, подтверждает правильность идей Уоддингтона (Waddington, 1942). Более того, анализ, выполненный в работах Surkova et al., 2008; Manu et al., 2009a, b, выявил новый тип стабильности, возникающий как результат притяжения к инвариантному многообразию и отличающийся от ранее описанных механизмов, таких как точечные аттракторы и предельные циклы, а также необходимый для объяснения важных биологических особенностей формирования паттерна в задней области эмбриона.

В настоящее время преобладающей точкой зрения на механизм формирования паттерна является представление о том, что границы областей экспрессии генов-мишеней формируются в позициях фиксированных пороговых концентраций градиента *Vcd* (Gregor et al., 2007a; Driever, Nusslein-Volhard, 1988). Однако, в рамках такого представления невозможно объяснить как фильтрацию позиционной вариабельности на уровне экспрессии генов-мишеней (Houchmandzadeh et al., 2002; Surkova et al., 2008; Manu et al., 2009a), так и динамические сдвиги областей экспрессии генов *gap* в задней части эмбриона (Jaeger et al., 2004a, b). Идея о спецификации с помощью фиксированных порогов *Vcd* также не может объяснить точное позиционирование границ областей экспрессии генов *gap* в постериорном районе эмбриона, так как небольшое число молекул *Vcd* в ядрах этого района означает наличие большого

уровня молекулярного шума (Gregor et al., 2007a, Tostevin et al., 2007). Результаты динамического анализа, выполненного в работе Manu et al., 2009b, указывают на то, что в области эмбриона, расположенной постериорнее пика центральной области экспрессии *Kr*, *Vcd* перестает участвовать в спецификации положения областей экспрессии генов-мишеней, поскольку в этой области геометрия фазового пространства качественно не зависит от положения вдоль оси А–П. Напротив, как показывают результаты динамического анализа, в этой области роль морфогена выполняет материнский *Hb*, что устраняет проблему высокого уровня молекулярного шума *Vcd*. О роли материнского *Hb* как морфогена в постериорной области эмбриона было известно давно (Hulskamp et al., 1990; Struhl et al., 1992), однако механизм участия *Hb* в формировании паттерна оставался не ясным. Как и в случае с *Vcd*, теория, основанная на пороговых концентрациях, в приложении к *Hb* (Yu and Small, 2008) неполна и требует постулирования возможности модификации уровней пороговых концентраций под действием генов-мишеней. Динамический анализ позволяет понять, что в основе формирования сложной пространственно-временной динамики системы генов *gap* лежат три простых механизма: изменения аттракторами своего положения в фазовом пространстве системы, а также выбор аттрактора или состояния на инвариантном многообразии в зависимости от начальных условий.

Особенно важно подчеркнуть, что многообразие U_-^2 является геометрическим выражением асимметричной репрессии между генами *gap*, в результате которой гены, области экспрессии которых расположены ближе к заднему концу эмбриона, репрессируют экспрессию генов, с перекрывающейся областью экспрессии, но расположенной дальше от заднего конца: *Kr* | *kn* | *gt*. То, какое состояние на инвариантном многообразии будет достигнуто траекторией перед гастрюляцией зависит от начальной концентрации *Hb*: при высоких концентрациях *Hb* реализуется состояние *Kr*-ON (с высокой концентрацией *Kr*), при промежуточных — *Kn*-ON, а при низких концентрациях — состояние *Gt*-ON. Другими словами, постериорный паттернинг осуществляется путем запуска в сети генов *gap* регуляции по типу обратной связи, специфика которой зависит от концентрации материнского *Hb* в ядре. Этот механизм также лежит в основе сдвигов областей экспрессии генов *gap*, поскольку траектории повторяют инвариантное многообразие после приближения к последнему.

ЛИТЕРАТУРА

Суркова С.Ю., Мясникова Е.М., Козлов К.Н. и др. Методы получения количественных данных из конфокальных изображений картин экспрессии генов *in situ* // Цитология. 2008. Т. 50. № 4. С. 352–369.

- Aegerter-Wilmsen T., Aegerter C.M., Bisseling T.* Model for the robust establishment of precise proportions in the early *Drosophila* embryo // *J. Theor. Biol.* 2005. V. 234. P. 13–19.
- Akam M.* The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo // *Development*. 1987. V. 101. P. 1–22.
- Ashyraliyev M., Siggens K., Janssens H. et al.* Gene circuit analysis of the terminal gap gene *huckebein* // *PLoS Comp. Biol.* 2009. V. 5. № 10. P. e1000548.
- Berg H.C., Purcell E.* Physics of chemoreception // *Biophys. J.* 1977. V. 20. P. 193–219.
- Bergmann S., Sandler O., Sberro H. et al.* Pre-steady-state decoding of the Bicoid morphogen gradient. *PLoS Biology*. 2007. V. 5. P. 232–242.
- Carroll S., Winslow G., Twombly V., Scott M.* Genes that control dorsoventral polarity affect gene expression along the anteroposterior axis of the *Drosophila* embryo // *Development*. 1987. V. 99. P. 327–332.
- Clyde D.E., Corado M.S., Wu X. et al.* A selforganizing system of repressor gradients establishes segmental complexity in *Drosophila* // *Nature*. 2003. V. 426. P. 849–853.
- Crauk O., Dostatni N.* Bicoid determines sharp and precise target gene expression in the *Drosophila* embryo // *Current Biology*. 2005. V. 15. P. 1888–1898.
- DeLotto R., DeLotto Y., Steward R. et al.* Nucleocytoplasmic shuttling mediates the dynamic maintenance of nuclear Dorsal levels during *Drosophila* embryogenesis // *Development*. 2007. V. 134. №. 23. P. 4233–4241.
- Driever W., Nusslein-Volhard C.* The Bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner // *Cell*. 1988. V. 54. P. 95–104.
- Gaul U., Jäckle H.* Pole region-dependent repression of the *Drosophila* gap gene *Krüppel* by maternal gene products // *Cell*. 1987. V. 51. P. 549–555.
- Gregor T., Tank D.W., Wieschaus E.F. et al.* Probing the limits to positional information // *Cell*. 2007a. V. 130. P. 153–164.
- Gregor T., Wieschaus E.F., McGregor A.P. et al.* (2007b) Stability and nuclear dynamics of the bicoid morphogen gradient // *Cell*. 2007b. V. 130. P. 141–152.
- Gursky V.V., Jaeger J., Kozlov K.N. et al.* Pattern formation and nuclear divisions are uncoupled in *Drosophila* segmentation: Comparison of spatially discrete and continuous models // *Physica D*. 2004. V. 197. P. 286–302.
- Gursky V. V., Kozlov K.N., Samsonov A.M. et al.* Cell divisions as a mechanism for selection in stable steady states of multi-stationary gene circuits // *Physica D*. 2006. V. 218. № 1. P. 70–76.
- Hardway H., Mukhopadhyay B., Burke T. et al.* Modeling the precision and robustness of Hunchback border during *Drosophila* embryonic development // *J. Theor. Biol.* 2008. V. 254. P. 390–399.
- He F., Wen Y., Deng J. et al.* Probing intrinsic properties of a robust morphogen gradient in *Drosophila* // *Dev. Cell*. 2008. V. 15. P. 558–567.
- Houchmandzadeh B., Wieschaus E., Leibler S.* Establishment of developmental precision and proportions in the early *Drosophila* embryo // *Nature*. 2002. V. 415. P. 798–780.
- Houchmandzadeh B., Wieschaus E., Leibler S.* Precise domain specification in the developing *Drosophila* embryo // *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter*. 2005. V. 72. № 6 Pt 1. P. 061920. *Howard M., ten Wolde P.R.* Finding the center reliably: Robust patterns of developmental gene expression // *Phys. Rev. Lett.* 2005. V. 95. P. 208 103.
- Hulskamp M., Pfeifle C., Tautz D.* A morphogenetic gradient of Hunchback protein organizes the expression of the gap genes *Krüppel* and *knirps* in the early *Drosophila* embryo // *Nature*. 1990. V. 346. P. 577–580.
- Jaeger J., Blagov M., Kosman D. et al.* Dynamical analysis of regulatory interactions in the gap gene system of *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2004a. V. 167. P. 1721–1737.
- Jaeger J., Surkova S., Blagov M. et al.* Dynamic control of positional information in the early *Drosophila* embryo // *Nature*. 2004b. V. 430. P. 368–371.
- Jaeger J., Sharp D.H., Reinitz J.* Known maternal gradients are not sufficient for the establishment of gap domains in *Drosophila melanogaster* // *Mech. Dev.* 2007. V. 124. P. 108–128.
- Kosman D., Small S., Reinitz J.* Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to *Drosophila* segmentation proteins // *Dev Genes Evol.* 1998. V. 208. P. 290–294.
- Janssens H., Kosman D., Vanario-Alonso C.E. et al.* A high-throughput method for quantifying gene expression data from early *Drosophila* embryos // *Dev Genes Evol.* 2005. V. 215. P. 374–381.
- Kozlov K.N., Myasnikova E., Samsonova A.A. et al.* GCPRg package for registration of the segmentation gene expression data in *Drosophila* // *Fly*. 2009. V. 3, № 2. P. 151–156.
- Kraut R., Levine M.* Spatial regulation of the gap gene *giant* during *Drosophila* development // *Development*. 1991. V. 111. P. 601–609.
- Lacalli T.C., Harrison L.G.* From gradients to segments: Models for pattern formation in early *Drosophila* embryogenesis // *Semin Dev Biol.* 1991. V. 2. P. 107–117.
- Lucchetta E.M., Lee J., Fu L. et al.* Dynamics of *Drosophila* embryonic patterning network perturbed in space and time using microfluidics // *Nature*. 2005. V. 434. P. 1134–1138.
- Manu, Surkova S., Spirov A.V. et al.* Canalization of gene expression in the *Drosophila* blastoderm by gap gene cross regulation. *PLoS Biology*. 2009a. V. 7. № 3. P. e1000049.
- Manu, Surkova S., Spirov A.V. et al.* Canalization of gene expression and domain shifts in the *Drosophila* blastoderm by dynamical attractors // *PLoS Comp. Biol.* 2009b. V. 5. № 3, P. e1000303.
- McHale P., Rappel W.J., Levine H.* Embryonic pattern scaling achieved by oppositely directed morphogen gradients // *Physical Biol.* 2006. V. 3. P. 107–120.
- Myasnikova E., Samsonova A., Kozlov K. et al.* Registration of the expression patterns of *Drosophila* segmentation genes by two independent methods // *Bioinformatics*. 2001. V. 17. P. 3–12.
- Pisarev A., Poustelnikova E., Samsonova M. et al.* FlyEx, the quantitative atlas on segmentation gene expression at

- cellular resolution // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. D560–D566.
- Pritchard D.K., Schubiger G.* Activation of transcription in *Drosophila* embryos is a gradual process mediated by the nucleocytoplasmic ratio // *Genes Dev.* 1996. V. 10. P. 1131–1142.
- Rendel J.M.* The canalization of the *scute* phenotype of *Drosophila* // *Evolution.* 1959. V. 13. P. 425–439.
- Rivera-Pomar R., Lu X., Perrimon N. et al.* Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm // *Nature.* 1995. V. 376. P. 253–256.
- Rutherford S.L., Lindquist S.* Hsp90 as a capacitor for morphological evolution // *Nature.* 1998. V. 396. P. 336–342.
- Saunders P.T.* The Organism as a dynamical system // *Thinking about Biology (SFI Studies in the Sciences of Complexity, Lecture Notes, F. Varela and W. Stein, eds.)*. Addison Wesley, Reading. 1993. V. 3. P. 41–63.
- Slack J.M.W.* Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? // *Nature Rev. Genet.* 2002. V. 3. P. 889–895
- Sollars V., Lu X., Xiao L. et al.* Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution // *Nature Genet.* 2002. V. 33. P. 70–74.
- Struhl G., Johnston P., Lawrence P.A.* Control of *Drosophila* body pattern by the Hunchback morphogen gradient // *Cell.* 1992. V. 69. P. 237–249.
- Surkova S., Kosman D., Kozlov K. et al.* Characterization of the *Drosophila* segment determination morphome // *Dev. Biol.* 2008. V. 313. P. 844–862.
- Thom R.* Topological models in biology // *Topology.* 1969. V. 8. P. 313–335.
- Thom R.* *Mathematical Models of Morphogenesis.* West Sussex, England: Ellis Horwood Limited, 1985.
- Tostevin F., ten Wolde P.R., Howard M.* Fundamental limits to position determination by concentration gradients // *PLoS Comp Biol.* 2007. V. 3. P. e78.
- Waddington C.H.* Genetic assimilation of an acquired character // *Evolution.* 1953. V. 7. P. 118–126.
- Waddington C.H.* Canalization of development and the inheritance of acquired characters // *Nature.* 1942. V. 150. P. 563–565.
- Waddington C.H.* *New Patterns in Genetics and Development.* New York: Columbia University Press, 1962.
- Waddington, C.H.* *Organisers and Genes.* Cambridge: Cambridge University Press, 1940.
- Waddington, C.H.* *The Strategy of the Genes.* London: George Allen and Unwin, 1957.
- Wolpert L.* Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation // *J Theor Biol.* 1969. V. 25. P. 1–47.
- Yu D., Small S.* Precise registration of gene expression boundaries by a repressive morphogen in *Drosophila* // *Current Biol.* 2008. V. 18. P. 868–876.
- Zeitlinger J., Zinzen R.P., Stark A. et al.* Whole genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo // *Genes Dev.* 2007. V. 21. P. 385–390.

Investigation into Stability Mechanisms of Embryonal Development in Fruit Fly *Drosophila*

S. Yu. Surkova^a, V. V. Gurskiy^b, John Reinitz^c, and M. G. Samsonova^a

^a Department of Computational Biology, Center for Advanced Studies, St. Petersburg State Polytechnical University, Polytekhnicheskaya ul. 29, St. Petersburg, 195251 Russia

e-mail: surkova@spbcas.ru

^b Physico-Technical Institute, Russian Academy of Sciences, Polytekhnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia

^c University of Chicago, Chicago, 60637-1546 IL, United States

Abstract—Living organisms well adapt themselves to changes in the environment and are robust to potential damage such as mutations. The epigenetic mechanism whereby the suppression of phenotypic variation is achieved has been dubbed canalization. This paper summarizes results of research that employed experimental and theoretical approaches to uncover the mechanisms of canalization of variation in expression of segmentation genes.

Keywords: developmental biology, mathematical modeling, canalization of development, fruit fly, segmentation