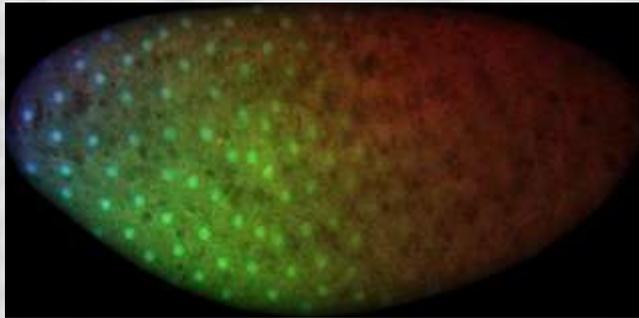
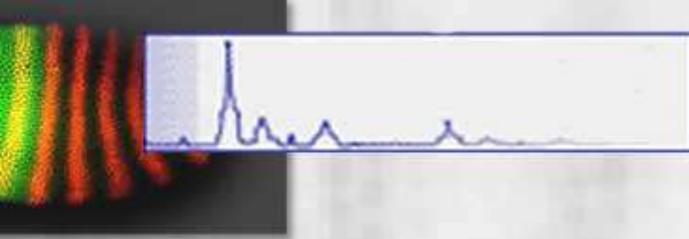


Динамика экспрессии генов сегментации у дрозофилы

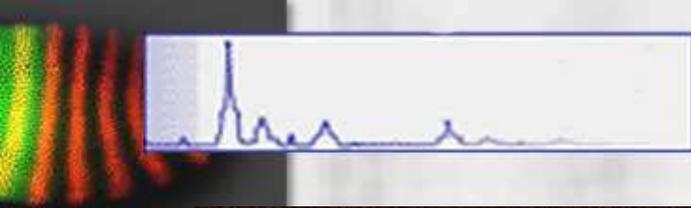
Мария Самсонова
Санкт-Петербургский
государственный
политехнический университет

Механизмы детерминации сегментов у *Drosophila melanogaster*



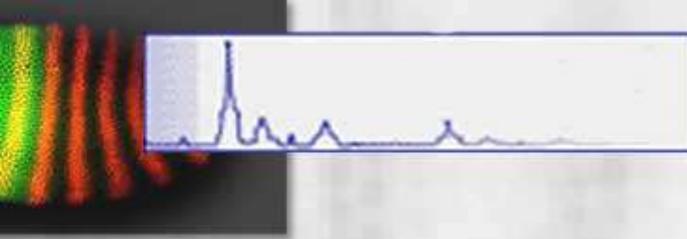
Детерминация сегментов происходит в морфогенетическом поле, представляющем ту часть эмбриона, из которой в будущем разовьется зародышевая полоска, и приводит к определению положения границ парасегментов.

Физическими компонентами морфогенетического поля сегментации являются гены сегментации и их продукты.

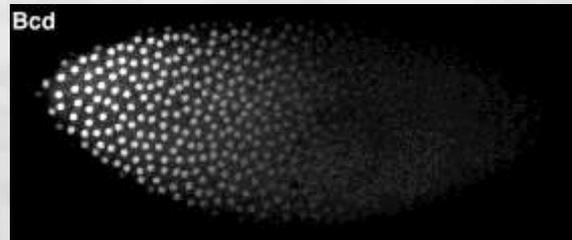


taken from Gilbert (2000). Developmental Biology, 6th Edition.

Гены сегментации

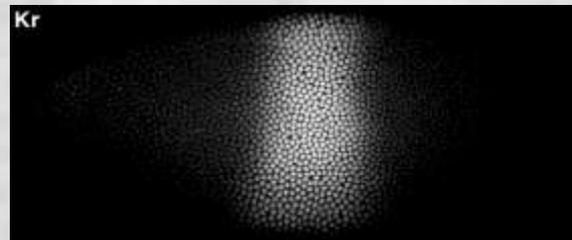


Материнские
координатные
гены



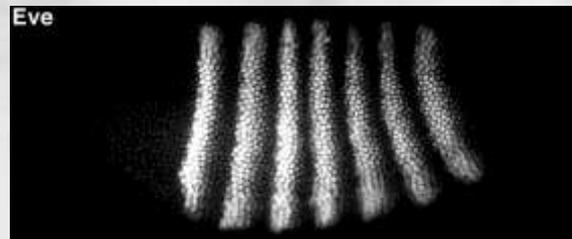
bicoid (bcd)
caudal (cad)
hunchback (hb)

Гены gap



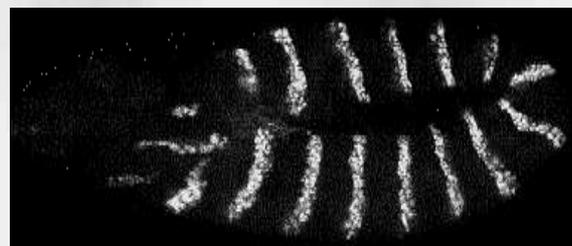
hunchback (hb)
Krüppel (Kr)
knirps (kni)
giant (gt)
tailless (tll)

Гены pair-rule

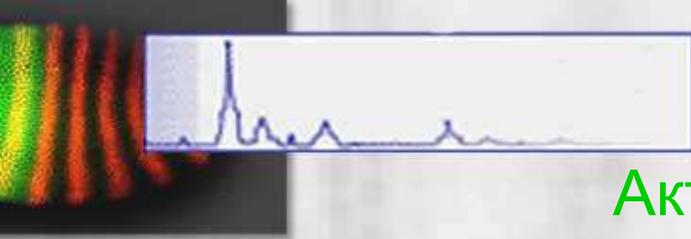


even-skipped (eve)
odd-skipped (odd)
hairy (h)
runt (run)
fushi-tarazu (ftz)
paired (prd)

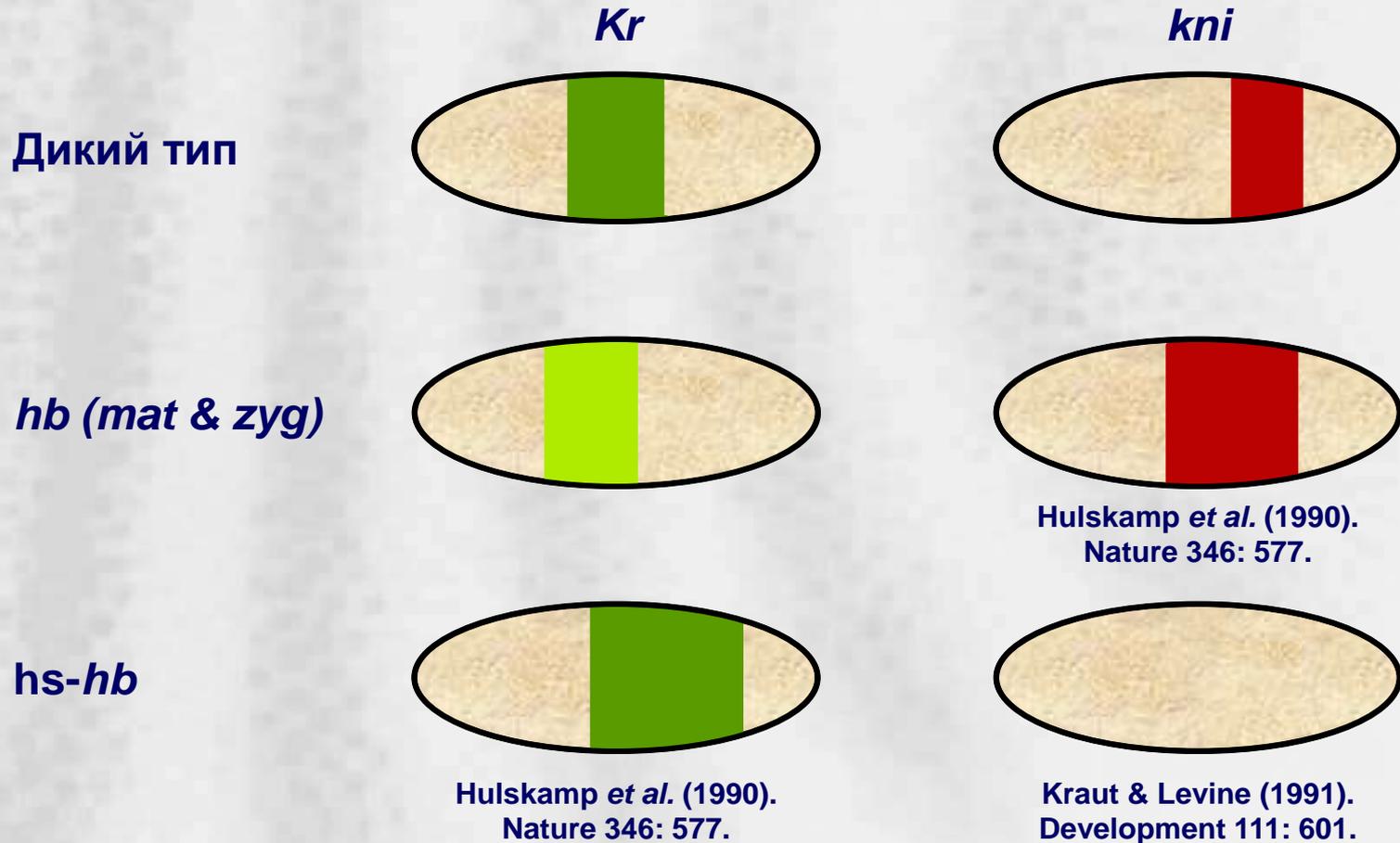
Гены segment
polarity



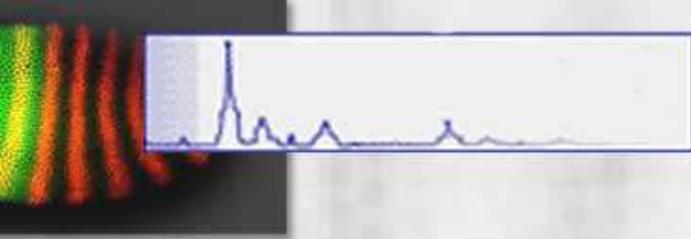
engrailed (en)
wingless (wg)
sloppy-paired (slp)



Актуальность работы: неполнота знаний о регуляторных взаимодействиях

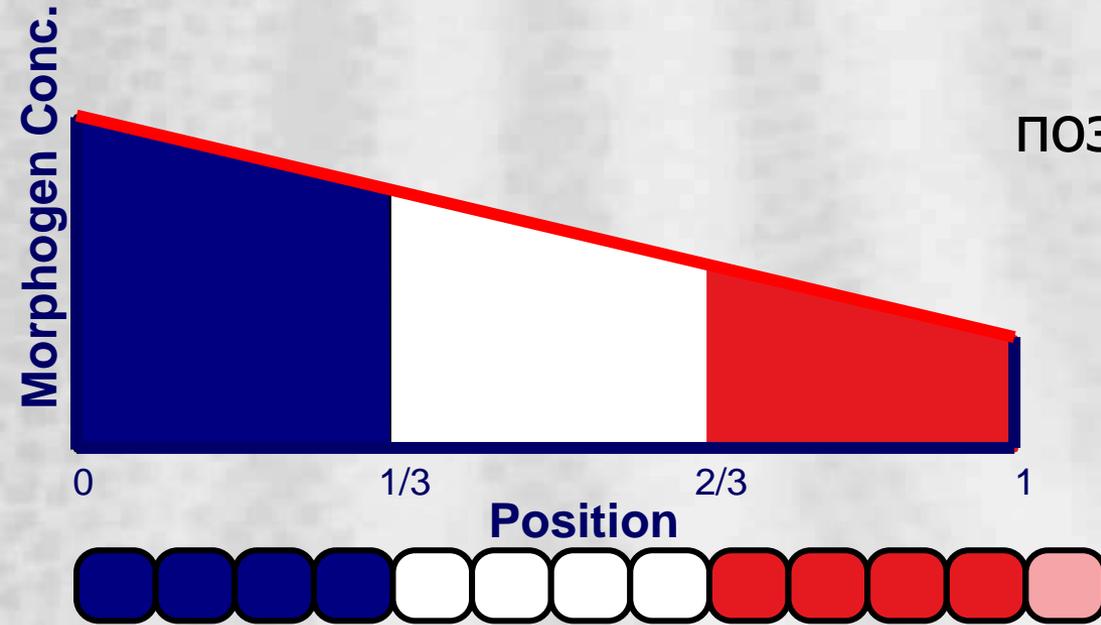


Являются ли регуляторные взаимодействия, выявленные на основании анализа фенотипов мутантов, непротиворечивыми, уникальными и полными?

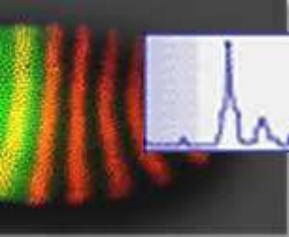


Актуальность работы: неполнота знаний о механизмах формирования препаттерна сегментации

Концепция позиционной информации Льюиса Волперта

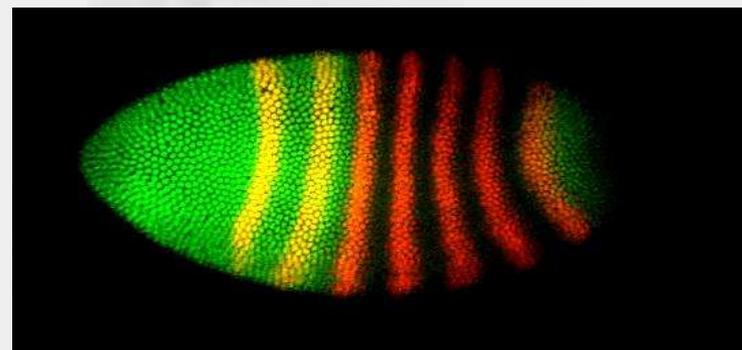


Достаточно ли материнские градиенты V_{cd} , H_b и C_{ad} для правильного позиционирования областей экспрессии генов g_{ar} и какова роль взаимной репрессии генов g_{ar} в этом процессе?



Актуальность работы: для выяснения механизмов развития в морфогенетическом поле сегментации необходимо количественно описать динамику составляющих его компонент

➤ **Использование иммунофлуоресцентного мечения биологических макромолекул и лазерной конфокальной микроскопии.**

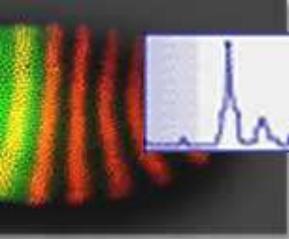


➤ **Точная количественная оценка компонент поля и исчерпывающий охват временной динамики.**

➤ **Эффективное использование количественных данных по экспрессии генов сегментации требует организации их в виде пространственно-временного атласа экспрессии генов.**

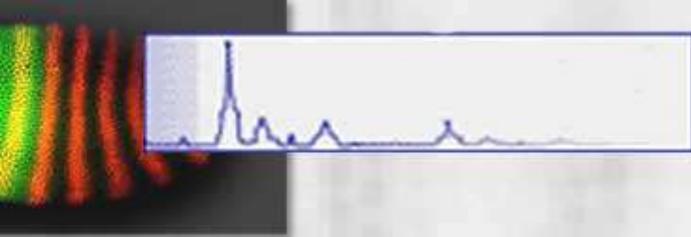
Цели диссертационной работы

- 1. Разработать новый конвейерный метод количественной оценки уровня экспрессии главных компонент морфогенетического поля сегментации у дрозофилы – генов сегментации – на основе изображений, полученных с помощью конфокальных микроскопов. Предложенный метод должен включать сегментацию изображений, удаление фонового сигнала, определение возраста эмбриона, пространственную регистрацию картин экспрессии и интеграцию данных.**
- 2. Получить исчерпывающий по полноте, точный в количественном отношении и систематический набор данных об экспрессии генов сегментации в каждом ядре каждого индивидуального эмбриона, а также эталонных, интегрированных данных об экспрессии каждого из 14 генов сегментации в каждой области эмбриона в разные моменты времени.**



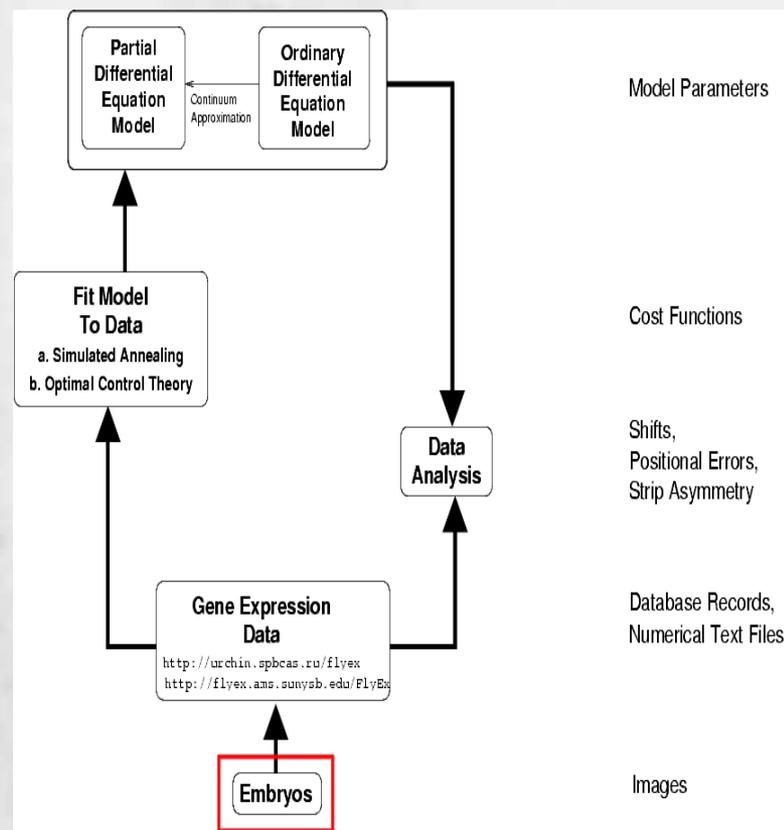
Цели диссертационной работы (продолжение)

3. Изучить динамику формирования областей экспрессии генов в морфогенетическом поле сегментации путем оценки положения каждой области в разные моменты времени.
4. Создать математическую модель механизмов регуляции экспрессии генов *gap* в цикле деления ядер 14А. Применить эту модель для *in silico* реконструкции сети генов *gap* и выявления механизмов, обеспечивающих сдвиги границ областей экспрессии этих генов.
5. Для облегчения работы теоретиков и биологов с данными создать пространственно-временной атлас экспрессии генов в виде реляционной базы данных, доступной в сети Интернет.



Использованный подход

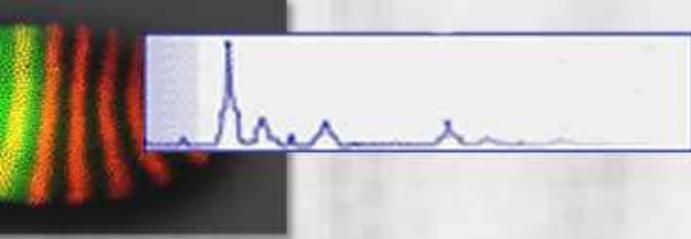
- Получение количественных данных по экспрессии генов сегментации.
- Анализ данных.
- Создание математической модели механизмов регуляции экспрессии генов гар в цикле 14A.
- Поиск параметров модели.
- Формулировка гипотез и проверка правильности модели.
- Создание пространственно-временного атласа экспрессии генов сегментации.

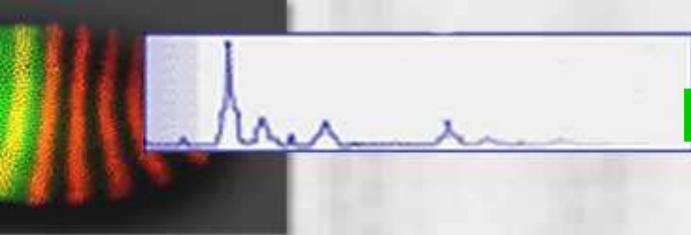


Научная новизна работы

- Разработан конвейерный метод получения количественных данных по экспрессии генов сегментации из конфокальных изображений картин экспрессии этих генов. Метод включает 5 процедур: сегментацию изображений, удаление фонового сигнала, определение возраста эмбриона, пространственную регистрацию картин экспрессии и интеграцию данных, которые можно применять последовательно и по отдельности;
- Получен новый, точный и систематический набор количественных данных об экспрессии генов сегментации в каждом ядре из 1580 индивидуальных эмбрионов, а также интегрированные данные об экспрессии каждого из 14 генов сегментации;
- Показано, что области экспрессии генов сегментации, локализованные в будущей зародышевой полоске, по мере своего формирования в цикле 14А смещаются к переднему полюсу эмбриона.

Научная новизна работы (продолжение)

- 
- Предложена математическая модель для предсказания механизмов регуляции экспрессии генов *gap* в цикле 14A, правильно воспроизводящая временную динамику экспрессии этих генов, степень перекрывания соседних областей экспрессии, а также воспроизводящая сдвиги границ областей экспрессии генов *gap* в ходе цикла 14A;
 - Исследованы механизмы сдвигов центральной области экспрессии *Kr*, задних областей экспрессии *kni*, *gt* и *hb* по направлению к переднему концу эмбриона;
 - Продемонстрирована динамическая природа позиционной информации;
 - Создан пространственно-временной атлас экспрессии генов сегментации в виде реляционной базы FlyEx, доступной по сети Интернет.

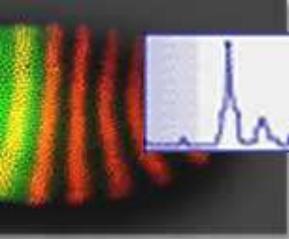


Практическое значение работы

- Впервые разработан и применен метод конвейерной обработки картин экспрессии генов сегментации с целью получения количественных данных по экспрессии генов.
- Предложен новый метод определения возраста эмбриона в цикле 14А, основанный на анализе картин экспрессии гена *eve*, и стандартизации этих картин экспрессии относительно возраста эмбриона, определенного в эксперименте.
- Количественные данные, полученные в данной работе, широко используются в теоретических исследованиях и для изучения механизмов сегментации
- Атлас FlyEx широко используется биологами и биоинформатиками. В 2006 году общее количество обращений к FlyEx превысило 260 000.
- В работе исследуется центральный вопрос эмбриологии – механизмы детерминации клеток и частей зародыша в морфогенетических полях.
- Выполненные исследования имеют важное значение для лучшего понимания медицинских аспектов развития.
- Совокупность разработанных методов и моделей формирует методологическую базу для реконструкции геной сети организма при отсутствии или ограниченном использовании мутагенеза.

Положения, выносимые на защиту

- Количественное описание пространственно-временной динамики компонент морфогенетического поля сегментации необходимо для понимания механизмов его функционирования.
- Сдвиги областей экспрессии генов сегментации важны для позиционирования областей экспрессии генов-мишеней и играют важную роль в формировании сегментного препаттерна.
- Материнские гены *bcd*, *cad* и гены *gap* *Kr*, *kni*, *gt*, *hb*, *tll* не только необходимы, но и достаточны для правильной экспрессии генов *gap* в будущей зародышевой полоске.

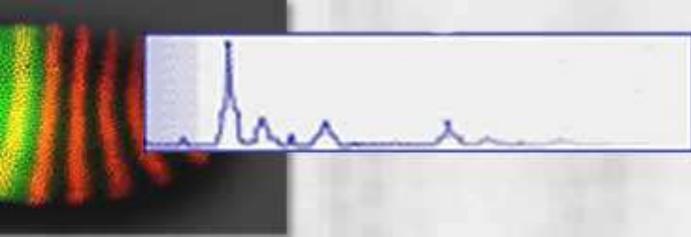


Положения, выносимые на защиту (продолжение)

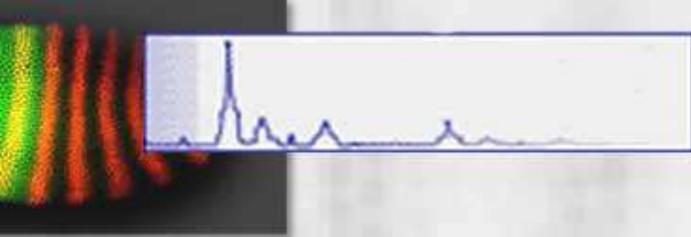
- Позиционная информация в бластодерме дрозофилы задается динамически меняющейся во времени комбинацией концентраций продуктов материнских и зиготических генов.

В каждый момент времени эта комбинация определяется не только материнскими морфогенами, но и сдвигами границ областей экспрессии генов сегментации из-за регуляторных взаимодействий.

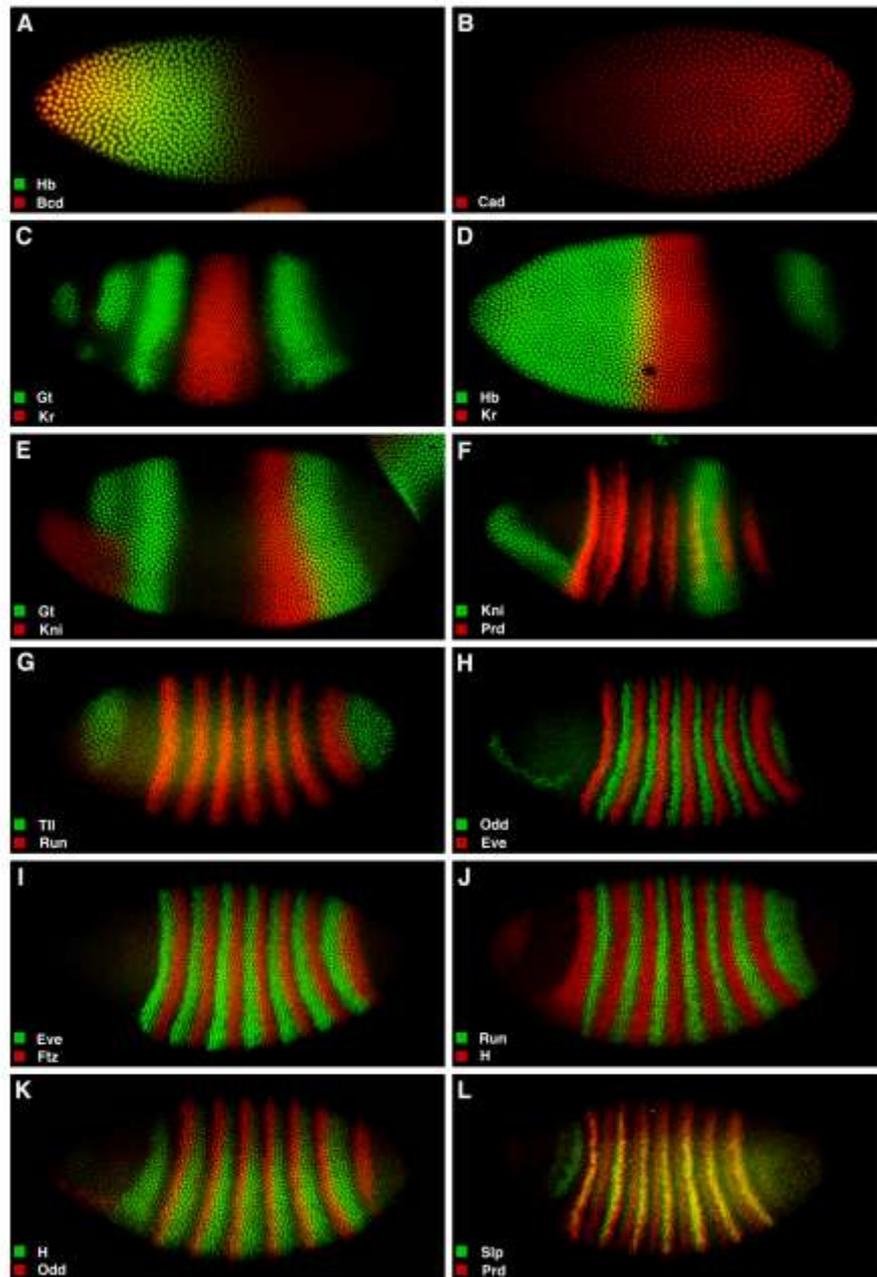
Это толкование подразумевает активный, а не пассивный способ интерпретации градиента морфогена и размывает границу между формированием и интерпретацией позиционной информации.

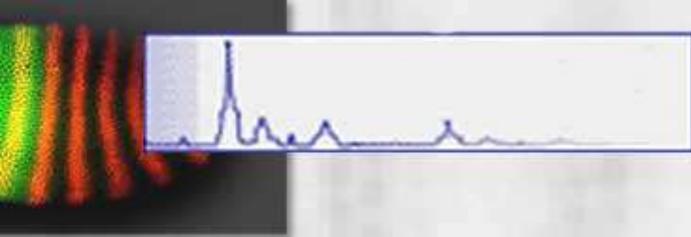


Метод получения количественных данных по экспрессии генов сегментации

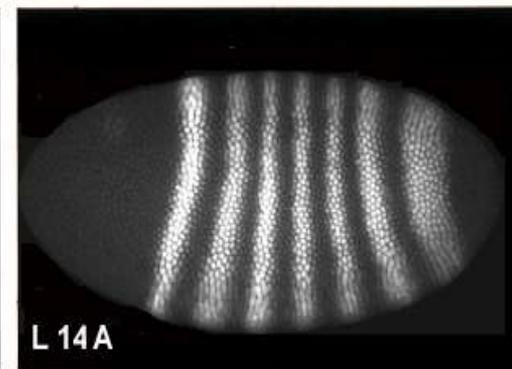
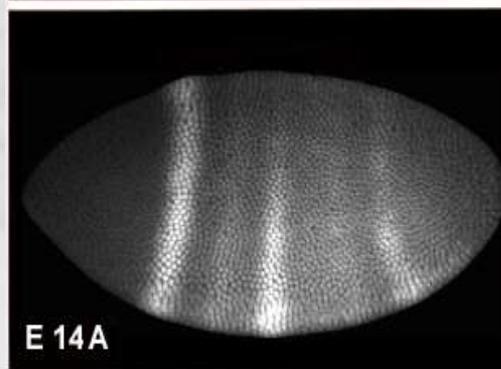
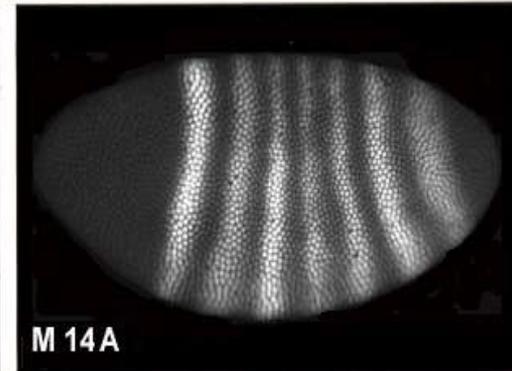
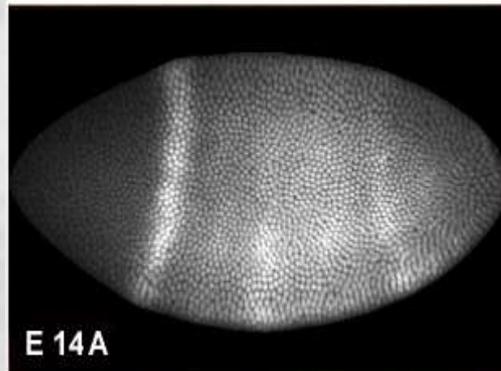
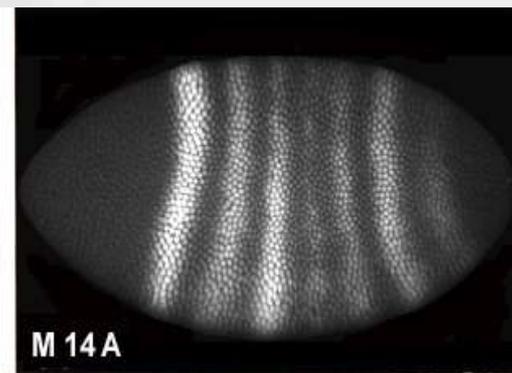
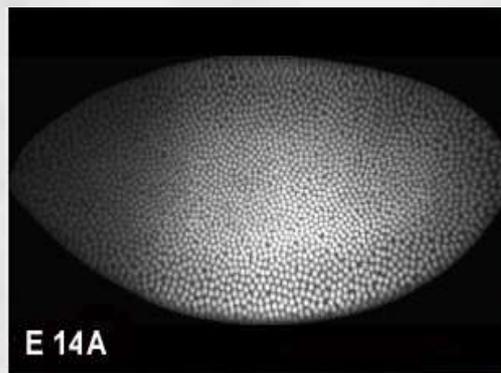


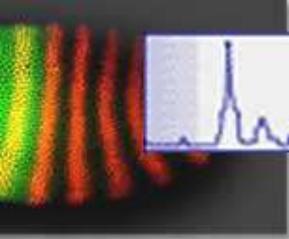
Каждый ген сегментации имеет характерную картину экспрессии





Динамика
экспрессии
гена *rip* в
цикле 14А





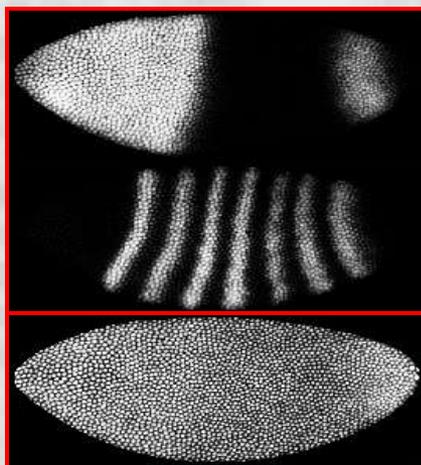
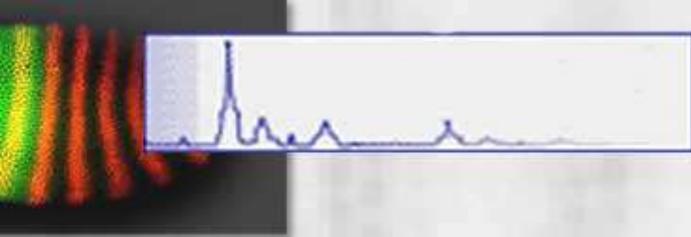
Набор данных

- 1580 эмбрионов мушек дрозофилы дикого типа (Oregon-R), окрашенных для выявления экспрессии материнских координатных генов *bicoid* (*bcd*) and *caudal* (*cad*), генов gap *Kruppel* (*Kr*), *knirps* (*kni*), *giant* (*gt*), *hunchback* (*hb*), *tailless* (*tll*) и генов pair-rule *even-skipped* (*eve*), *runt* (*run*), *fushi tarazu* (*ftz*), *odd-skipped* (*odd*), *hairy* (*h*), *sloppy-paired* (*slp*) и *paired* (*prd*).
- Каждый эмбрион окрашен для выявления экспрессии гена *eve* и двух других генов сегментации.
- База данных FlyEx <http://urchin.spbcas.ru/flyex>
<http://flyex.ams.sunysb.edu/flyex>

Конвейерный метод

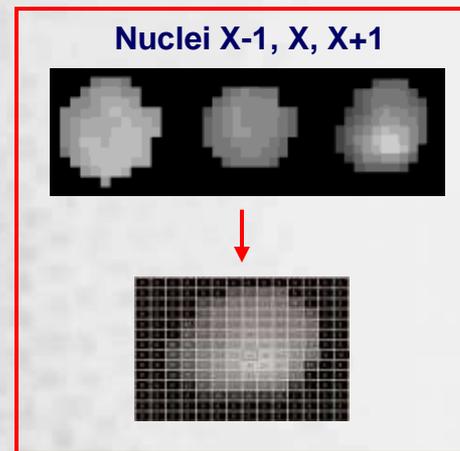
- Сегментация изображений
- Удаление фона
- Определение возраста эмбриона
- Регистрация данных
- Усреднение

Сегментация изображений

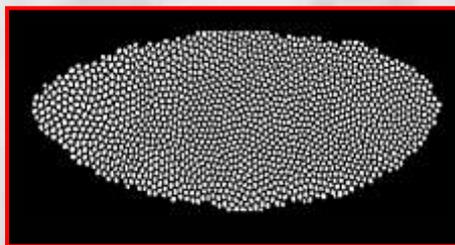


Blob extractor

Grey scale intensity values of pixels are grouped based on mask elements, each representing a single nucleus. Each group of values is then averaged to yield the fluorescence intensity values assigned to a specific nucleus.



Nuclear Mask



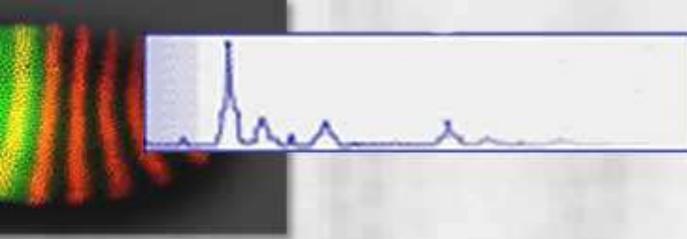
Shape Analysis

The average x and y location of all the pixels in a group (centroid) is calculated thus defining the position of the nucleus.

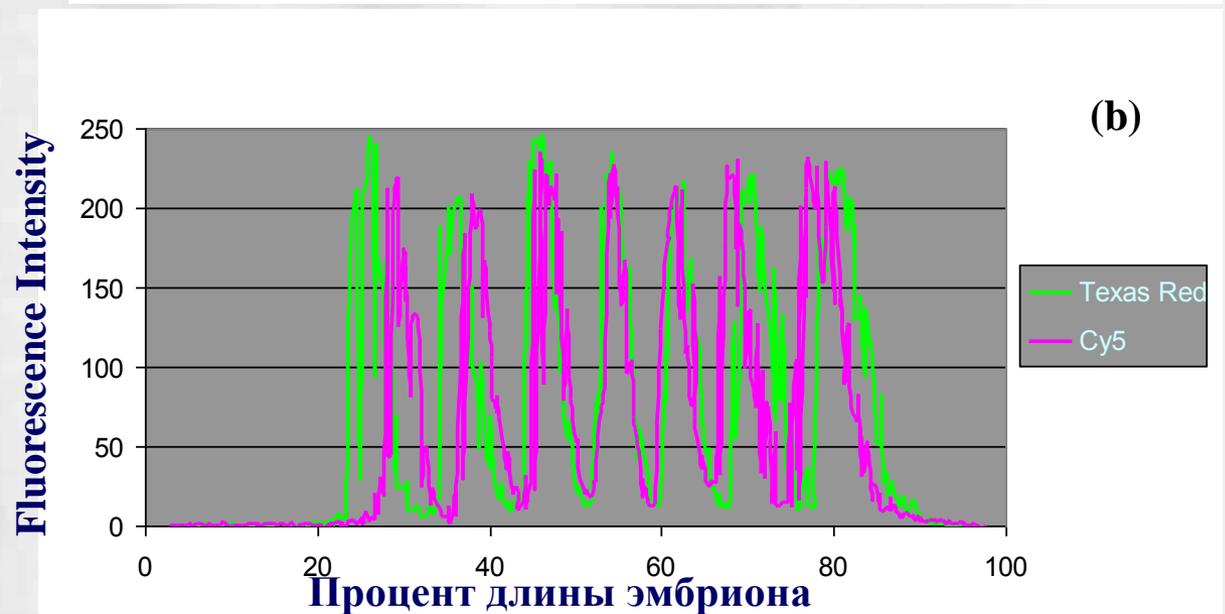
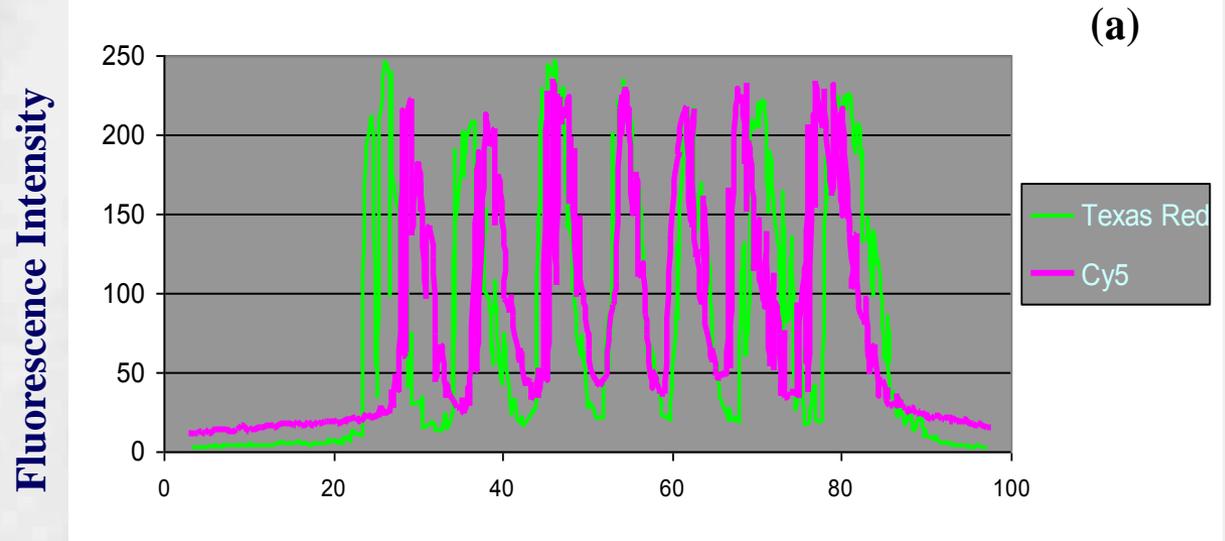
Nuclear Coordinates Fluorescence intensities

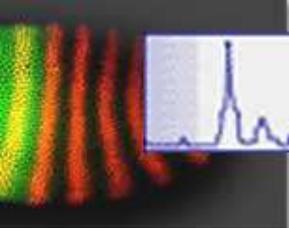
0	3.67346	41.5401	53.6951	25.93
1	4.05099	45.3917	53.8919	27.08
2	4.00196	37.3767	54.7	22.85
3	5.01298	39.8973	59.4688	26.56
4	5.07766	52.1475	58.8267	29.04
5	5.44521	43.4772	62.25	30.51
6	5.52642	47.3609	56.7215	28.94
7	5.78564	36.9171	56.8689	26.26
8	6.26299	50.786	64.3521	30.60
9	6.62735	40.1422	59.3086	32.01
10	6.69946	54.7947	60.0795	29.52

Удаление фона



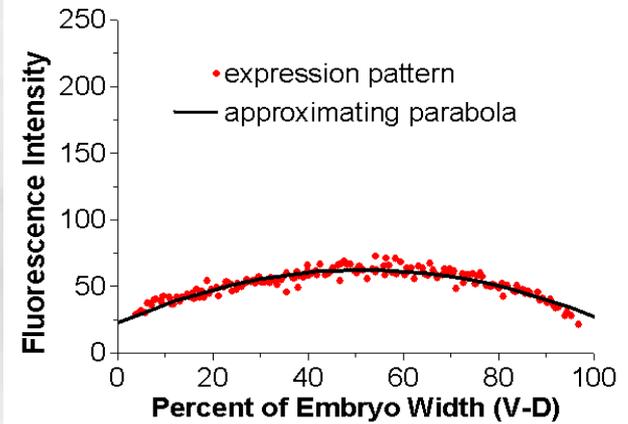
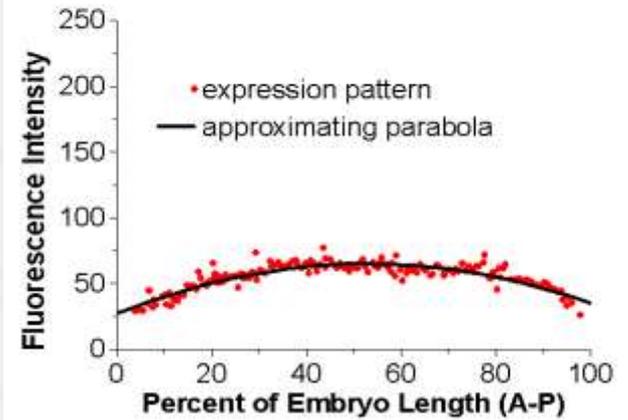
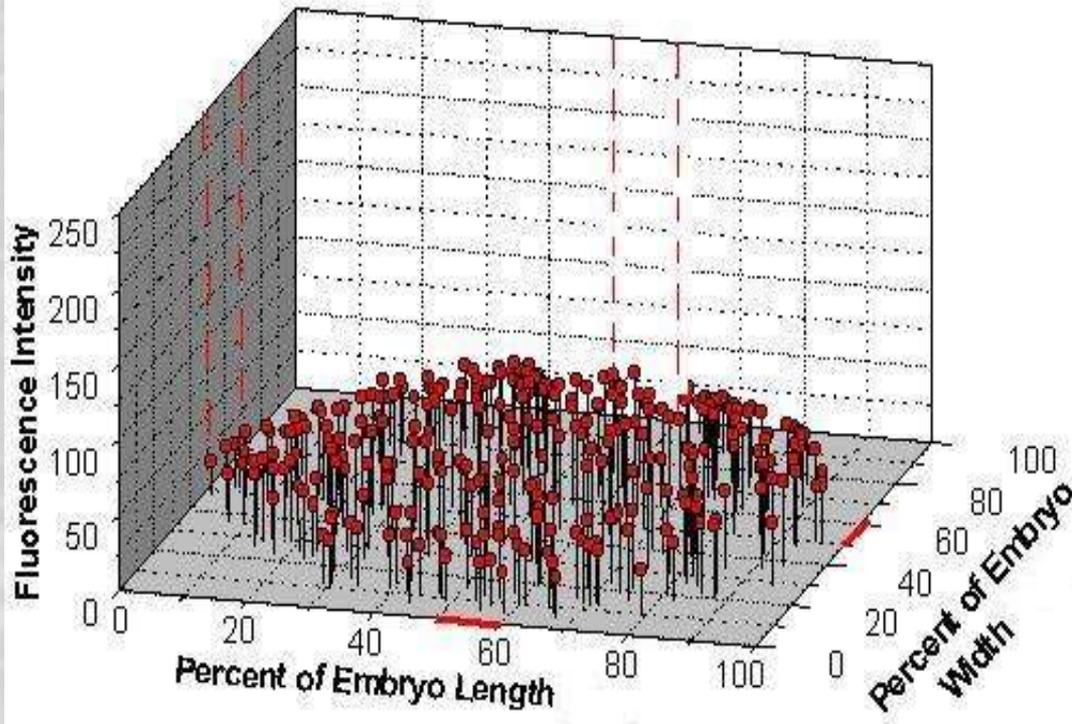
Две картины
экспрессии гена
eve до и после
удаления фона

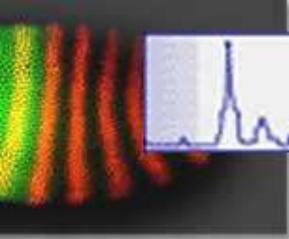




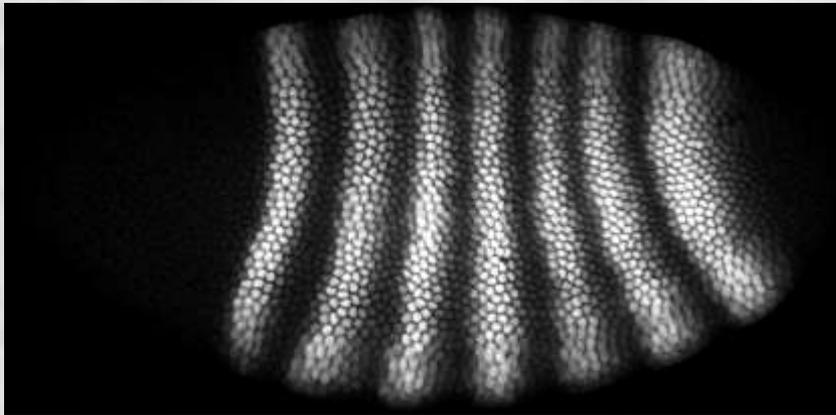
Картина экспрессии гена *eve* у нуль-мутанта

2D Expression pattern of *Eve* in Mutant Embryo

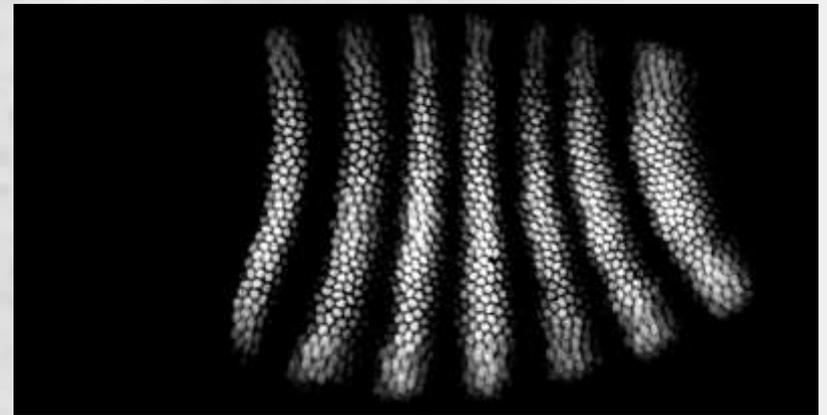




Картина экспрессии гена *eve* в индивидуальном эмбрионе



исходное изображение

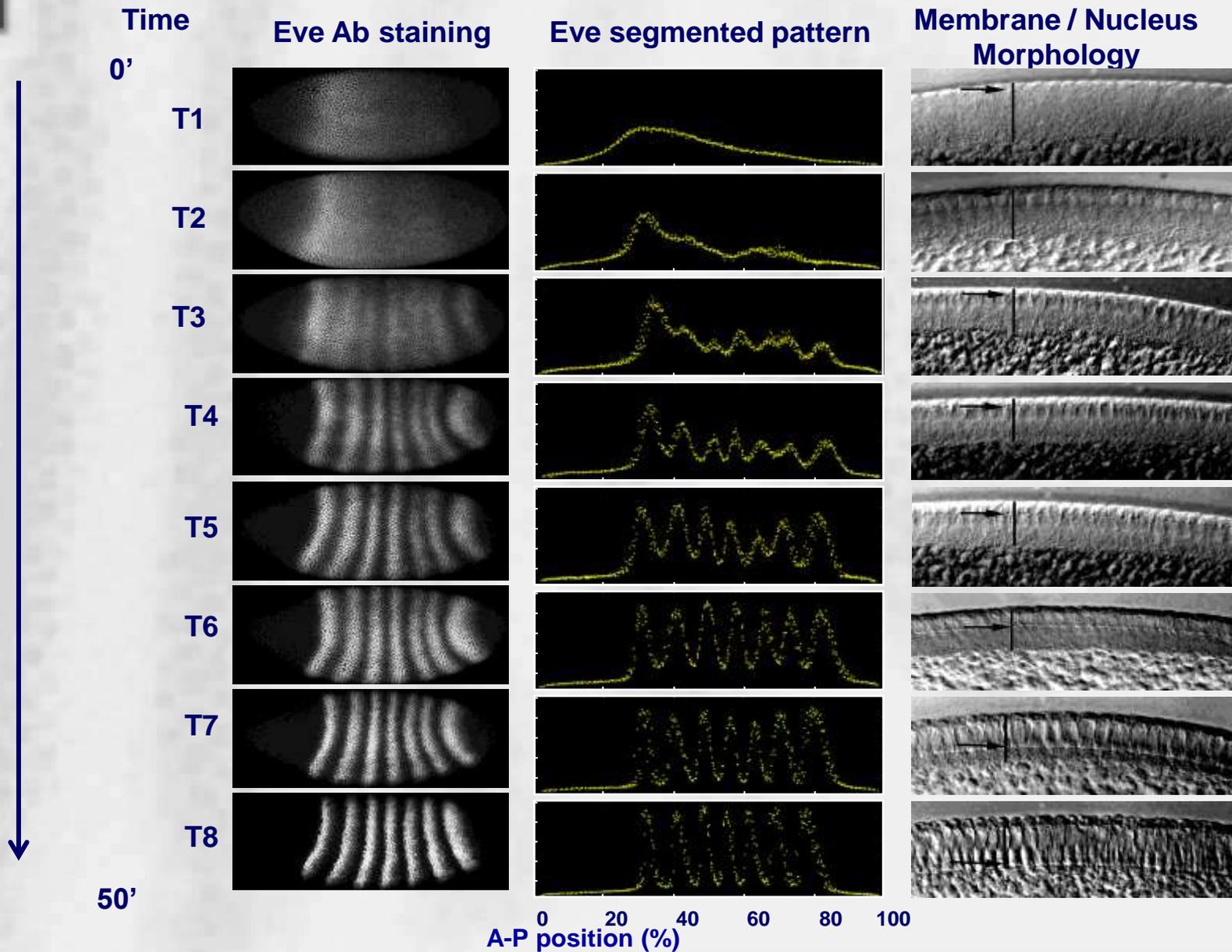
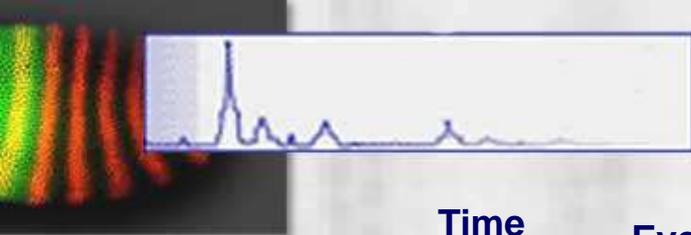


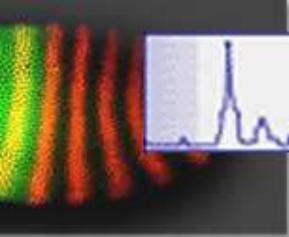
изображение без фона

$$S(x, y) = \alpha_{11}x^2 + \alpha_{22}y^2 + \alpha_{12}xy + \alpha_1x + \alpha_2y + \alpha_0$$

$$a_{norm,i} = \max\left(\frac{a_i - S(x_i, y_i)}{255 - S(x_i, y_i)} \cdot 255, 0\right), \quad i = 1 \dots N$$

Классификация эмбрионов по возрасту



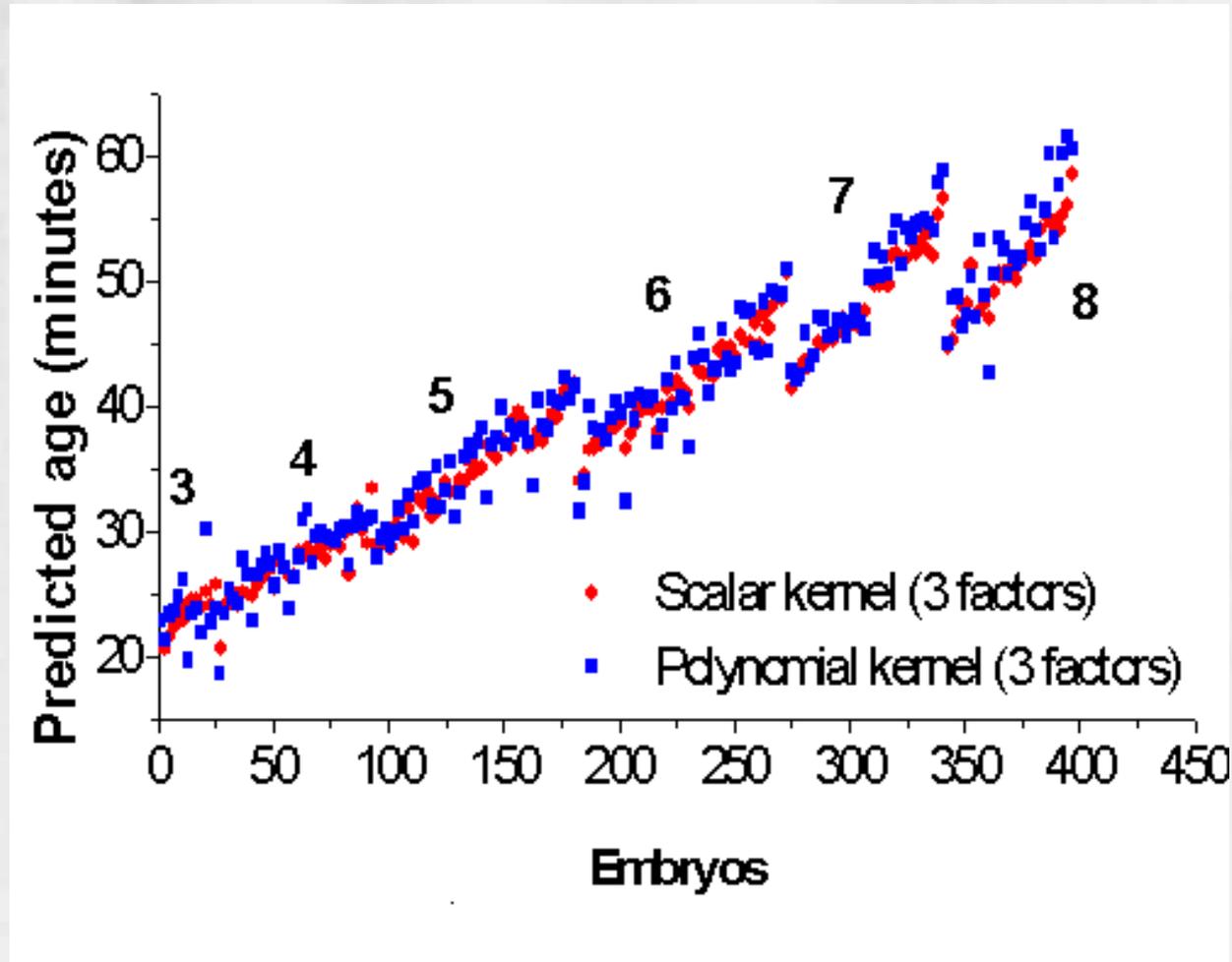
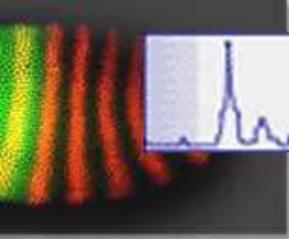


Метод предсказания возраста эмбриона

1. Формирование обучающей выборки эмбрионов, каждый элемент которой характеризуется набором характерных черт, описывающих картину экспрессии гена *even-skipped*, и экспериментально определенным возрастом (определенным исходя из степени инвагинации мембран).
2. Построение регрессионной функции по обучающей выборке с использованием метода SVM (Support Vector Machines).
3. Предсказание возраста для эмбрионов, не включенных в обучающую выборку и не имеющих экспериментальных данных о степени инвагинации мембраны.

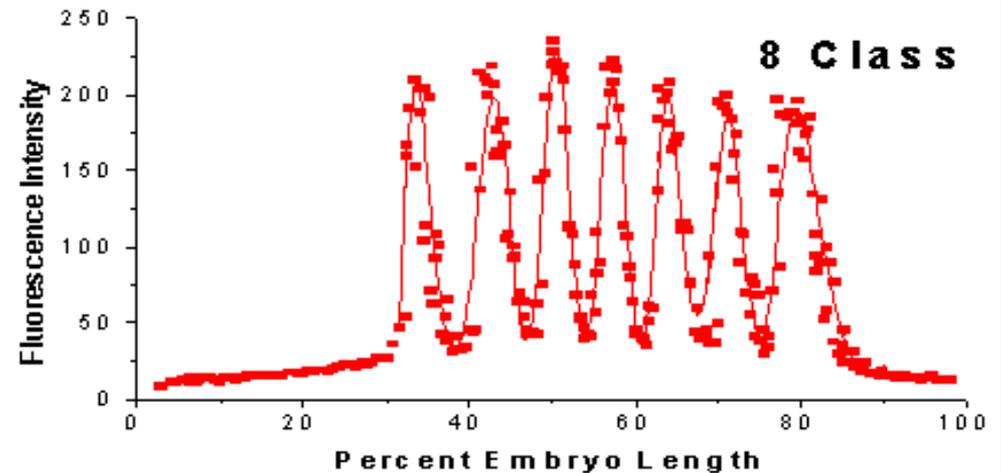
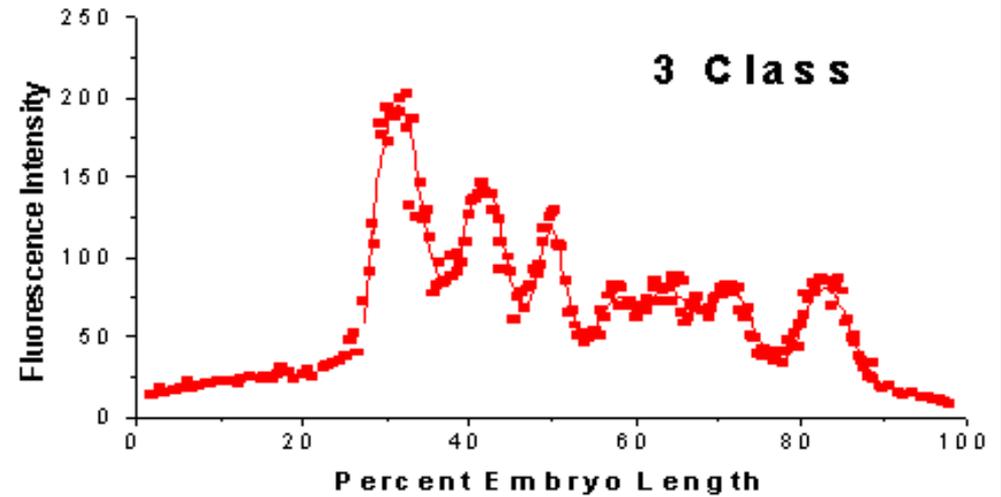
Динамика экспрессии генов сегментации в цикле 14A реконструирована с точностью до 2 минут развития.

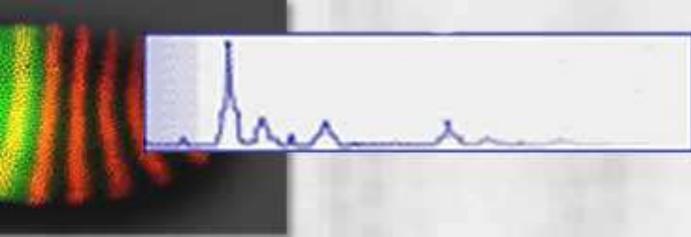
Результат предсказания возраста эмбрионов



Регистрация данных

Извлечение
характерных
признаков
одномерной
картины экспрессии
гена *eve*





Регистрация изображений производится путем масштабирования двумерных картин экспрессии вдоль оси абсцисс посредством аффинного преобразования

$$x' = x\rho + \Delta,$$

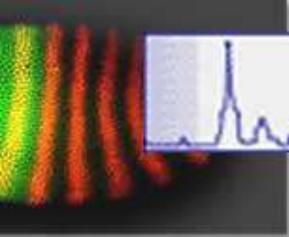
минимизирующего суммарное расстояние между x координатами всех экстремумов $\{X_{kj}\}_{j=1}^M$ у разных картин экспрессии и средним положением соответствующих экстремумов

$$\bar{X}_j = \frac{1}{R} \sum_{k=1}^R X_{kj}, j = 1, \dots, M$$

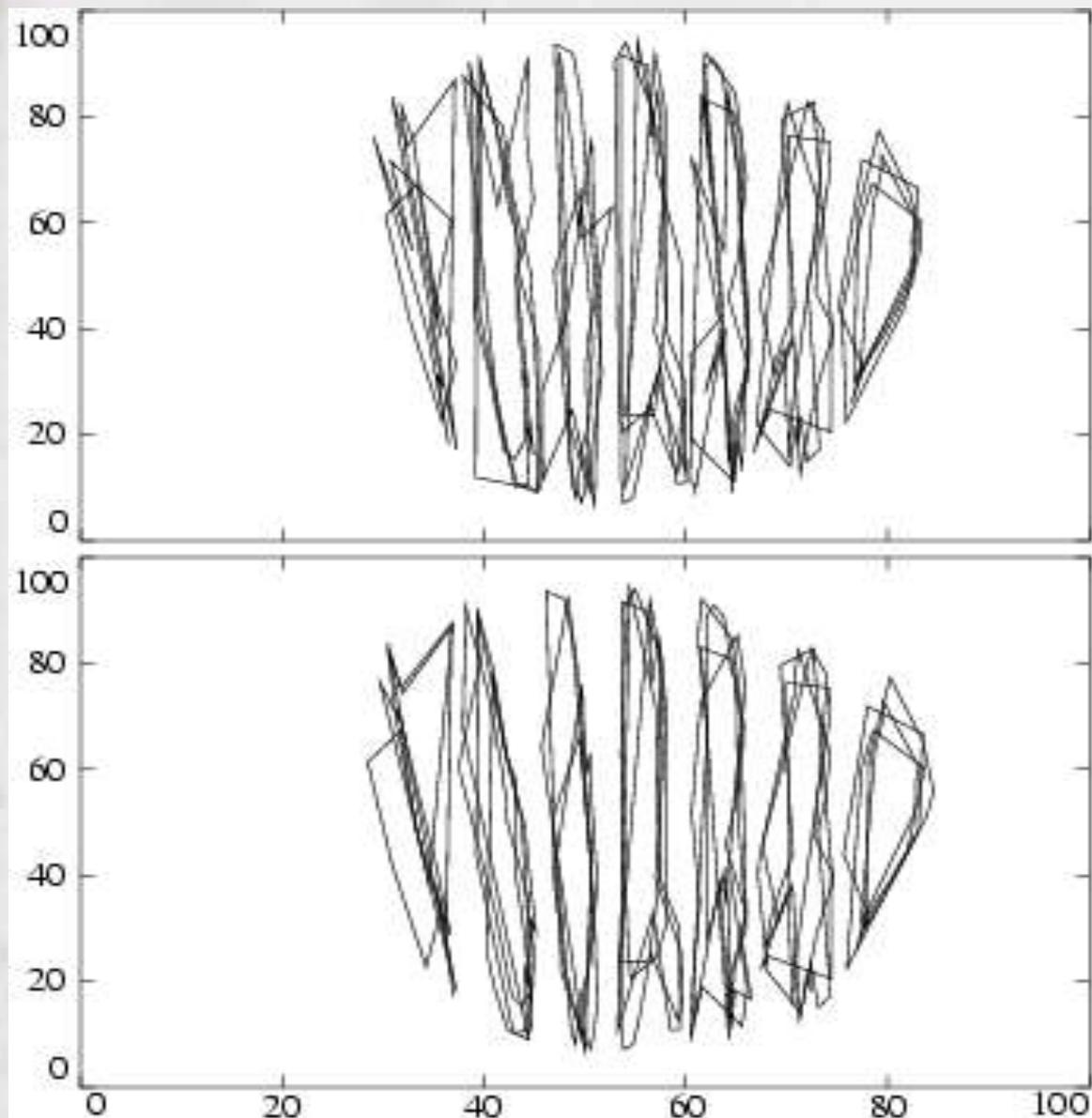
по всем R регистрируемым изображениям. Число экстремумов M варьировало в зависимости от класса. В качестве функционала качества использована метрика, основанная на вычислении эвклидова расстояния:

$$S_{2,k} = \sum_{j=1}^M \{X_{kj}\rho_k + \Delta_k - \bar{X}_k\}^2 \rightarrow \min, k = 1, \dots, R.$$

Аффинная регистрация



Результат
регистрации
четырёх
картин
экспрессии
гена *eve*

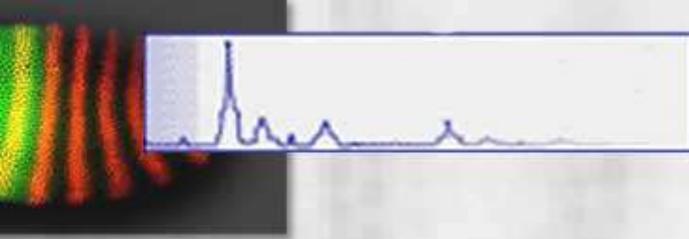


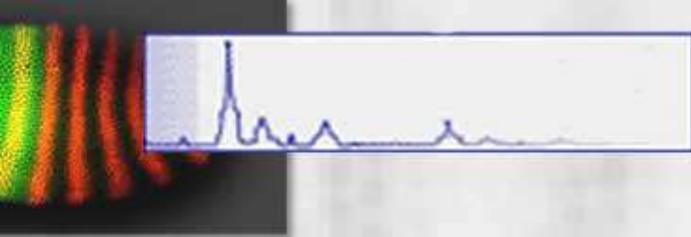
Усреднение данных

Конструирование интегрированных картин экспрессии осуществили, используя регистрируемые данные, и для эмбрионов каждого временного класса.

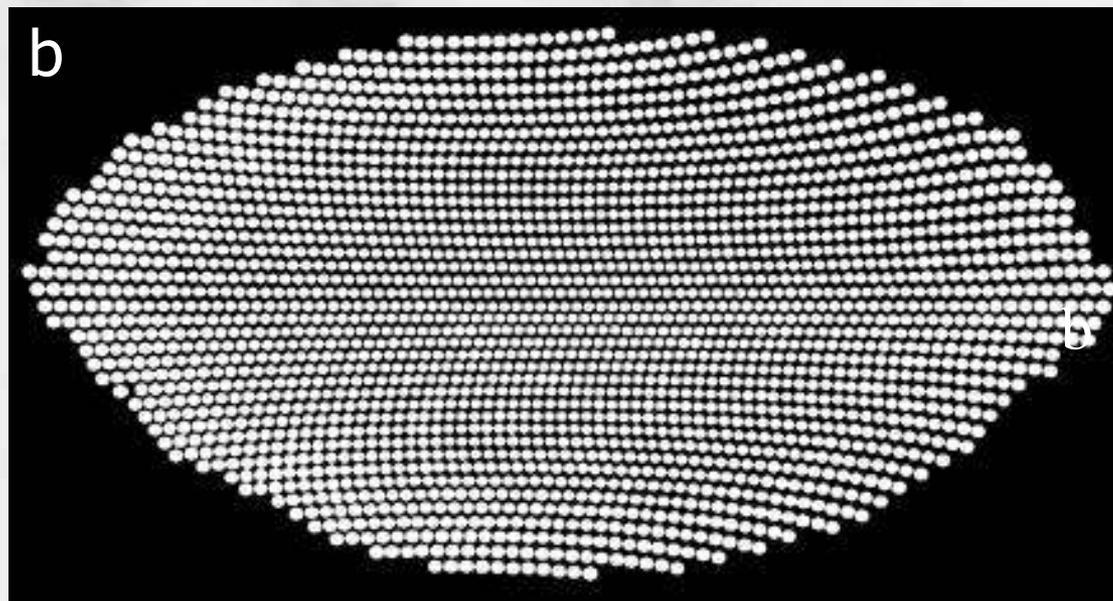
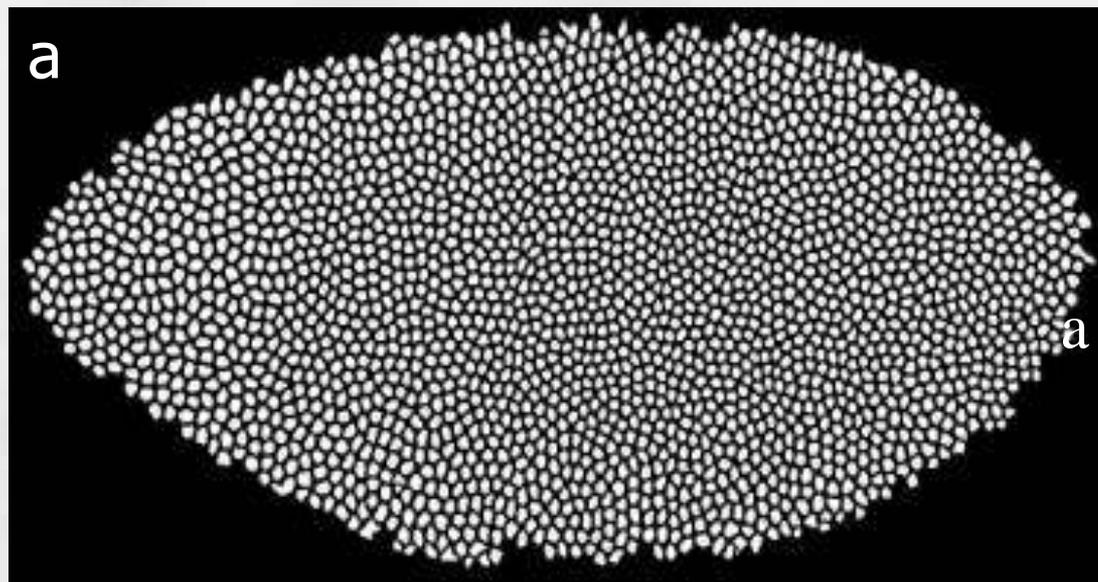
Каждому ядру каждого индивидуального эмбриона ставили в соответствие ядро усредненной ядерной структуры, имеющее наиболее близкие координаты, после чего вычисляли среднюю интенсивность флуоресценции по всем индивидуальным ядрам отнесенным к данному среднему ядру.

Метод построения
эталонной картины
экспрессии гена

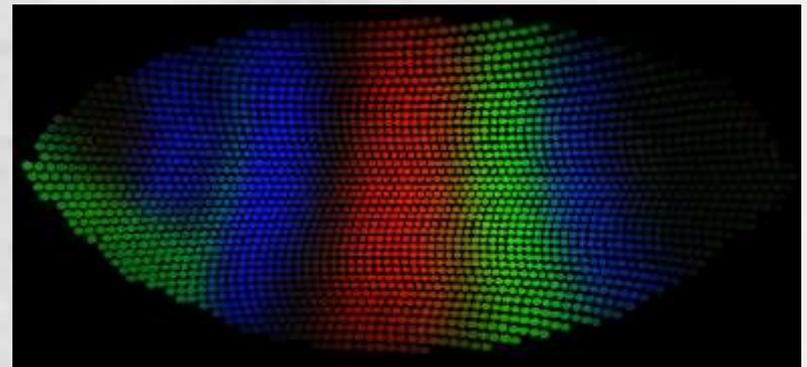
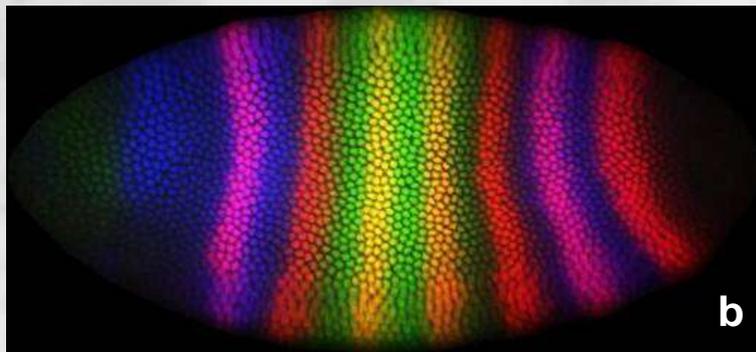
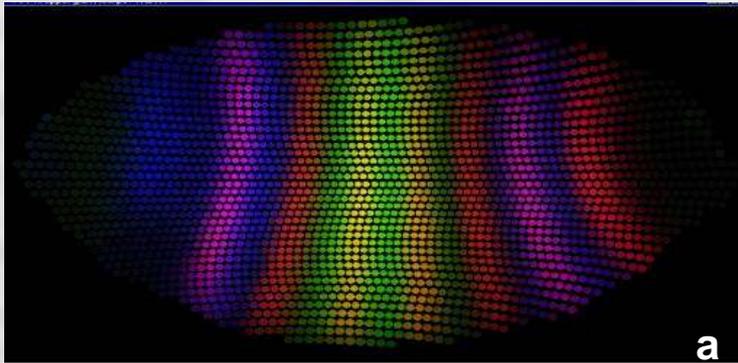
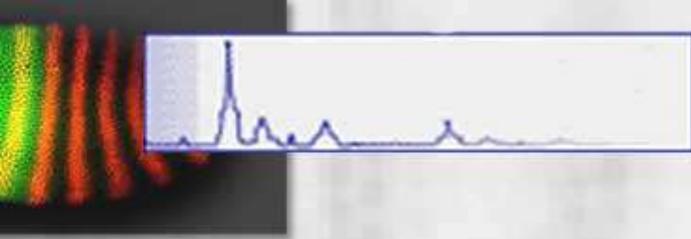




Ядерная маска
индивидуального
эмбриона (a) и
усредненная
ядерная структура
эмбриона (b)



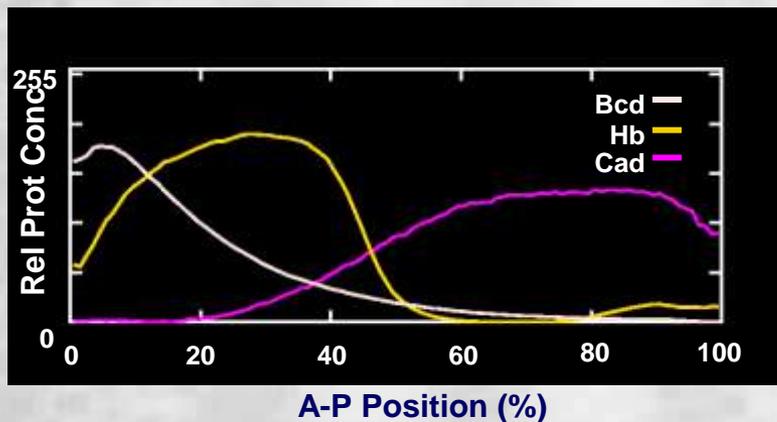
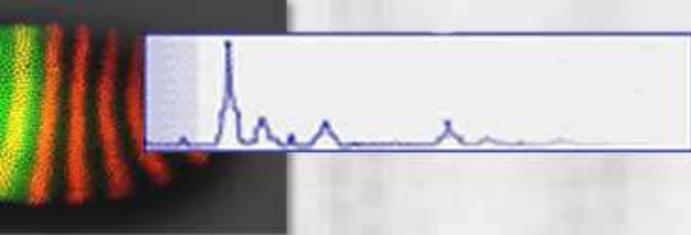
Атлас экспрессии генов сегментации во времени и пространстве



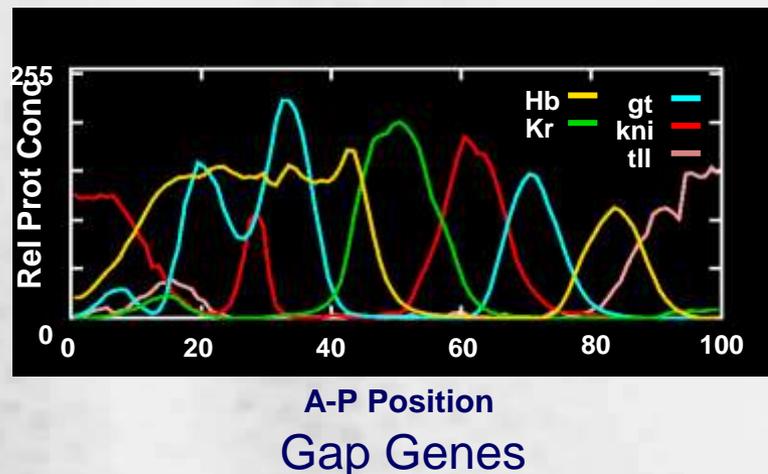
Карта экспрессии *Kr*, *gt* and *kni*
во временном классе 8

Карта экспрессии *Kr*, *gt* and *eve* во
временном классе 8 (a)
и индивидуальный эмбрион,
сканированный для выявления
экспрессии этих генов (b)

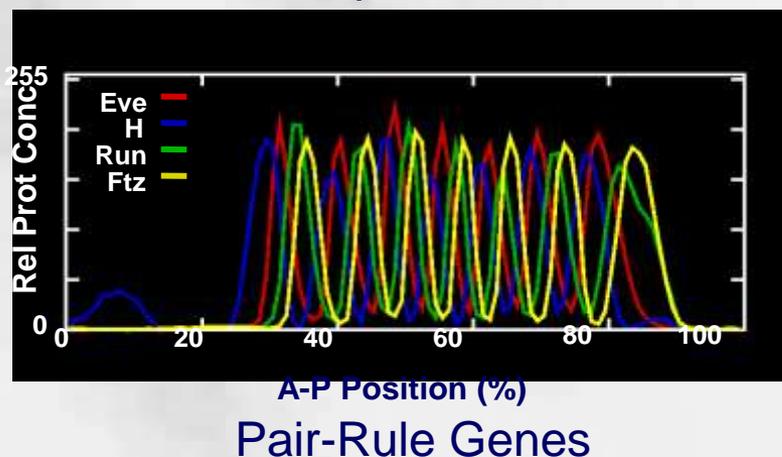
Эталонные количественные данные по экспрессии генов сегментации в позднем цикле 14А



Maternal
Coordinate Genes

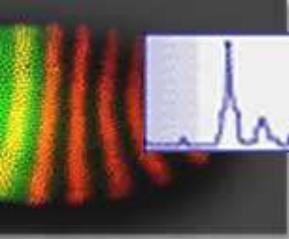


Gap Genes



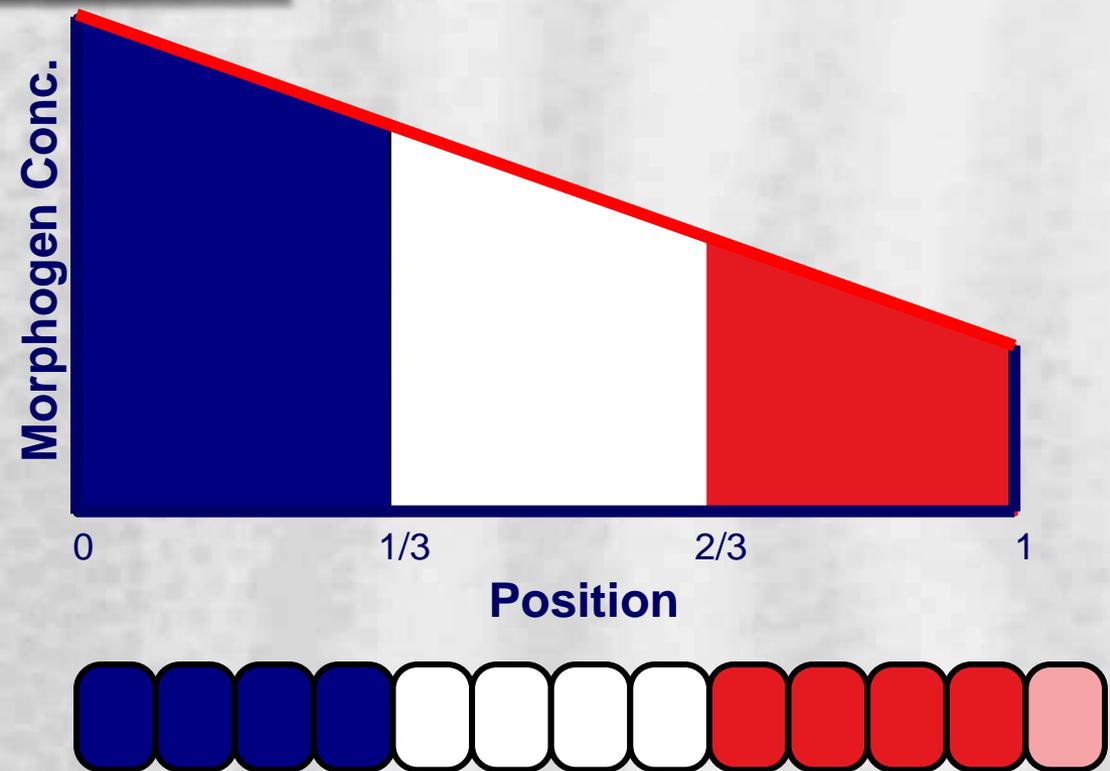
Pair-Rule Genes

Эталонные данные имеют разрешение в пространстве в одно ядро, охватывают временной интервал в 1.5 часа развития с разрешением по времени около 6.5 минут развития.



**Высокая точность количественных
данных
позволила выявить новые
биологические закономерности
формирования препаттерна
сегментации и
природу позиционной информации в
бластодерме дрозофилы**

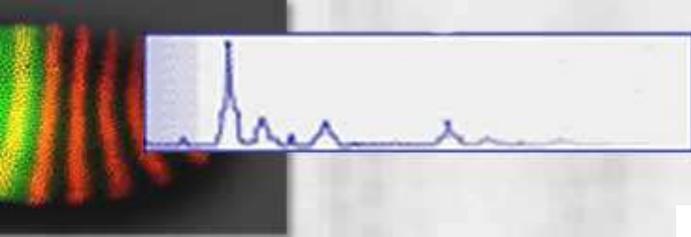
Позиционная информация и морфогены



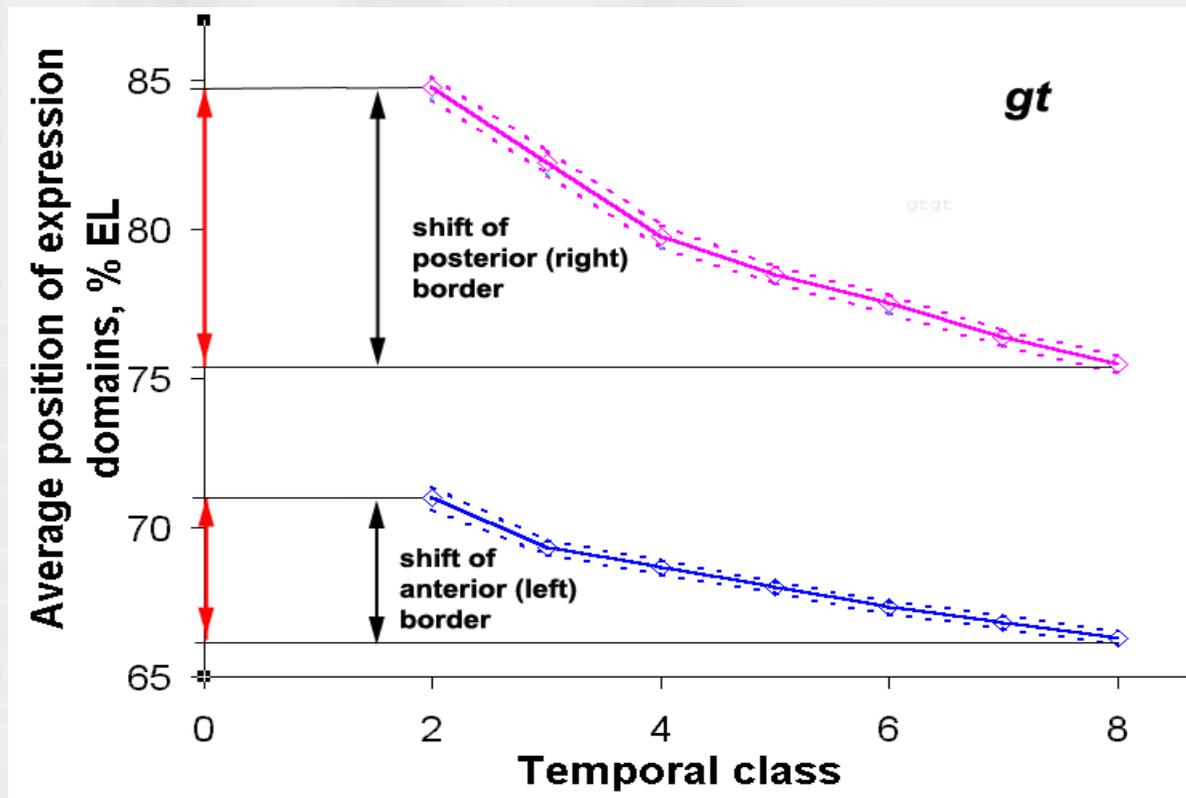
В основу этих концепций заложена статическая система координат, налагаемая на абсолютно пассивную ткань-мишень в каждый момент развития после достижения градиентом стационарного состояния.

Морфоген:

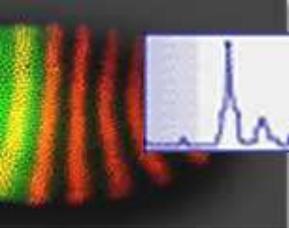
- непосредственно обуславливает зависящую от порога индукцию по крайней мере двух разных состояний экспрессии генов в клетках-мишенях.
- Транспортируется и действует на больших расстояниях.



Сдвиги областей экспрессии генов гар в будущей зародышевой полоске

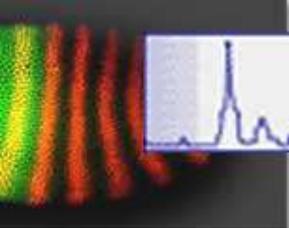


ген	<i>Kr</i> {n=261}		<i>kni</i> {n=134}		<i>gt</i> {n=137}		<i>hb</i> {n=136}	
	A	P	A	P	A	P	A	P
сдвиги (%ДЭ)	1.02	5.53	1.6	6.32	6.38	15.21	2.02	4.1

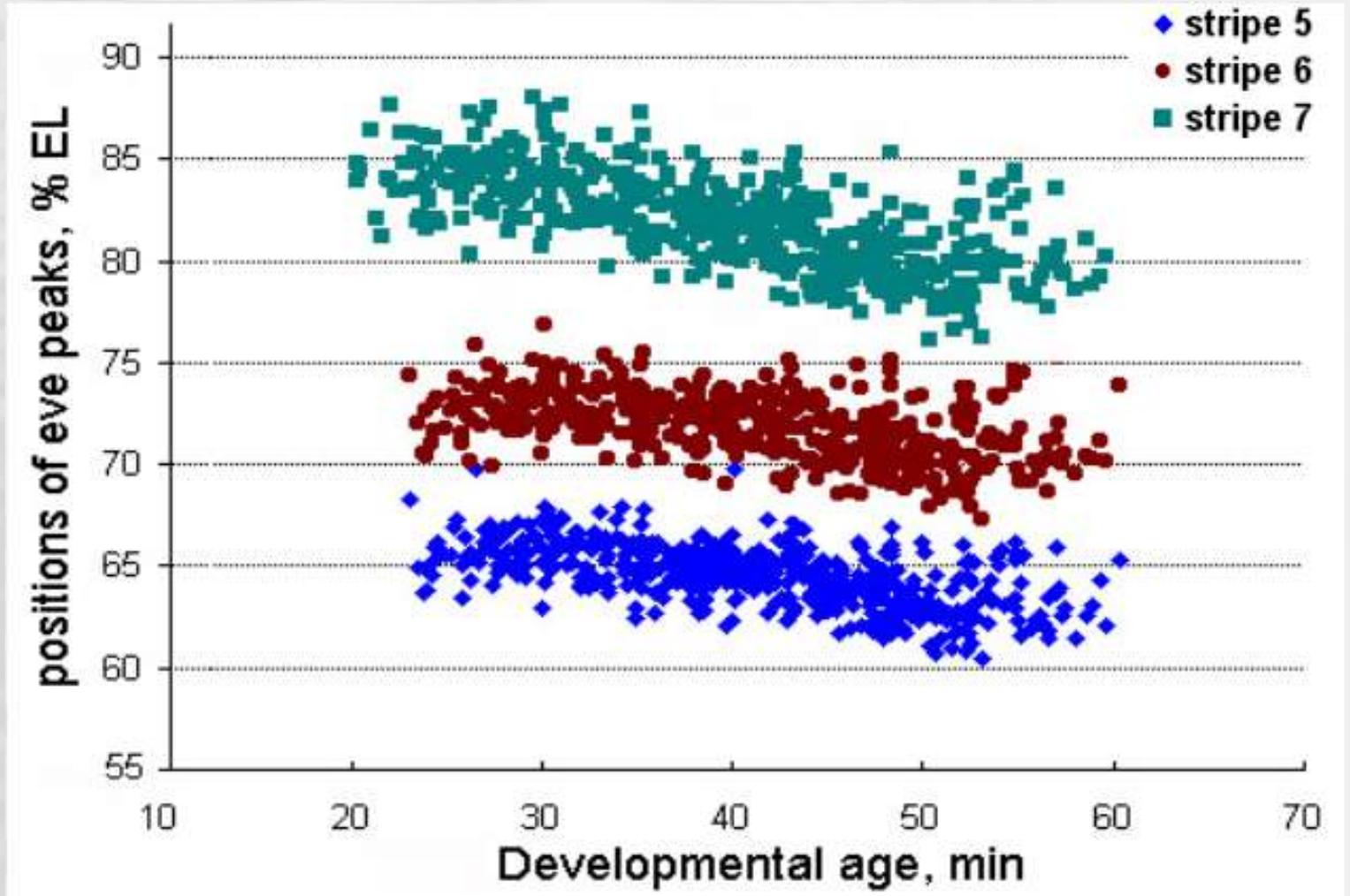


Сдвиги областей экспрессии генов pair-rule

полоса		1	2	3	4	5	6	7
Ген								
<i>eve</i> {n=654}	В.к	3-8	3-8	3-8	3-8	4-8	4-8	3-8
	сдвиг	0.47	1.94	1.97	3.44	3.21	2.62	5.26
<i>ftz</i> {n=158}	В.к	3-8	3-8	3-8	4-8	3-8	4-8	5-8
	сдвиг	0.2	1.27	1.72	1.86	2.27	3.84	1.01



Динамика изменения положения полос гена *eve*



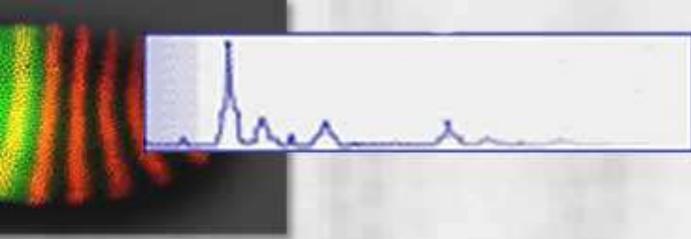
Позиционная информация имеет динамическую природу

- позиционирование границ генов-мишеней происходит в результате синергетического взаимодействия материнских градиентов *Vcd* и *Hb*, имеющих одинаковую полярность.
- концентрация морфогена *Vcd* непостоянна и сильно меняется во времени.
- области экспрессии генов *gap* и *pair-rule*, являющихся мишенями действия материнских градиентов, меняют свое положение по мере развития.

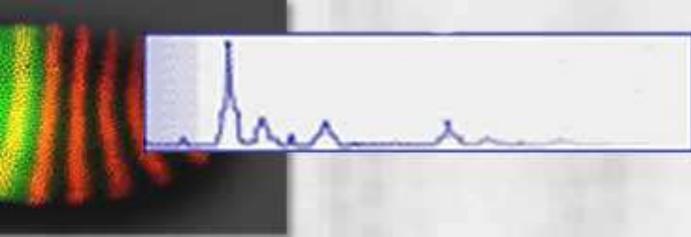
Позиционную информацию в бластодерме дрозофилы следует рассматривать как динамически меняющуюся во времени комбинацию концентраций продуктов материнских и зиготических генов.

В каждый момент времени эта комбинация определяется не только материнскими морфогенами, но и сдвигами границ областей экспрессии генов сегментации из-за регуляторных взаимодействий генов-мишеней.

Эта интерпретация подразумевает активный, а не пассивный способ интерпретации градиента морфогена и размывает границу между формированием и интерпретацией позиционной информации.



**Математическое моделирование
динамики
экспрессии генов *gpr* в цикле 14A**



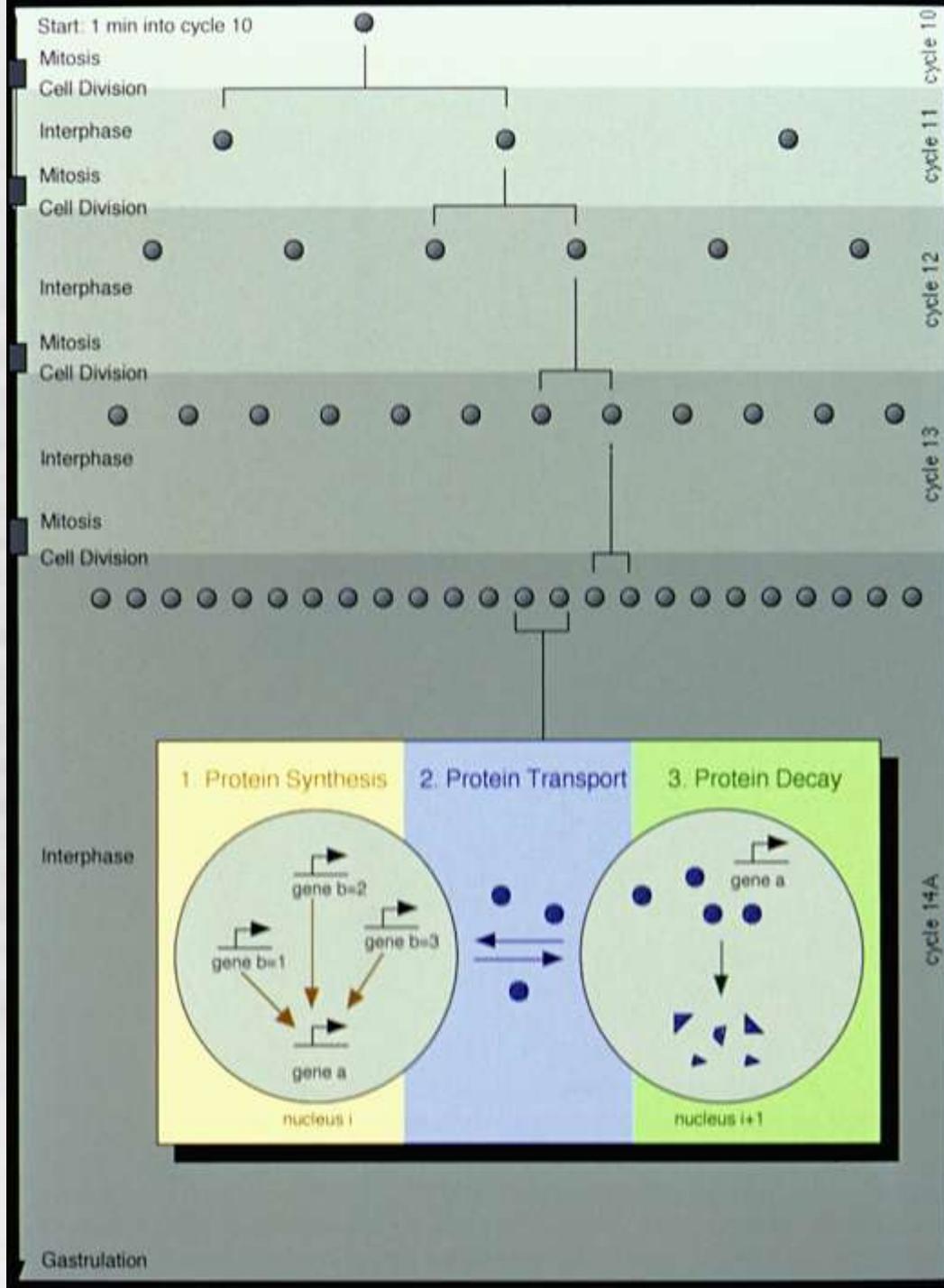
Гибридная динамическая система

Процессы в ядре:

1. Интерфаза (синтез)
2. Митоз (синтез не происходит)

и дискретный переход:

3. Деление ядер.
- Mjolsness, Sharp & Reinitz (1991), J. Theor. Biol. 152: 429-453



Synthesis

$$\frac{dv_i^a}{dt} = R_a g_a \left(\sum_{b=1}^N T^{ab} v_i^b + m^a v_i^{bcd} + h_a \right)$$

Transport

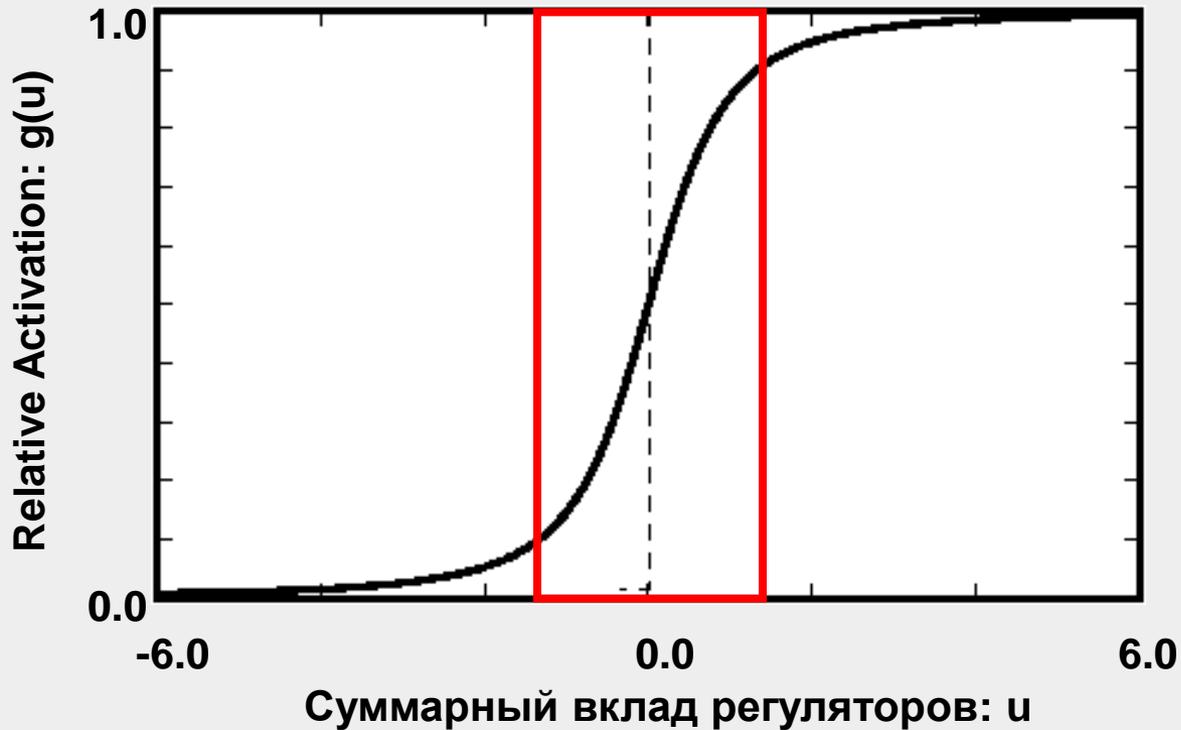
$$+ D^a(n) \left[\left(v_{i-1}^a - v_i^a \right) - \left(v_{i+1}^a - v_i^a \right) \right]$$

Decay

$$- \lambda_a v_i^a$$

$$\frac{dv_i^a}{dt} = R_a g_a \left(\sum_{b=1}^N T^{ab} v_i^b + m^a v_i^{bcd} + h_a \right)$$

Функция регуляции-экспрессии $g(u)$:



$$\frac{dv_i^a}{dt} = R_a g_a \left(\sum_{b=1}^N T^{ab} v_i^b \oplus m^a v_i^{Bcd} \oplus h_a \right)$$

Суммарный вклад регуляторов в регуляцию гена a :

Вклад продукта гена b пропорционален его концентрации.

Вклад Bcd в систему является внешним.

h характеризует регуляторный вклад других материнских факторов транскрипции, равномерно распределенных в бластодерме эмбриона.

Вклады регуляторов аддитивны.

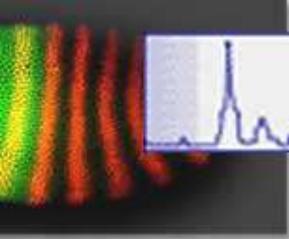
$$\frac{dv_i^a}{dt} = R_a g_a \left(\sum_{b=1}^N T^{ab} v_i^b + m^a v_i^{bcd} + h_a \right)$$

Матрица регуляторных коэффициентов (T):

Ген	b					
	a		1	2	...	N
1			T^{11}	T^{12}	...	T^{1N}
2			T^{21}	T^{22}	...	T^{2N}
⋮			⋮	⋮	⋮	⋮
N			T^{N1}	T^{N2}	...	T^{NN}

Параметры T :

активация : \geq порог. знач.
 репрессия : \leq порог. знач.
 отсутствие : иначе
 ВЗАИМОД.



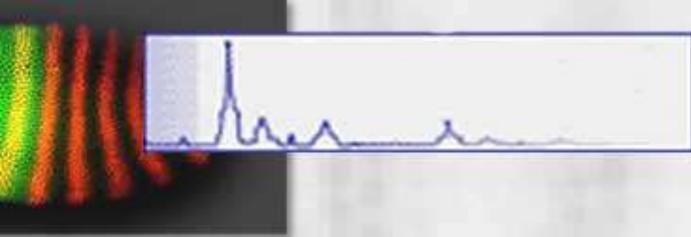
Решение обратной задачи

Параметры модели подбираются таким образом, чтобы функционал качества, равный сумме квадратов разностей между экспериментальными данными и результатами расчета по модели, достигал наименьшего значения.

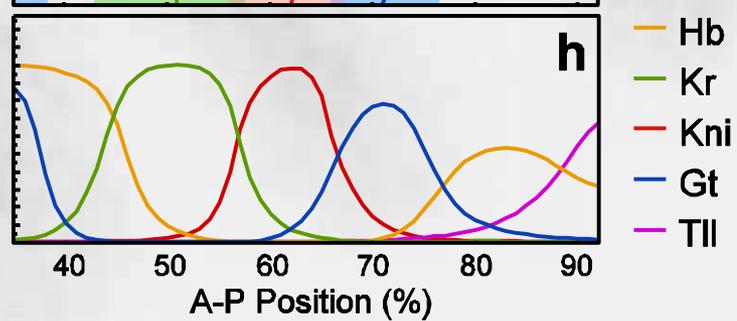
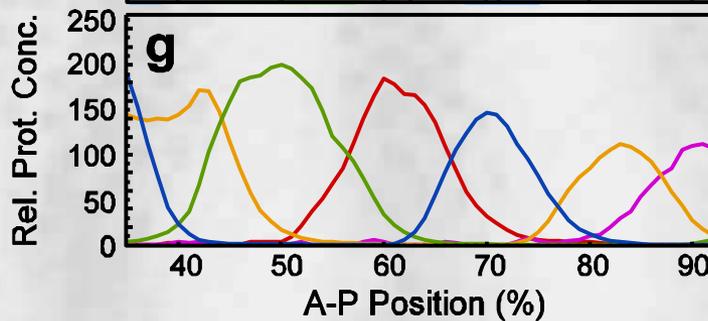
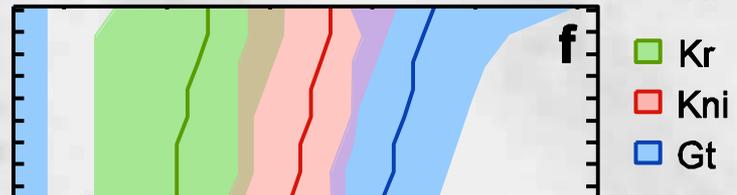
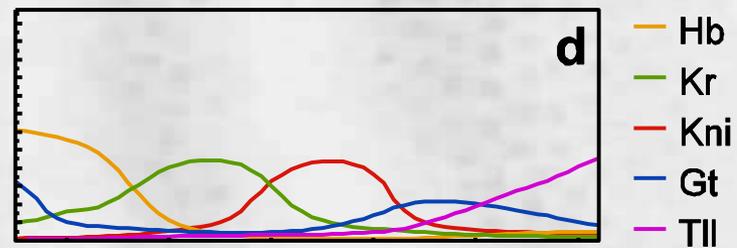
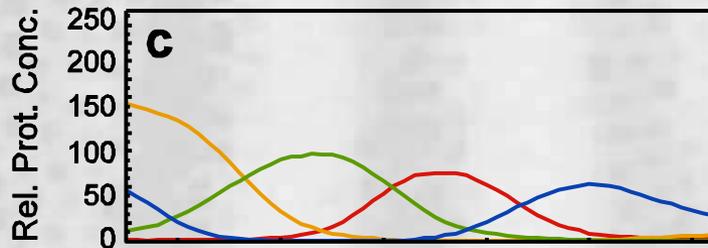
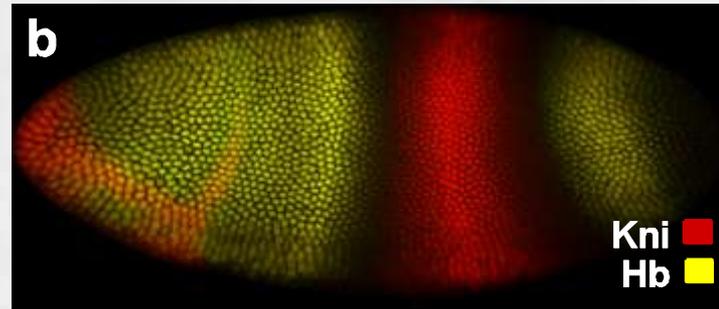
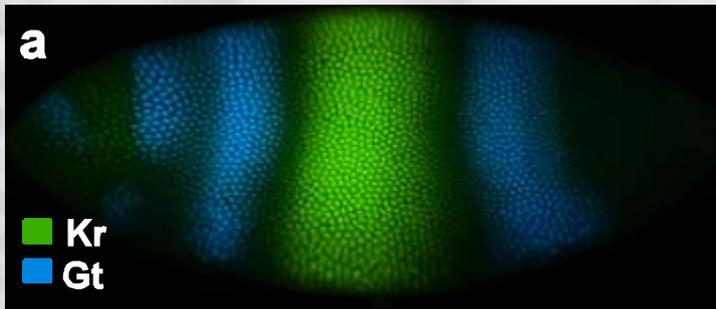
$$E = \sum (v_i^a(t)_{\text{model}} - v_i^a(t)_{\text{data}})^2 \rightarrow \min$$

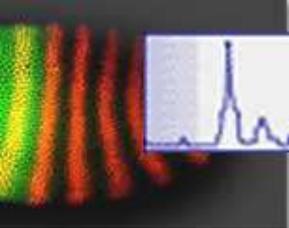
Для нахождения параметров модели использовалась параллельная версия стохастического метода оптимизации - метода численного отжига Лама.

- ✓ **Преимущества метода:** сходится к глобальному минимуму E .
- ✓ **Недостаток:** требует очень большого и непредсказуемого заранее времени вычислений, зависящего от начального приближения.



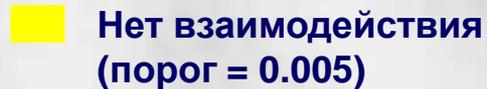
Математическая модель правильно воспроизводит сдвиги областей экспрессии генов гар





Анализ коэффициентов матрицы регуляторных взаимодействий

	<i>bcd</i>	<i>cad</i>	<i>hb</i>	<i>Kr</i>	<i>gt</i>	<i>kni</i>	<i>tll</i>
<i>hb</i>	0/0/10	0/0/10	0/0/10	0/10/0	0/2/8	10/0/0	1/8/1
<i>Kr</i>	0/0/10	0/0/10	9/1/0	0/0/10	10/0/0	9/1/0	10/0/0
<i>gt</i>	0/0/10	0/0/10	9/0/1	10/0/0	0/3/7	1/9/0	10/0/0
<i>kni</i>	3/0/7	0/0/10	10/0/0	6/4/0	9/1/0	0/0/10	10/0/0



N = 10

$$\frac{dv_i^a}{dt} = R_a g_a \left(\sum_{b=1}^N T^{ab} v_i^b + m^a v_i^{bcd} + h_a \right)$$

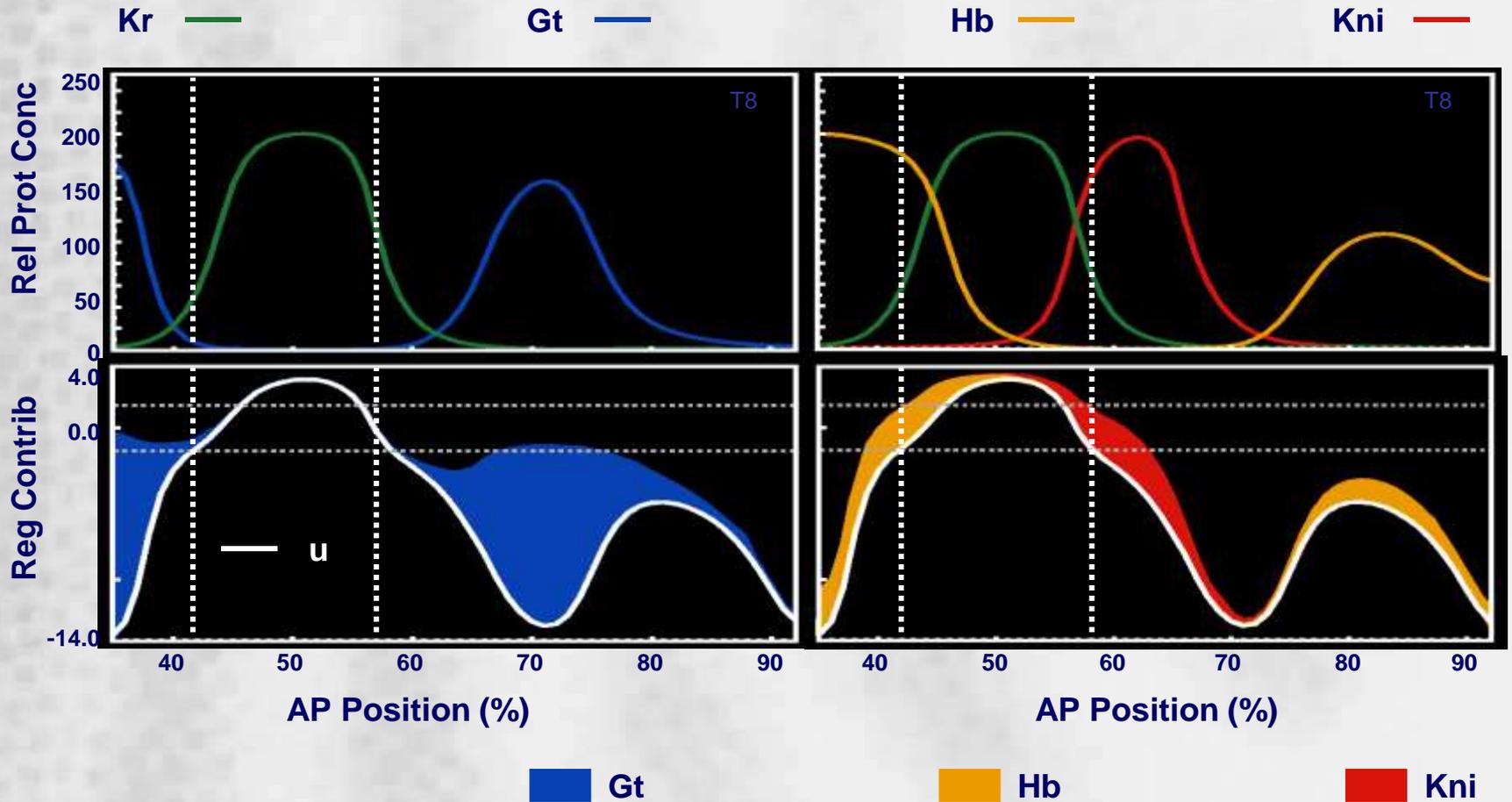
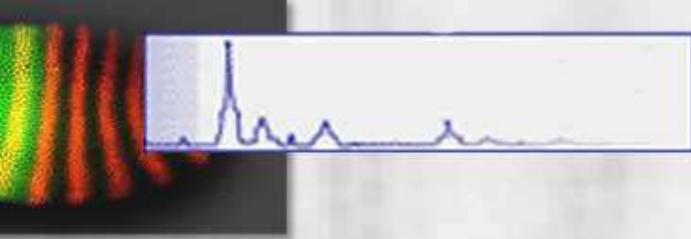
Графический анализ:

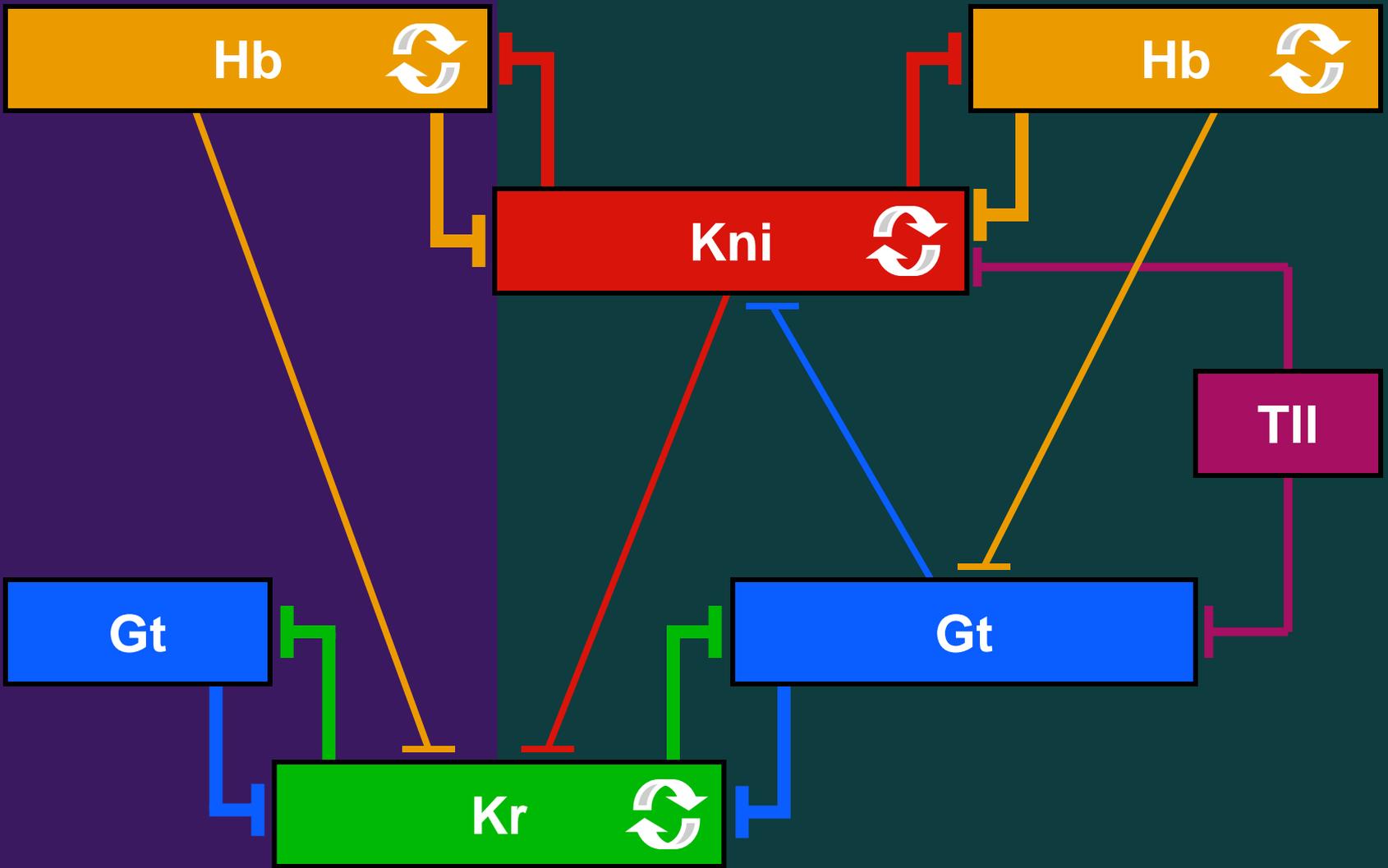
Можно количественно оценить вклад любого регулятора в регуляцию данного гена в каждом ядре и в каждый момент времени моделируемой системы.

Например:

$T^{Kr \rightarrow hb} v^{Kr}$ характеризует вклад Kr в регуляцию *hb*.

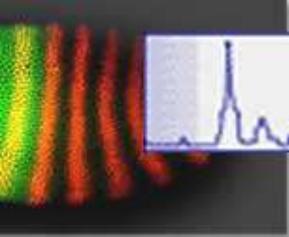
Графический анализ регуляции в системе генов гар: репрессия *Kr*



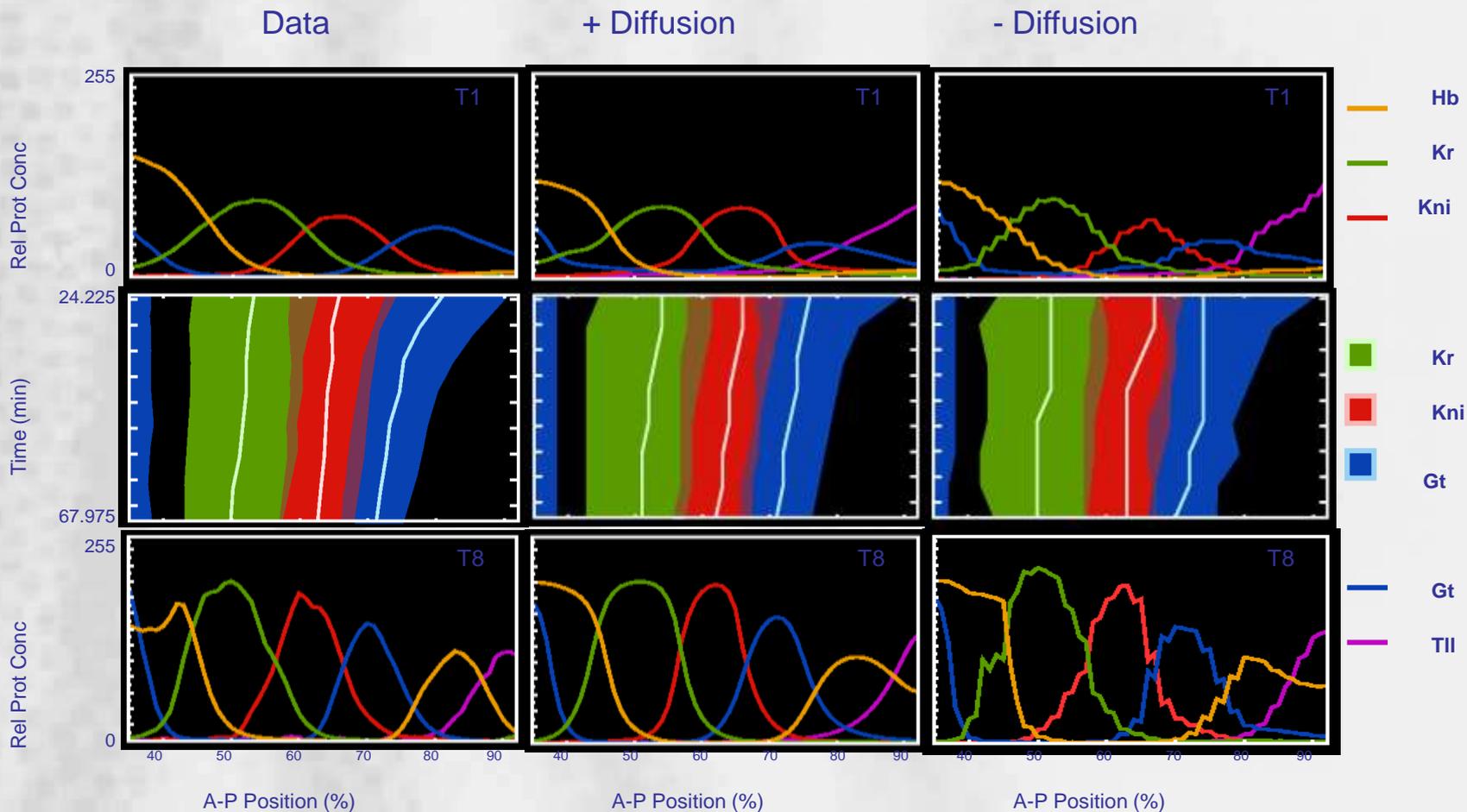


Bcd

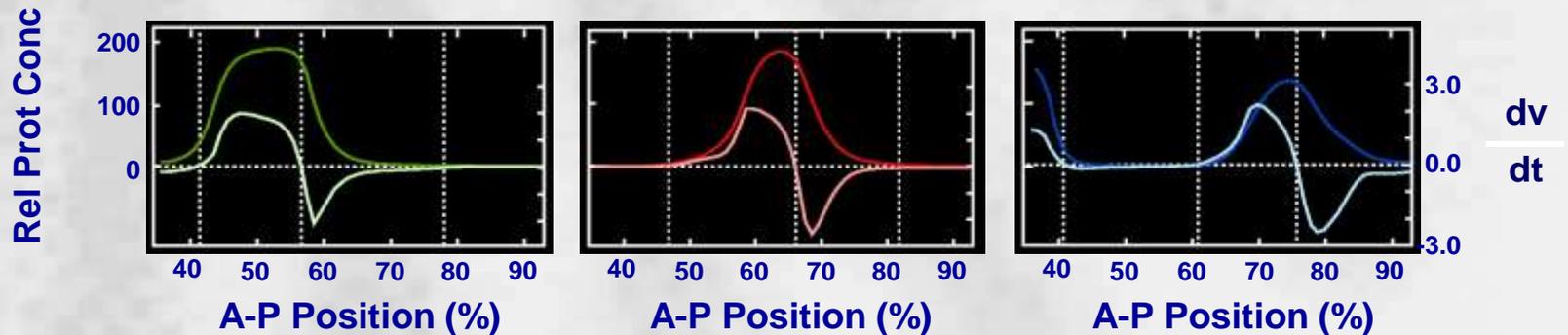
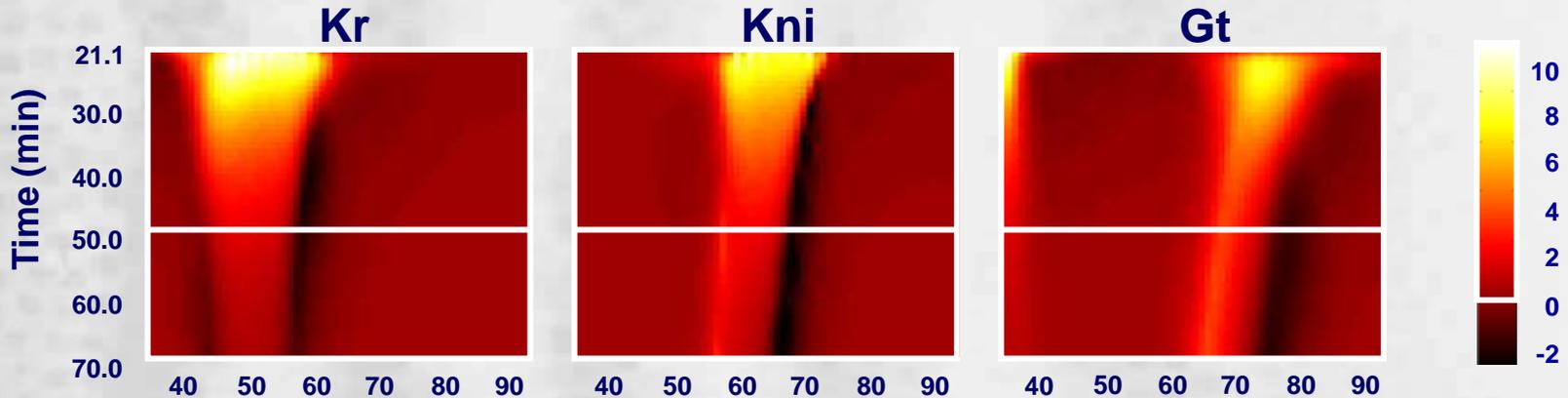
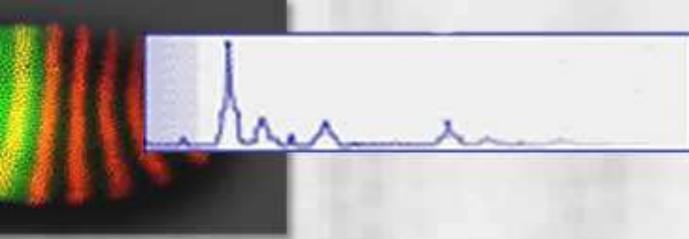
Cad



Сдвиги областей экспрессии генов в модели без диффузии



Динамика областей синтеза и распада белка во времени и пространстве

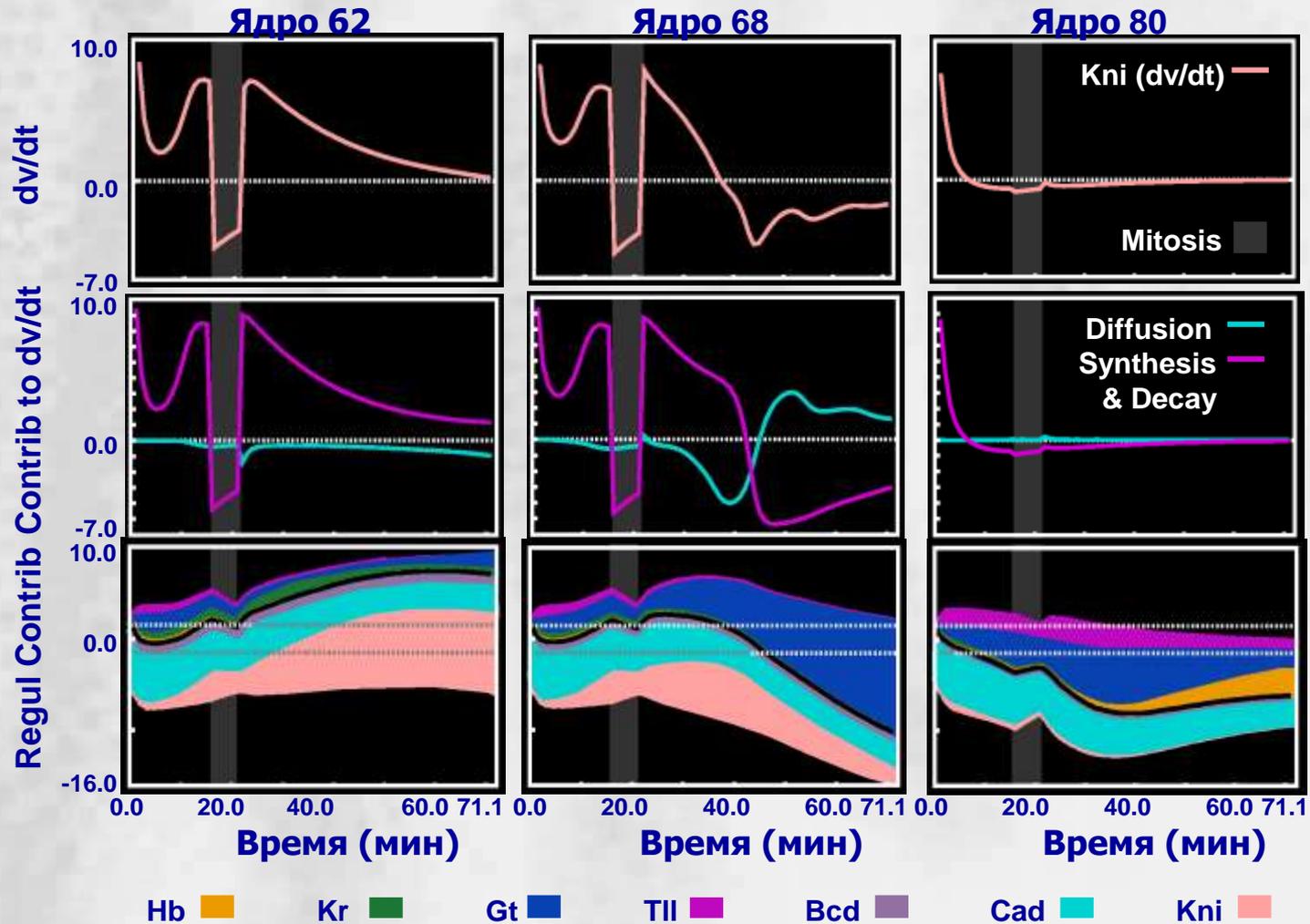
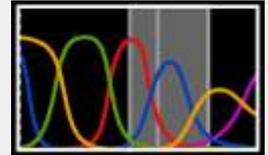
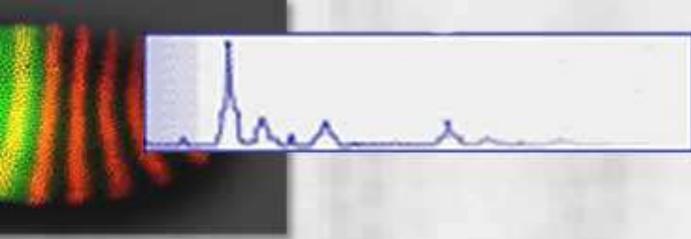


Kr (конц. белка) —
Kr (dv/dt) —

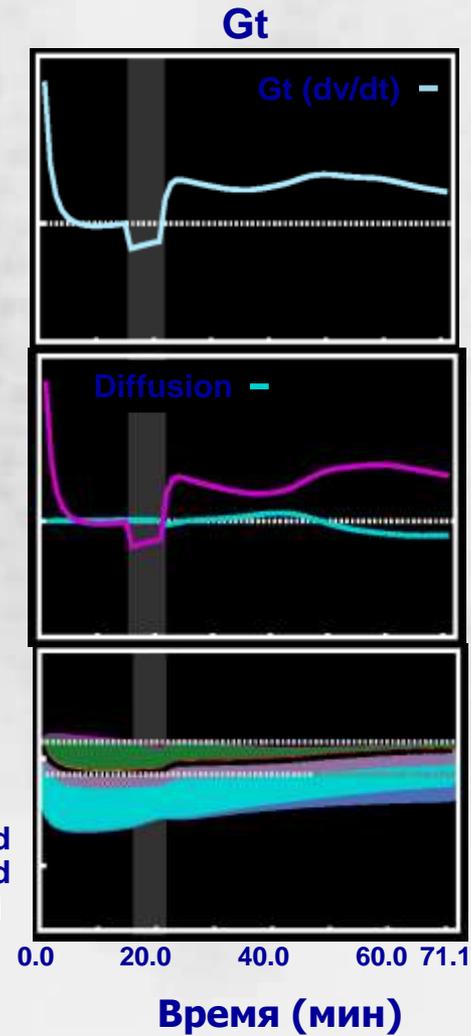
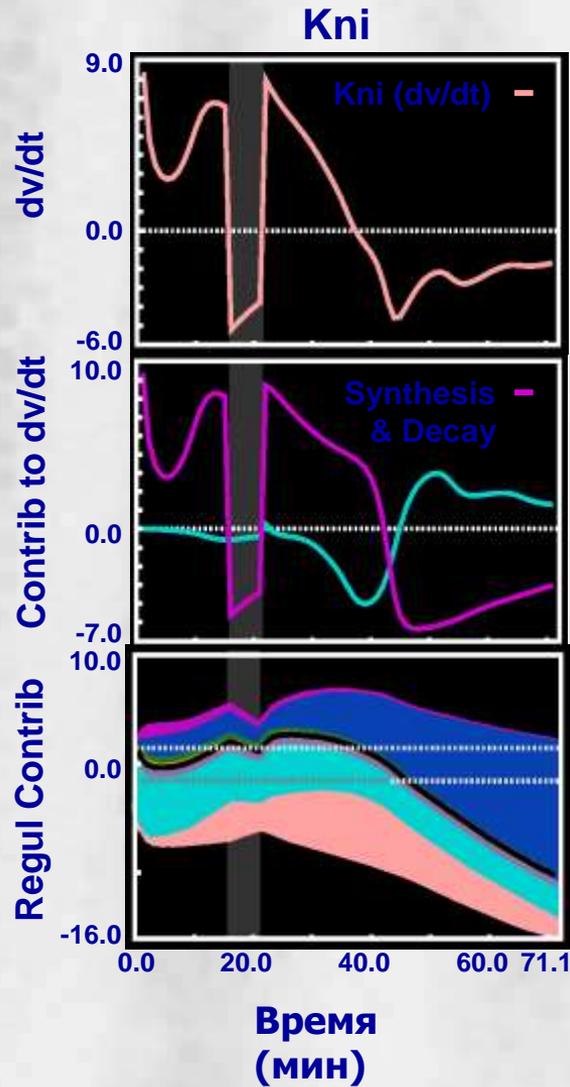
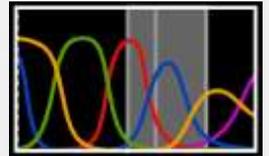
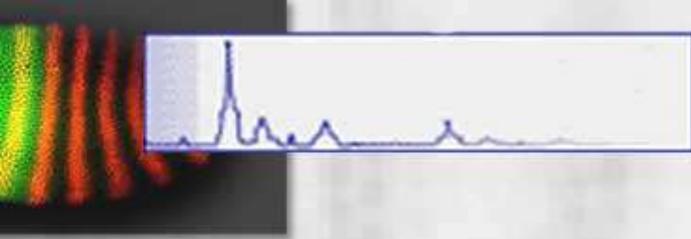
Kni (конц. белка) —
Kni (dv/dt) —

Gt (конц. белка) —
Gt (dv/dt) —

Графический анализ механизма сдвига задней границы *kni*



Анализ регуляции *kni* и *giant* в ядре 68

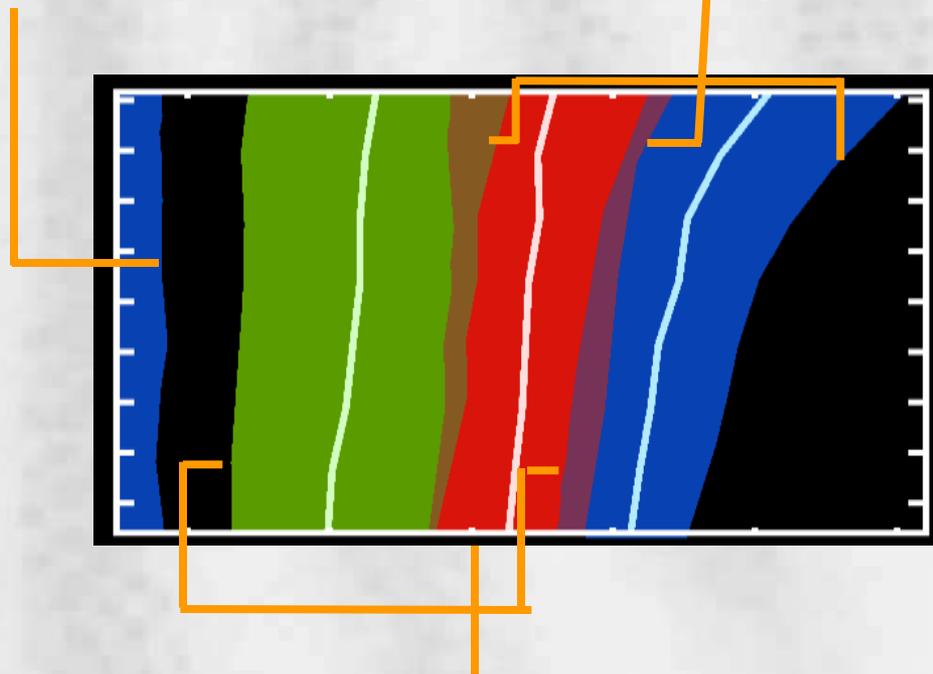


Механизм сдвигов областей экспрессии генов гар

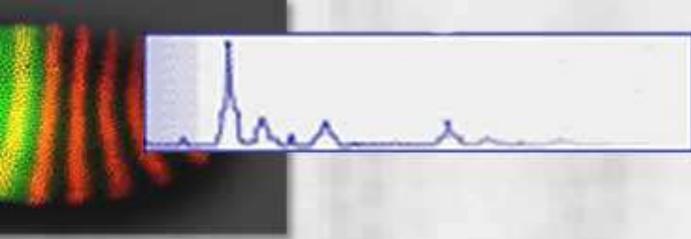
Задние границы

Сдвиги обусловлены асимметричной репрессией между соседними генами гар. Ген, домен которого расположен ближе к заднему концу, репрессирует ген, область экспрессии которого расположена по соседству, но ближе к переднему концу эмбриона.

Задние границы областей экспрессии *gt* и *hb* в передней части эмбриона не сдвигаются.

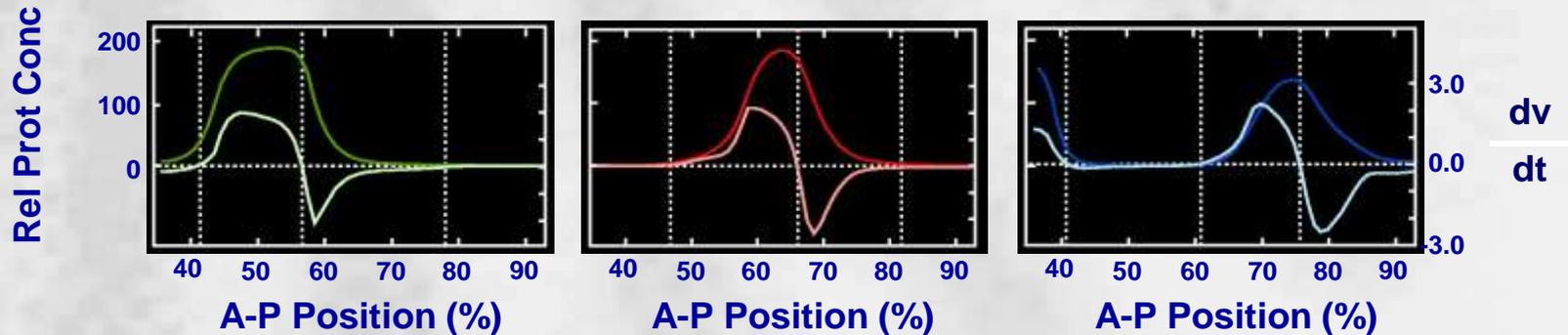
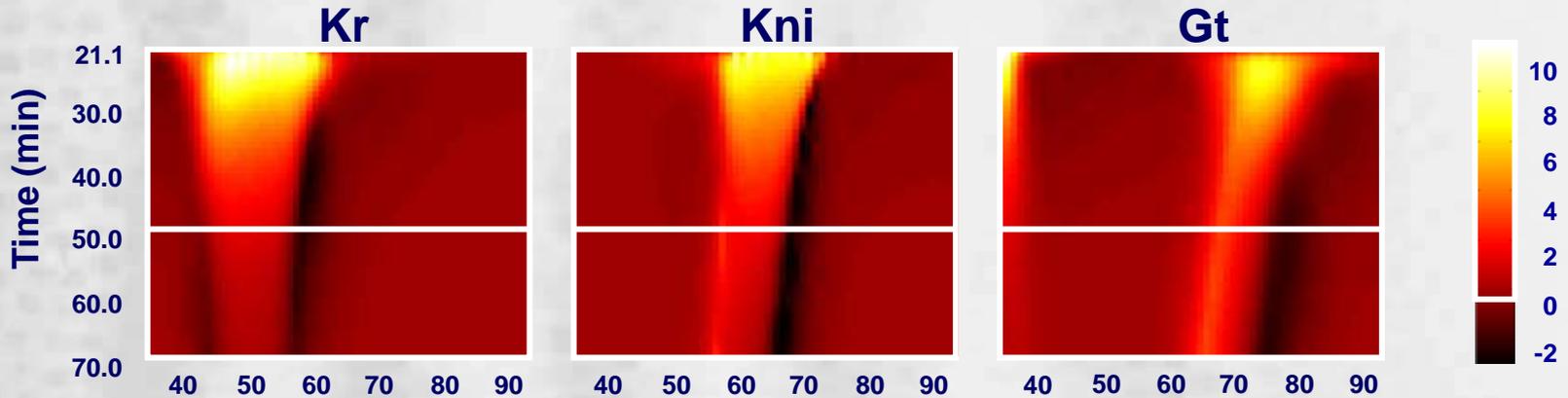
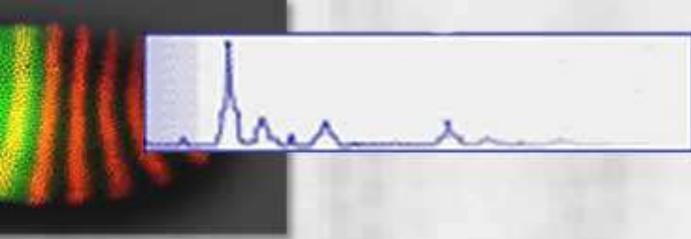


Передние границы сдвигаются в результате сдвигов задних границ областей экспрессии генов, расположенных по соседству.



Проверка гипотезы об асимметричном распределении в презумптивной зародышевой полоске областей концентраций мРНК *Kr*, *kni*, *gt* и *hb* относительно областей распределения концентраций соответствующих белков.

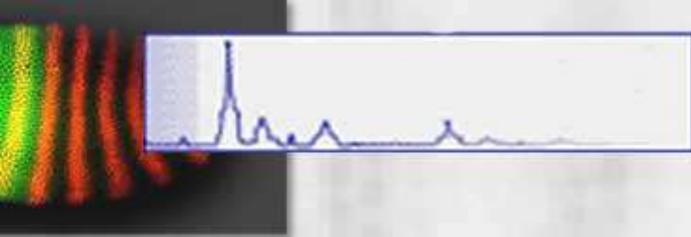
Динамика областей синтеза и распада белка во времени и пространстве



Kr (prot conc) —
Kr (dv/dt) —

Kni (prot conc) —
Kni (dv/dt) —

Gt (prot conc) —
Gt (dv/dt) —



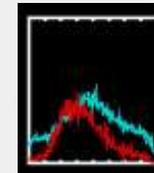
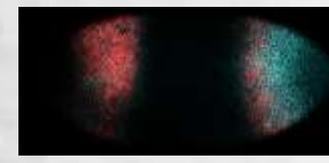
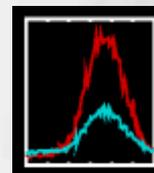
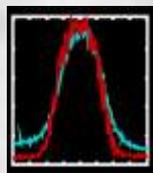
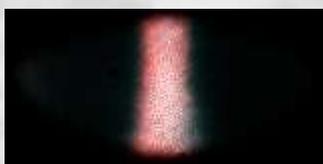
Домены экспрессии генов гар: области локализации РНК и белков

Kr

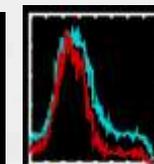
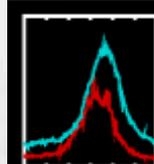
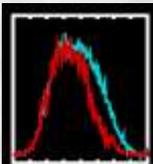
kni

gt

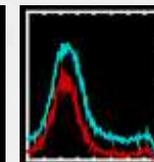
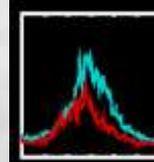
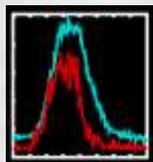
Ранний
цикл 14A



Середина
цикла 14A



Поздний
цикл 14A



30 50 70

A-P Position
(%)

45 60 75

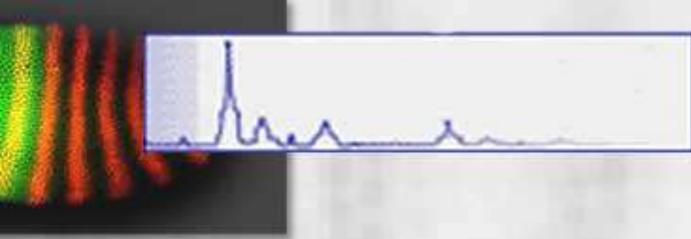
A-P Position
(%)

60 80 100

A-P Position
(%)

■ RNA
■ Protein

— RNA
— Protein

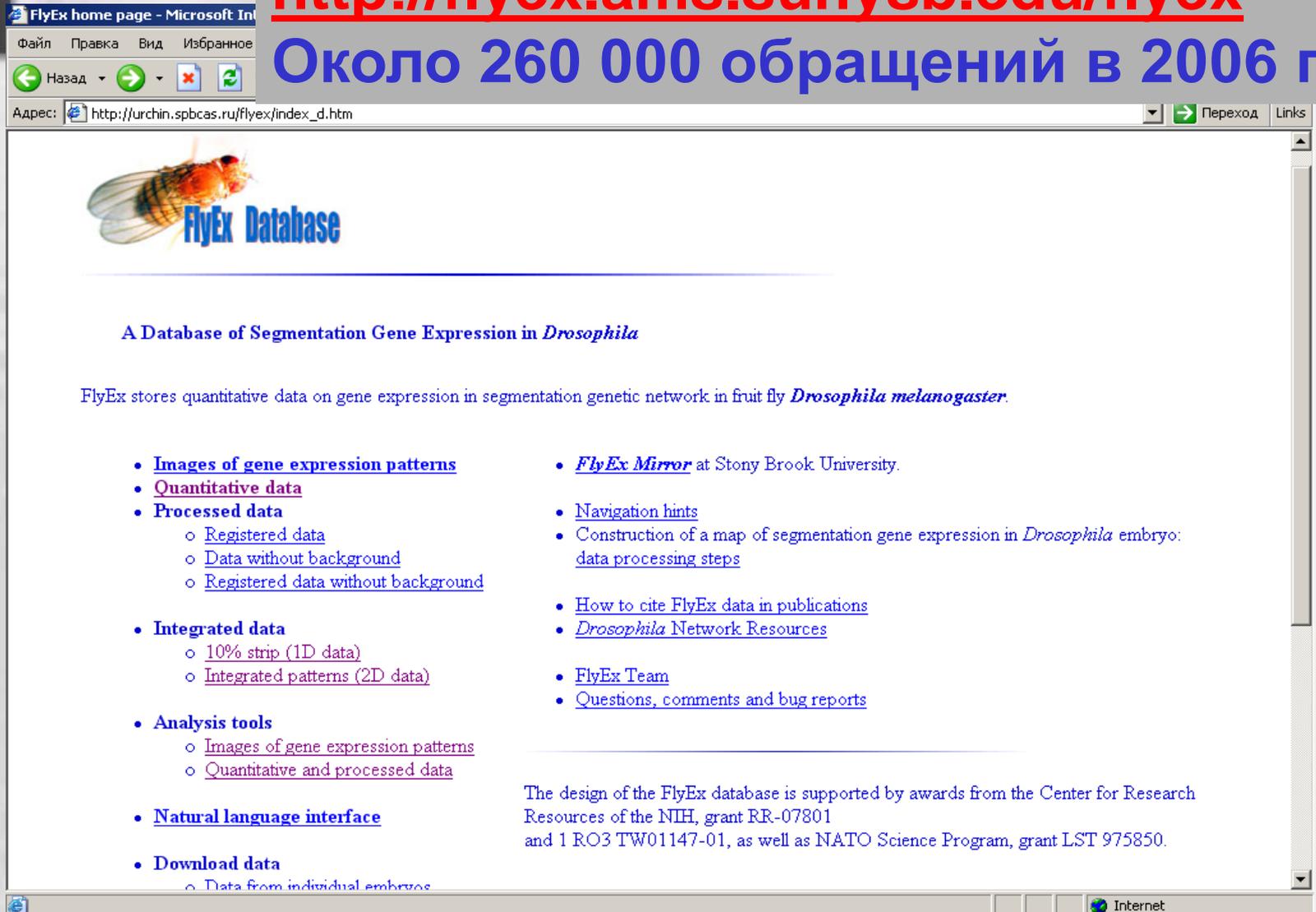


**Создание атласа экспрессии генов
сегментации
во времени и пространстве**

<http://urchin.spbcas.ru>

<http://flyex.ams.sunysb.edu/flyex>

Около 260 000 обращений в 2006 г.



FlyEx Database

A Database of Segmentation Gene Expression in *Drosophila*

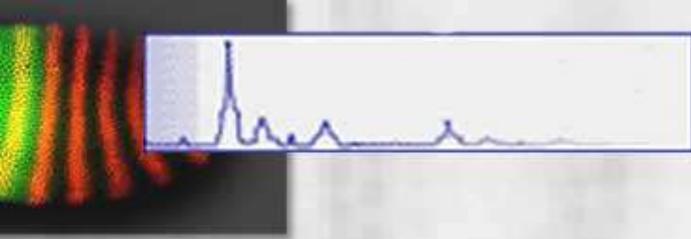
FlyEx stores quantitative data on gene expression in segmentation genetic network in fruit fly *Drosophila melanogaster*.

- [Images of gene expression patterns](#)
- [Quantitative data](#)
- [Processed data](#)
 - [Registered data](#)
 - [Data without background](#)
 - [Registered data without background](#)
- [Integrated data](#)
 - [10% strip \(1D data\)](#)
 - [Integrated patterns \(2D data\)](#)
- [Analysis tools](#)
 - [Images of gene expression patterns](#)
 - [Quantitative and processed data](#)
- [Natural language interface](#)
- [Download data](#)
 - [Data from individual embryos](#)
- [FlyEx Mirror](#) at Stony Brook University.
- [Navigation hints](#)
- [Construction of a map of segmentation gene expression in *Drosophila* embryo: data processing steps](#)
- [How to cite FlyEx data in publications](#)
- [Drosophila Network Resources](#)
- [FlyEx Team](#)
- [Questions, comments and bug reports](#)

The design of the FlyEx database is supported by awards from the Center for Research Resources of the NIH, grant RR-07801 and 1 RO3 TW01147-01, as well as NATO Science Program, grant LST 975850.

Drosophila Network Resources

<http://flybase.bio.indiana.edu/allied-data/resources.html>



Анализ данных в базе данных FlyEx

- Как области экспрессии генов сегментации расположены относительно друг друга на разных этапах развития?
- Каково качество количественных данных, хранящихся во FlyEx?
- Какова динамика формирования областей экспрессии данного гена?
- Оценка уровня варибельности картины экспрессии индивидуального гена. Меняется ли уровень варибельности во времени и пространстве?

Проверка качества регистрации данных



FlyEx Database - Microsoft Internet Explorer

Адрес: http://urchin.spbcas.ru/cgi-bin/db2www.cgi/flyex/analysis_d2w/embryo_list

registered by FRDWT

ab4	14A	5	even-skipped in <i>ch. 1</i> 1)	2) info
ab8	14A	5	even-skipped in <i>ch. 1</i> 3)	4) info
ac15	14A	5	even-skipped in <i>ch. 1</i> 5)	6) info
as12	14A	5	even-skipped in <i>ch. 1</i> 7)	8) info

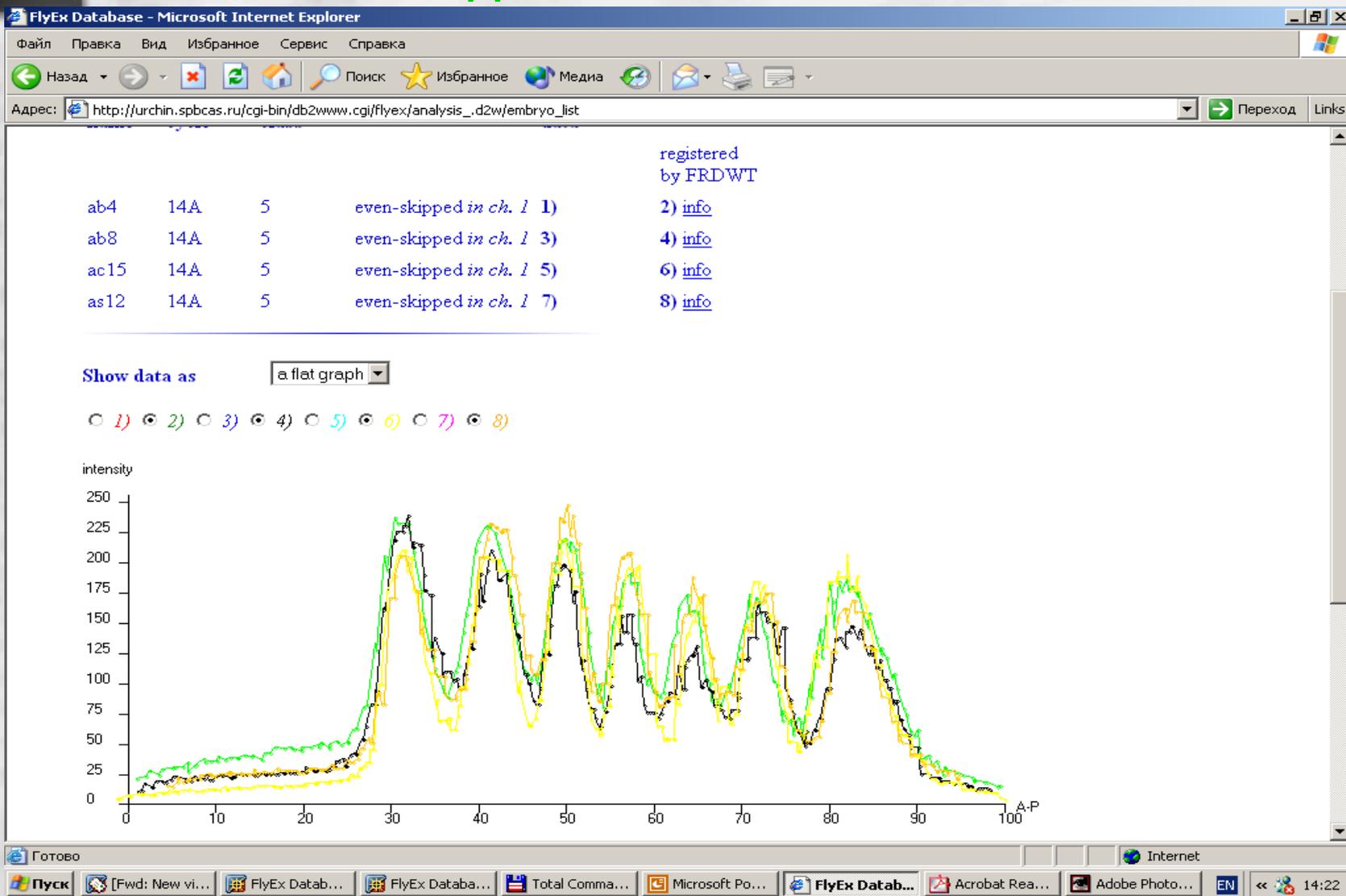
Show data as

1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8)

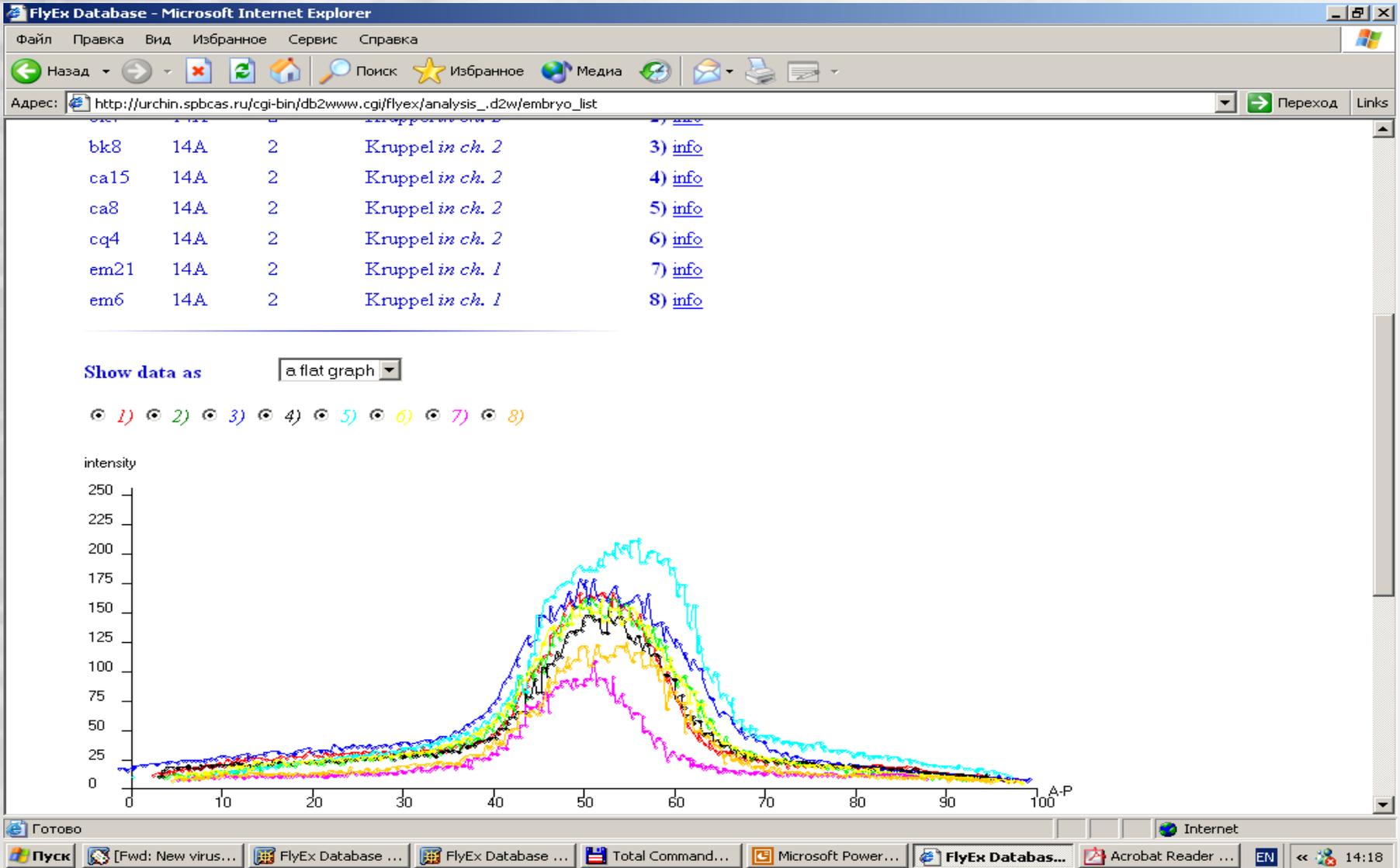
Готово

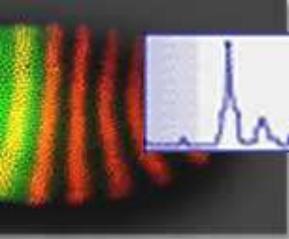
Пуск [Fwd: New vi... FlyEx Datab... FlyEx Databa... Total Comma... Microsoft Po... FlyEx Datab... Acrobat Rea... Adobe Photo... EN 14:21

Проверка качества регистрации данных



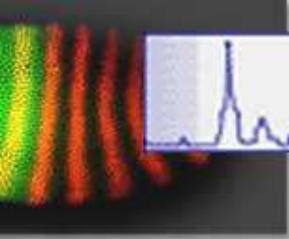
Оценка уровня варибельности картины экспрессии индивидуального гена





Выводы

- Разработан новый конвейерный метод количественной оценки уровня экспрессии генов сегментации на основе изображений, полученных с помощью конфокального микроскопа. Этот метод включает такие процедуры как сегментацию изображений, удаление фонового сигнала, определение возраста эмбриона, пространственную регистрацию картин экспрессии и интеграцию данных.
- Показано, что возраст эмбриона в цикле деления ядер 14A может быть предсказан с точностью до 2 минут развития на основании анализа высоко динамичной картины экспрессии гена *even-skipped*.
- Получен полный, точный и систематический набор количественных данных об экспрессии генов сегментации в каждом ядре каждого из 1580 индивидуальных эмбрионов, а также интегрированные данные об экспрессии каждого из 14 генов сегментации. Интегрированные данные имеют пространственное разрешение в одно ядро и разрешение в по времени в 15 минут развития для цикла 13 и около 6.5 минут развития для цикла 14A.



Выводы (продолжение)

- Показано, что области экспрессии генов сегментации, локализованные в будущей зародышевой полоске, по мере своего формирования в цикле 14А смещаются к переднему полюсу эмбриона. Сдвиги областей экспрессии по порядку величины совпадают с размерами полос экспрессии генов *pair-rule*. Смещения ядер в этом районе эмбриона значительно меньше, чем сдвиги областей экспрессии.
- Разработана математическая модель, которая правильно воспроизводит временную динамику экспрессии генов сегментации, размер перекрывания областей экспрессии соседних генов, а также сдвиги границ областей экспрессии генов *gap* в цикле 14А.



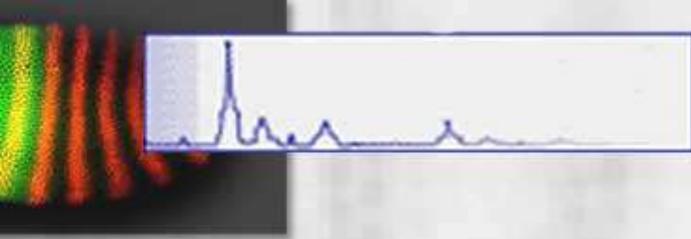
Выводы (продолжение)

➤ Реконструированная в рамках модели топология сети генов *gap* включает в себя пять базовых регуляторных механизмов:

- (1) активацию генов *gap* под действием *Vcd* и *Cad*;
- (2) автоактивацию генов *gap*;
- (3) сильную репрессию по принципу обратной связи между генами *gap* с неперекрывающимися областями экспрессии;
- (4) асимметричную репрессию между генами *gap*, чьи области экспрессии перекрываются;
- (5) репрессию по принципу прямой связи генов *gap* в задней части эмбриона под действием терминального гена *tll*.

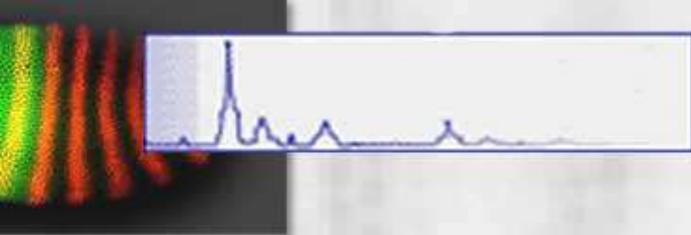
Эта топология является внутренне непротиворечивой, достаточной для объяснения наблюдаемых картин экспрессии генов *gap* и, в целом, согласуется с литературными данными.

- Подтверждена гипотеза о том, что в будущей зародышевой полоске области распределения концентраций мРНК *Kr*, *kni*, *gt* и *hb* асимметричны относительно областей распределения концентраций соответствующих белков и сдвинуты относительно последних в направлении к переднему полюсу эмбриона.



Выводы (продолжение)

- Показано, что численное моделирование позволяет сопоставить группу генных взаимодействий со специфичным регуляторным процессом: сдвиги границ экспрессии генов *gap* происходят из-за асимметричности регуляторных взаимодействий между этими генами, при которых ген, область экспрессии которого расположена ближе к заднему концу эмбриона, репрессирует ген с перекрывающейся областью экспрессии, но расположенной ближе к переднему концу. Эти сдвиги не зависят от действия материнских градиентов и диффузии продуктов генов *gap* между ядрами.
- Создана база данных FlyEx (<http://urchin.spbcas.ru>; <http://flyex.ams.sunysb.edu/flyex>), являющаяся пространственно-временным атласом экспрессии генов сегментации. База предоставляет пользователю информацию о динамике формирования областей экспрессии генов сегментации и позволяет произвести получение любых объемов данных по запросу.



Список публикаций по теме диссертации

45 публикаций: 23 – в реферируемых журналах, 5 – в главах книг, 17 – в трудах конференций.

1. Surkova, S., Kosman, D., Kozlov, K., Manu, Myasnikova, E., Samsonova, A., Spirov, A., Vanario-Alonso, C.-E., Samsonova, M., Reinitz, J. Characterization of the *Drosophila* segment determination morphome (2007) *Dev. Biol.*, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.10.037.
2. Myasnikova, E., Samsonova, M., Kosman, D., Reinitz, J. (2005). Removal of background signal from *in situ* data on the expression of segmentation genes in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.*, 215(6), 320-326.
3. Jaeger, J., Surkova, S., Blagov, M., Janssens, H., Kosman, D., Kozlov, K.N., Manu, Myasnikova, E., Vanario-Alonso, C.-E., Samsonova, M., Sharp, D.H., Reinitz, J. (2004). Dynamic control of positional information in the early *Drosophila* embryo. *Nature*, 430, 368-371.
4. Jaeger, J., Blagov, M., Kosman, D., Kozlov, K.N., Manu, Myasnikova, E., Surkova, S., Vanario-Alonso, C.-E., Samsonova, M., Sharp, D.H., Reinitz, J. (2004). Dynamical analysis of regulatory interactions in the gap gene system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167, 1721-1737.
5. Poustelnikova, E., Pisarev, A., Blagov, M., Samsonova, M., Reinitz, J. (2004). A database for management of gene expression data *in situ*. *Bioinformatics*, 20, 14, 2212-2221.

Аннотации 42 докладов на международных конференциях в список не включены.