

Савина Мария Сергеевна

**КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ  
РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АУКСИНА В АПИКАЛЬНОЙ  
МЕРИСТЕМЕ КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA* С  
УЧЕТОМ АНАТОМИИ КОРНЕВОГО ЧЕХЛИКА И  
НАРУШЕНИЙ В ЕГО СТРУКТУРЕ**

03.01.09 Математическая биология,  
биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в секторе системной биологии морфогенеза растений, г. Новосибирск, Россия

**Научный                    Миронова Виктория Владимировна**

**руководитель** к.б.н., зав. сектором системной биологии морфогенеза растений ФГБНУ ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»

**Официальные        Пальянов Андрей Юрьевич**

**оппоненты** к.ф.-м.н., Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт систем информатики им. А.П. Ершова Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

**Медведев Сергей Семенович**

д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии и биохимии растений, зав. лаб. биологии развития растений Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург.

**Ведущее                    Институт прикладной математики и механики Федерального**  
**учреждение:** государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (ФГАОУ ВО «СПбПУ»), г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» в конференц-зале Института по адресу: пр. ак. Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090, тел +7 (383) 3634906, факс +7(383) 3331278. e-mail: [dissov@bionet.nsc.ru](mailto:dissov@bionet.nsc.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: [www.bionet.nsc.ru](http://www.bionet.nsc.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,

д.б.н. Хлебодарова Т.М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Функционирование организма требует поддержания ниш стволовых клеток в течение всего жизненного цикла. Апикальная меристема корня *Arabidopsis thaliana* L. является одним из наиболее удобных объектов для изучения процессов самоорганизации и поддержания ниши стволовых клеток, в силу своей простой геометрии.

Важную роль в защите и поддержании ниши стволовых клеток выполняет корневой чехлик, расположенный на кончике корня (Иванов, 1987). Корневой чехлик реагирует на изменение условий окружающей среды по мере роста корня растения, выполняя защитную, секреторную и сигнальную функции, в том числе участвует в таких процессах, как гравитационный и фототропизм, закладка боковых корней (Иванов, 1987; Barlow, 2002; Driouch et al., 2013; Fendrych et al., 2014; Kumpf, Nowack, 2015; Xuan et al., 2016).

Одним из основных регуляторов поддержания ниши стволовых клеток является ген *WOX5*, который экспрессируется в покоящемся центре (ПЦ), организационном центре ниши стволовых клеток апикальной меристемы корня (Haecker et al., 2004). Нарушения в работе этого гена (потеря функции или сверхэкспрессия) приводят к изменениям в структуре корневого чехлика и клеточной динамики (Sarkar et al., 2007, Pi et al., 2015).

Важную роль в процессе поддержания ниши стволовых клеток играет фитогормон ауксин. Поддержание высоких концентраций ауксина в центральной части корневого чехлика, колумелле и ПЦ, имеет важное значение для процессов морфогенеза в корне, функционирования апикальной меристемы, в целом, и ниши стволовых клеток, в частности (Vieten 2005; Liao, 2015). Именно поэтому основное внимание при изучении апикальной меристемы корня уделяется распределению ауксина в тканях корня.

Молекулярные и генетические процессы, лежащие в основе передачи сигнала и транспорта ауксина, являются нелинейными и содержат петли обратной связи, что определяет повышенную сложность системы распределения этого фитогормона (Goh et al., 2014). Кроме того, до сих пор не существует достаточно точных методов, позволяющих отследить изменения в содержании ауксина на клеточном уровне (Sabatini et al., 1999; Brunoud et al., 2012; Vand L., 2014; Liao et al., 2015). Изменения в распределении ауксина имеют определяющее значение в регуляции

морфогенетических процессов, поскольку в зависимости от концентрации ауксин по-разному влияет на процессы роста, деления и дифференцировки клеток (Campanoni and Nick, 2005). Так как процессы развития под влиянием ауксина необходимо исследовать в динамике и в пространстве, их изучение требует привлечения методов математического моделирования.

На данный момент существует несколько математических моделей, описывающих процессы поддержания ниши стволовых клеток в меристеме корня под действием ауксина (Grieneisen et al., 2007; Kramer et al., 2008; Muraro et al., 2013; Grieneisen et al., 2012), в том числе, выполненных в Институте Цитологии и Генетики СО РАН (Likhoshvai et al., 2007; Mironova et al., 2010; Mironova et al., 2012; Pasternak et al., 2019). Но только группа моделей, разработанная в ИЦиГ СО РАН, приспособлена к исследованию процессов самоорганизации ниш стволовых клеток, поскольку учитывает ауксин-зависимую регуляцию экспрессии белков семейства PIN.

Несмотря на то, что уже были созданы математические модели распределения ауксина в клеточном ансамбле, воспроизводящем анатомическое строение корня (Muraro et al., 2013; Grieneisen et al., 2012), влияние структуры корневого чехлика, а также аномалий в его развитии, на распределение ауксина в нише стволовых клеток апикальной меристемы корня *A. thaliana* подробно не исследовалось.

### **Цели и задачи диссертационной работы**

Целью работы является исследование роли корневого чехлика в поддержании ниши стволовых клеток апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana* с помощью методов компьютерного моделирования.

Для достижения цели был поставлен и решён ряд задач:

1) Разработка компьютерных моделей распределения ауксина в апикальной меристеме корня *Arabidopsis thaliana* с различной степенью детализации исследуемых процессов: двумерная модель с прямоугольным клеточным ансамблем, гибридная одномерная модель с ростом и делением клеток, двумерная модель с реалистичным клеточным ансамблем.

2) Проведение численных экспериментов по исследованию распределения ауксина в апикальной меристеме корня *Arabidopsis thaliana*:

а) при аномальном развитии колумеллы под воздействием низких положительных температур.

б) при аномальном развитии корневого чехлика в растениях со сверхэкспрессией гена *WOX5* и в мутанте с потерей функции этого гена.

в) с учетом анатомических особенностей строения корневого чехлика в корне *Arabidopsis thaliana*.

### **Научная новизна работы**

Впервые описан механизм адаптации апикальной меристемы корня *A. thaliana* к воздействию низких положительных температур, который заключается в селективной индуцированной холодом гибели дочерних клеток инициалей колумеллы, что, в свою очередь, приводит к восстановлению максимума концентрации ауксина в покоем центре и способствует защите ниши стволовых клеток. Данный механизм был назван «Жертва ради спасения».

Впервые была создана гибридная компьютерная модель, описывающая процессы развития колумеллы корня *A. thaliana* в динамике для исследования роли ауксина в регуляции ниши стволовых клеток. С помощью модели показано, что основной функцией *WOX5* является регуляция *TAA1*-зависимого синтеза ауксина в нише стволовых клеток. Нарушения экспрессии гена *WOX5* приводят к фенотипическим аномалиям корневого чехлика и меристемы корня, через изменение уровня *TAA1*-зависимого синтеза ауксина.

Впервые была разработана программа «Создание двумерных моделей тканей растений» (PlantLayout) для конструирования структурной модели двумерного среза тканей растения, готовой к внедрению в математические и компьютерные модели в полуавтоматическом режиме.

Впервые была построена компьютерная модель распределения ауксина в корне растения с реалистичной клеточной структурой, учитывающая регуляцию ауксином своих белков-транспортеров семейства PIN. С помощью этой модели впервые были выявлены механизмы формирования билатеральной асимметрии в меристеме корня, естественно возникающей в развитии корня, в следствие делений клеток в корневом чехлике.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Разработанные подходы к проведению численных экспериментов и созданная серия компьютерных математических моделей, могут быть адаптированы для решения других исследовательских задач. Например, разработанный подход к моделированию учета воздействия холода на распределение ауксина, может успешно применяться для исследования распределения ауксина при воздействии других факторов окружающей среды или обработки корней растений различными биологически активными

веществами. Программное средство «PlantLayout» может с успехом использоваться при создании математических моделей корней растений мутантных и трансгенных линий с известными аномалиями в анатомической структуре, а также моделей других органов и тканей, для которых характерно явление полярного активного транспорта.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Гибель дочерних клеток инициалей колумеллы корня, наблюдаемая у *Arabidopsis thaliana* после суток выращивания при низких положительных температурах (4°C), является частью защитного адаптивного механизма, позволяющего сохранить нишу стволовых клеток при неблагоприятных условиях среды.

2. Важной ролью гена *WOX5* для поддержания ниши стволовых клеток меристемы корня *Arabidopsis thaliana* является активация и поддержание *ТАА1*-зависимого синтеза ауксина.

### **Апробация работы**

Материалы работы вошли в отчёты по грантам Президента Российской Федерации (МК-1297.2017.4, руководитель Миронова В.В.), Российского Научного Фонда (№ 14-14-00734, руководитель Афонников Д.А.; №17-74-10102, руководитель Коврижных В.В.) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№18-34-00485 мол\_а, руководитель Савина М.С.).

Результаты исследования были представлены в виде устных и стендовых докладов на 9 российских и зарубежных научных конференциях: XXIII международной конференции "Математика. Компьютер. Образование" (2016, г. Дубна), Восьмой Международной Школе молодых ученых «Системная биология и Биоинформатика» (2016, г. Новосибирск), Международной конференции «Математическое моделирование и высокопроизводительные вычисления в биоинформатике, биомедицине и биотехнологии» (2016, г. Новосибирск), International Symposium “Auxins and Cytokinins in Plant Development and Interactions with Other Phytohormones” (2018, г. Прага, Чехия), 11-ой Международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (2018, г.Новосибирск), First international Plant Systems Biology meeting (2018, г. Роскоф, Франция), Plant Organ Growth Symposium (2019, г. Бордо, Франция), VII съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (2019, г. Санкт-Петербург), 5-ой Международной научной конференции «Генетика, геномика,

биоинформатика и биотехнология растений (PlantGen2019)» (2019, г. Новосибирск).

### **Объём и структура диссертации**

Материал диссертационного исследования изложен на 153 страницах, содержит 40 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 182 российских и зарубежных источников. Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, описания результатов работы в трех главах, заключения, выводов, списка литературных источников.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 2 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы цитирования WOS и Scopus, и 9 тезисов конференций. Получено одно авторское свидетельство.

### **Личный вклад автора**

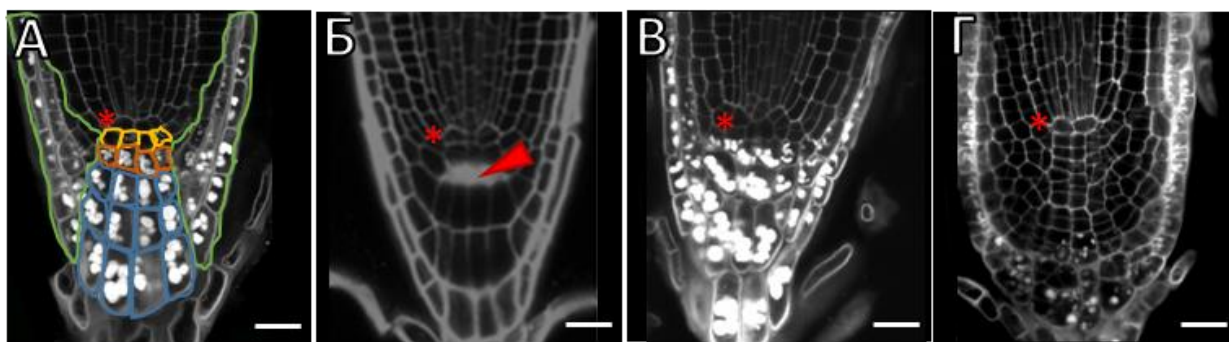
Основные результаты работы получены автором самостоятельно. Автором разработаны и реализованы три различные компьютерные математические модели распределения ауксина в программе MatLab, проведен анализ результатов численных экспериментов и литературных данных, сформулированы предсказания модели и проведен анализ экспериментов по верификации полученных предсказаний. Автором разработана программа PlantLayout на языке MatLab для создания двумерных структурных моделей тканей растений.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Обзор литературы**

Обзор литературы состоит из девяти разделов и аналитического заключения. Первые два раздела посвящены описанию строения корня *A. thaliana* в целом и апикальной меристемы в частности. Раздел 1.3 содержит описание строения и функций корневого чехлика *A. thaliana* (Рис. 1А). Следующий раздел посвящен описанию особенностей экспрессии гена *WOX5*, основного регулятора поддержания ниши ствольных клеток в апикальной меристеме корня *A. thaliana*. Разделы 1.5-1.7 содержат описание особенностей распределения и транспорта фитогормона ауксина в норме и при воздействии внешних стимулов. Рассмотрению методов моделирования молекулярно-генетических процессов посвящен раздел 1.8. В последнем разделе описаны

различные математические модели, использованные для исследований в биологии развития растений.



**Рис. 1.** Структура корневого чехлика в норме и нарушения в его структуре. Красной звездочкой обозначено положение покоящегося центра. Клеточные стенки и гранулы крахмала окрашены пропидиум-йодидом (PI, белый) (А, В, Г). Шкала 20 мкм. Экспериментальные данные предоставлены в ходе совместных исследований: Тарасом Пастернаком, Университет Фрайбурга, Германия (А, В, Г) и Чен Ксу, Национальный Университет Сингапура (Б). **А.** Структура корневого чехлика в диком типе (Col-0). Клетки корневого чехлика разных типов выделены контурами разного цвета. Зеленым выделен боковой корневой чехлик, желтым – инициалы колумеллы, оранжевым – дочерние клетки инициалей колумеллы, синим – дифференцированные клетки колумеллы. **Б.** Повреждение колумеллы, вызванное действием холодового стресса после 24 ч при 4°C. Красной стрелкой обозначены погибшие дочерние клетки инициалей колумеллы. **В.** Структура корневого чехлика в корне мутанта *wox5-1*. **Г.** Структура корневого чехлика в корне растений линии *35S::WOX5-GR* со сверхэкспрессией гена *WOX5*.

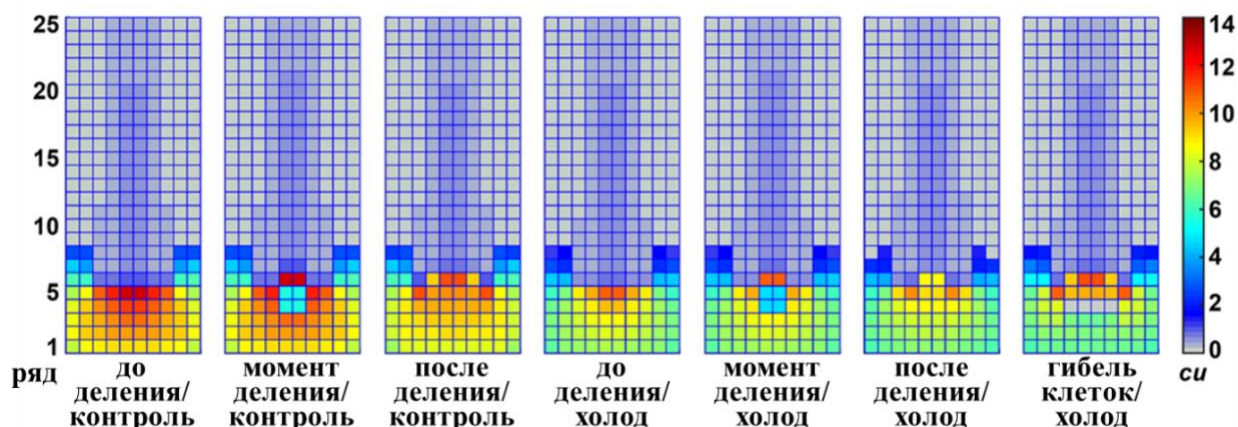
## **Глава 2. Моделирование воздействия пониженных температур на морфологию колумеллы и распределение ауксина в корне *Arabidopsis thaliana* с использованием прямоугольного клеточного ансамбля**

Раздел 2.1 посвящен описанию экспериментальных данных о влиянии низких положительных температур на анатомию и морфологию корневого чехлика *Arabidopsis thaliana*, а также на экспрессию белков переносчиков ауксина семейства PIN. Раздел 2.2 содержит описание математической модели распределения ауксина в апикальной меристеме корня *Arabidopsis thaliana* с прямоугольным клеточным ансамблем. Следующий раздел посвящен описанию оптимизации параметров математической модели. Разделы 2.4 и 2.5 содержат описание результатов математического моделирования и экспериментальной верификации полученных предсказаний. Заканчивается глава 2 разделом 2.6, в котором изложены основные выводы по данной главе.

В экспериментах по воздействию низких положительных температур (4°C, 12 – 72 часа, далее воздействие холода), проведенных в Национальном



Университете в Сингапуре под руководством профессора Чен Ксу, наравне с изменениями в экспрессии белков семейства PIN, наблюдалась индуцированная холодом гибель вновь образованных в результате деления дочерних клеток инициалей колумеллы, центральной части корневого чехлика (Рис. 1Б).



**Рис. 2.** Моделирование воздействия низких положительных температур на распределение ауксина в апикальной меристеме корня *A. thaliana*. Клеточный ансамбль, рассмотренный в модели, имитирует продольный срез кончика корня. Слева направо: Распределение ауксина в корне в контроле до деления инициалей колумеллы, в момент деления и после деления, распределение ауксина в корне после воздействия холода до деления инициалей колумеллы, в момент деления, после деления и после гибели клеток дочерних клеток инициалей колумеллы. Две центральные клетки в пятом ряду (до деления) и в шестом ряду (после деления) представляют покоящийся центр, а две центральные клетки в четвертом ряду (до деления) и в пятом ряду (после деления) представляют инициали колумеллы до деления. После деления четыре центральные клетки в четвертом ряду представляют дочерние клетки инициалей колумеллы.

Для анализа распределения ауксина в апикальной меристеме корня *Arabidopsis thaliana* в условиях воздействия холода была модифицирована опубликованная ранее математическая модель распределения ауксина (Mironova et al., 2012). В результате проведенного *in silico* эксперимента было показано, что деление инициалей колумеллы под воздействием холода в отличие от контрольных условий приводит к потере максимума концентрации ауксина в покоящемся центре в модели (Рис. 2), что может свидетельствовать о том, что при воздействии холода покоящийся центр может потерять свою идентичность. В результате этого сохранение ниши стволовых клеток находится под угрозой, поскольку поддержание максимума ауксина в покоящемся центра необходимо для нормального функционирования ниши стволовых клеток. При этом после гибели дочерних клеток инициалей колумеллы максимум концентрации ауксина в покоящемся центре

восстанавливается (Рис. 2). Таким образом, результаты компьютерного моделирования показывают, что гибель дочерних клеток инициалей колумеллы является защитным механизмом, оберегающим нишу ствольных клеток от воздействия холода. При этом расчетная концентрация ауксина в покоящемся центре после гибели дочерних клеток инициалей колумеллы была выше, чем в контрольных корнях после деления, что может свидетельствовать о дополнительных адаптивных преимуществах корней, в которых наблюдалась селективная клеточная гибель.

Все предсказания модели были подтверждены экспериментально в лаборатории профессора Чен Ксу. Так в эксперименте наблюдалось значимое повышение частоты делений и количества событий клеточной гибели в нише ствольных клеток после холодового стресса в тех корнях, где не наблюдалось гибели дочерних клеток инициалей колумеллы, по сравнению с корнями, где событие клеточной гибели имело место. В то же время в корнях без гибели клеток в колумелле снижалась экспрессия гена *WOX5*, основного регулятора поддержания ниши ствольных клеток, по сравнению с корнями, в которых гибель дочерних клеток инициалей колумеллы имела место. Описанное выше доказывает, что наблюдаемое индуцированное холодом событие гибели клеток в колумелле защищает нишу ствольных клеток.

Наравне с этим, в экспериментах было показано, что корни с гибелью дочерних клеток инициалей колумеллы быстрее росли после холодового стресса, перенесенного повторно, по сравнению с корнями, в которых подобные повреждения не наблюдались. Также было показано, что корни с гибелью клеток в колумелле лучше переносят условия имитации другого стресса, засухи (обработка 20% PEG-6000). Именно, в таких корнях наблюдалось значительно меньшее количество событий клеточной гибели в зоне элонгации в результате обработки, имитирующей засуху, по сравнению с корнями, в которых описанная гибель клеток не наблюдалась.

В результате верификации предсказаний модели был предложен механизм адаптации растений к действию низких положительных температур под названием «Жертва ради спасения» (Hong et al., 2017). Холодовой стресс вызывает специфические повреждения ДНК в нише ствольных клеток корня. Деление инициалей колумеллы с поврежденной ДНК, приводят к гибели их дочерних клеток. Погибшие клетки служат механическим барьером для транспорта ауксина и позволяют поддержать максимум концентрации ауксина в покоящемся центре, сохранить целостность всей ниши ствольных

клеток. Как результат, это дает адаптивные преимущества при последующих стрессовых воздействиях.

### Глава 3. Моделирование нарушений в структуре колумеллы при сверхэкспрессии и потере функции гена *WOX5*

Раздел 3.1 посвящен описанию экспериментальных данных о влиянии аномалий в экспрессии гена *WOX5* на анатомию корневого чехлика *A. thaliana* (Рис. 1В,Г), распределение ауксина и паттерн экспрессии фермента биосинтеза ауксина ТАА1. В разделе 3.2 описаны результаты моделирования распределения ауксина при сверхэкспрессии и потере функции гена *WOX5* для двумерной модели с прямоугольным клеточным ансамблем. Раздел 3.3 содержит описание одномерной компьютерной модели колумеллы корня *A. thaliana* с ростом, делением и сращиванием клеток. Следующие два раздела посвящены описанию генерации начальных данных и оптимизации параметров для одномерной модели. Разделы 3.7 и 3.8 содержат экспериментальную верификацию предсказаний модели и выводы по главе 3, соответственно.

С использованием адаптированной компьютерной модели распределения ауксина в апикальной меристеме корня *A. thaliana* с прямоугольным клеточным ансамблем, а также одномерной гибридной компьютерной модели колумеллы с ростом и делением клеток (уравнение 1) были исследованы механизмы аномального развития колумеллы при нарушениях в экспрессии гена *WOX5* (сверхэкспрессии в трансгенной линии *35S::WOX5-GR* и потери функции при нокаутной мутации *wox5-1*). В моделях доказана непротиворечивость и достаточность гипотезы о генетической регуляции геном *WOX5* экспрессии фермента биосинтеза ауксина ТАА1 для воспроизведения наблюдаемой в эксперименте клеточной динамики в колумелле *A. thaliana* и изменений в паттернах экспрессии белков PIN1-4, PIN7 и репортера ауксина *DR5*.

$$\begin{cases} \frac{da_i}{dt} = \begin{cases} (k_\alpha + k_s + k_{TAA} * TAA_1 - k_d a_1 - T_{pas_{out,1}} - T_{act_{out,1}} + T_{pas_{in,1}} + T_{act_{in,1}} - a_1 * \frac{dL_1}{dt}) / L_1 \\ (k_s + k_{TAA} * TAA_i - k_d a_i - T_{pas_{out,i}} - T_{act_{out,i}} + T_{pas_{in,i}} + T_{act_{in,i}} - a_i * \frac{dL_i}{dt}) / L_i, \text{ for } i = 2, \dots, n \end{cases} \\ \frac{dTAA_i}{dt} = \left( K_s * \frac{\left(\frac{a_i}{z_1}\right)^h}{1 + \left(\frac{a_i}{z_2}\right)^h} - K_d * TAA_i - L_i * \frac{dL_i}{dt} \right) / L_i \\ \frac{dL_i}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ if } a_i > s_{QC} \text{ and } L_i \geq 1 \\ \frac{(L_{max} - L_i)}{a_i} * K_{grow}, \text{ else} \end{cases} \end{cases}, (1)$$

где  $a_i$  – концентрация ауксина в клетке под номером  $i$ ,  $TAA_i$  – концентрация белка ТАА1 в клетке под номером  $i$ ,  $k_\alpha$  – интенсивность потока ауксина из верхней части корня,  $k_s$  – константа скорости базального синтеза ауксина,  $k_{TAA}$  – константа

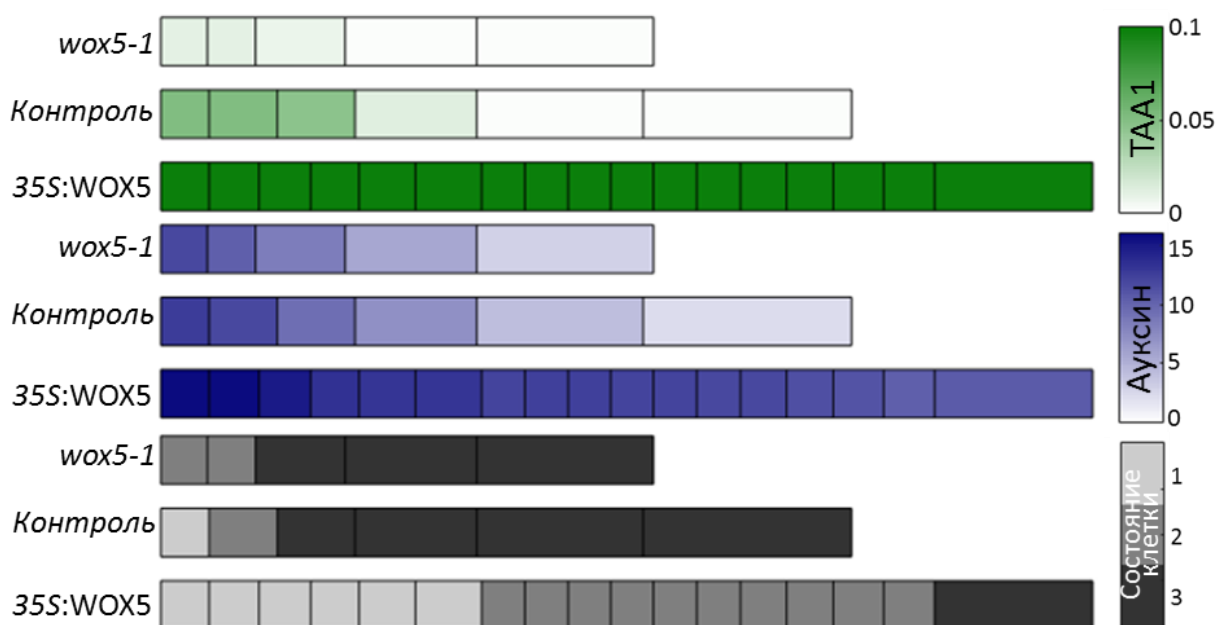
скорости ТАА1-зависимого биосинтеза ауксина,  $k_d$  – константа скорости деградации ауксина,  $Tras_{out,i}$  – функция, описывающая пассивный транспорт ауксина из клетки под номером  $i$ ,  $Tact_{out,i}$  – функция, описывающая активный транспорт ауксина из клетки под номером  $i$ ,  $Tras_{in,i}$  – функция, описывающая пассивный транспорт ауксина в клетку под номером  $i$ ,  $Tact_{in,i}$  – функция, описывающая активный транспорт ауксина в клетку под номером  $i$ ,  $K_s$  – константа скорости синтеза белка ТАА1,  $K_d$  – константа скорости деградации белка ТАА1,  $z_1$  – порог активации ауксин-зависимого синтеза белка ТАА1;  $z_2$  – порог насыщения ауксин-зависимого синтеза белка ТАА1;  $h$  – коэффициент Хилла, который определяет степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина  $a_i$  на скорость синтеза белка ТАА1,  $L_i$  – длина клетки под номером  $i$ ,  $L_{max}$  – максимально допустимый размер клетки,  $K_{grow}$  – константа скорости роста,  $s_{QC}$  – порог на рост клетки.

В результате расчета динамической одномерной модели в случае контроля наблюдался баланс между делением и сращиванием клеток так, что число клеток оставалось постоянным (шесть клеток), и как только клетка, соответствующая инициали колумеллы делилась, то через один-два шага происходило сращивание последней дифференцированной клетки. На протяжении всего времени расчета первая клетка находилась в состоянии покоя, что соответствует покоящемуся центру, вторая клетка находилась в стволовом состоянии, что соответствует инициали колумеллы, остальные клетки клеточного ансамбля находились преимущественно в дифференцированном состоянии (Рис. 1А, 3).

В результате расчета динамической одномерной модели для нокаутной мутации *wox5-1* в среднем наблюдалось уменьшение длины клеточного ансамбля на 1 клетку. Вторая клетка клеточного ансамбля, соответствующая в контроле инициали колумеллы, могла находиться в дифференцированном состоянии, что совпадает с экспериментальными данными (Рис. 1В, 3). Домен экспрессии белка ТАА1 был меньше на одну клетку, по сравнению с контролем при одновременном снижении уровня экспрессии ТАА1, что воспроизводит экспериментальные данные. Одновременно с этим содержание ауксина в клеточном ансамбле лишь незначительно падает, что также соотносится с экспериментальными данными. Важно отметить, что первая клетка клеточного ансамбля, соответствующая покоящемуся центру, находилась в стволовом состоянии, вместо состояния покоя, и была способна к делению (Рис. 3). Таким образом, наша модель предсказала, что в мутанте *wox5-1* должны наблюдаться преждевременные/учащенные деления покоящегося центра. Подтверждение этого предсказания модели было

найден при анализе литературы (Forzani et al., 2014). Тем не менее для мутанта *wox5-1* в модели было характерно сохранение баланса между делением и отмиранием клеток, как и в случае контроля.

В результате расчета динамической одномерной модели для трансгенной линии *35S::WOX5-GR* наблюдалось значительное расширение домена экспрессии белка ТАА1 в течение времени расчёта, до размеров всей колумеллы на 1600 шаге (Рис. 3). В то же время концентрация ауксина в клеточном ансамбле очень сильно росла со временем. Стоит отметить, что в данной линии происходит нарушение баланса между делением и сдушиванием клеток колумеллы, то есть деления происходят гораздо чаще событий сдушивания последней дифференцированной клетки. В модели, как и в эксперименте, мы наблюдаем увеличение количества маленьких клеток (Рис. 1Г, 3). Так на 1600 шаге расчета остается лишь одна большая дифференцированная клетка. Однако, несмотря на большое количество мелких клеток, в стволовом состоянии находятся не все клетки, а лишь расположенные в дистальной части колумеллы. Согласно результатам моделирования, в проксимальной части колумеллы (со стороны покоящегося центра) образуется пул неделящихся клеток в состоянии покоя, причем, количество клеток в состоянии покоя увеличивается в течение времени расчёта.



**Рис. 3.** Сравнение результатов моделирования с использованием одномерной модели с ростом, делением и сдушиванием клеток колумеллы для контроля, *wox5-1* и *35S::WOX5-GR*. Экспрессия белка ТАА1 (зеленым), распределение ауксина (синим) и клеточных состояний (серым) показаны на 1600 шаге расчета модели. Состояния клетки: 1 – состояние

покоя (не способна делиться, не растет), 2 – створовое состояние (способна расти и делиться), 3 – дифференцированное состояние (способна только расти).

Для верификации предсказаний модели были проведены эксперименты в университете Фрайбурга в Германии нашим коллегой Тарасом Пастернаком. Из распределения событий репликации ДНК в линии *35S::WOX5-GR* видно, что после активации экспрессии гена *WOX5* дексаметазоном происходит расширение области, в которой не происходит событий репликации ДНК с течением времени в сравнении с контролем. Клетки, в которых не происходит репликация ДНК, соответствуют наблюдаемым в модели клеткам в состоянии покоя.

В результате проведенного эксперимента по обработке кинуренином, конкурентным ингибитором синтеза ауксина через TAA1, корней растений дикого типа и трансгенной линии *35S::WOX5-GR*, было показано подавление избыточной пролиферативной активности в колумелле и частичное восстановление фенотипа в линии *35S::WOX5-GR*. Проведенная экспериментальная работа подтверждает предсказания модели.

#### **Глава 4. Моделирование влияния особенностей строения корневого чехлика на распределения ауксина в меристеме корня *Arabidopsis thaliana* с использованием реалистичного клеточного ансамбля**

Раздел 4.1 посвящен описанию созданной нами программы PlantLayout для построения структурных компьютерных моделей двумерных срезов тканей растений на основании предобработанных экспериментальных изображений. Описание двумерной математической модели распределения ауксина и экспрессии белков транспортеров PIN1-4,7 в апикальной меристеме корня *A. thaliana* с использованием реалистичного клеточного ансамбля приводится в разделе 4.2. В следующем разделе описан процесс подбора и оптимизации параметров разработанной математической модели. Разделы 4.4 и 4.5 посвящены обсуждению результатов моделирования и варьированию по параметрам модели.

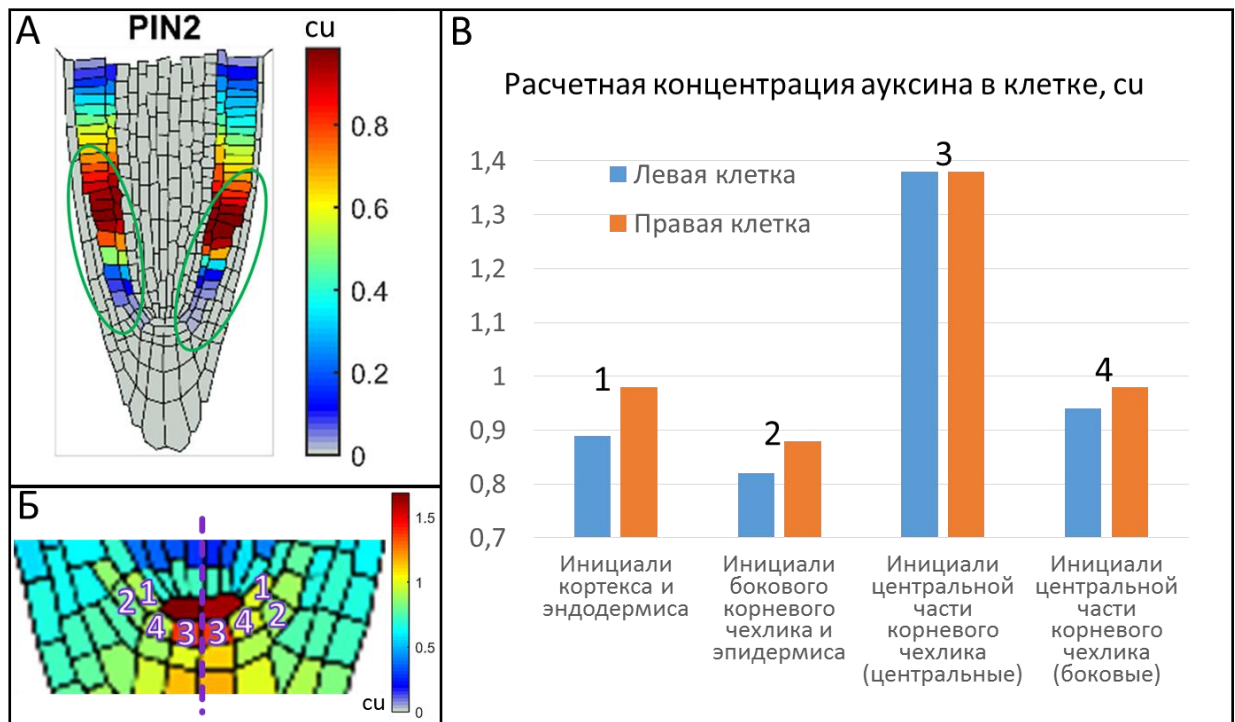
С использованием Matlab Image Processing Toolbox была разработана программа для ЭВМ «Создание двумерных моделей тканей растений (PlantLayout)» для построения двумерных структурных компьютерных моделей тканей растений. Программа PlantLayout позволяет получить количественные и качественные характеристики реалистичного клеточного ансамбля, такие как: размеры каждой клетки (объем и периметр клетки); размеры каждой клеточной стенки между любыми двумя соседними клетками

(длина и ширина); ориентацию клеточных стенок («верхняя», «нижняя», «правая», «левая») для каждой клетки, в полуавтоматическом режиме.

Двумерная математическая модель распределения ауксина и белков транспортеров семейства PIN с прямоугольным клеточным ансамблем была адаптирована для описания распределения ауксина в реалистичном клеточном ансамбле с учетом различий в линейных размерах клеток. В частности, в модель были добавлены такие параметры, как объем клетки, длина клеточной стенки между двумя соседними клетками. В данной модели впервые была описана экспрессия 5 белков-транспортеров семейства PIN (PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7). Общий вид уравнений, описывающих ауксин-зависимые синтез и деградацию PIN белков, был аналогичен модели с прямоугольным клеточным ансамблем.

Важным преимуществом разработанной математической модели распределения ауксина в реалистичном клеточном ансамбле служит формирование явно выраженных градиентов в распределении ауксина и белков транспортеров PIN 1-4,7, совпадающих с наблюдаемыми в экспериментах.

Впервые в моделях подобного типа нами была получена право-левая асимметрия в распределении белка PIN2 в меристеме корня (Рис. 4А). Причем асимметрия в распределении белка PIN2 хорошо соотносится с асимметрией строения бокового корневого чехлика. Асимметрия в распределении белка PIN2 приводит к формированию право-левой асимметрии в распределении ауксина, что может служить объяснением волнообразного характера роста корня *Arabidopsis thaliana* и характера закладки боковых корней. На основании наблюдаемой асимметрии в распределении ауксина в модели было предсказано, что деления разных типов инициалей могут происходить с различной частотой, при этом деления инициалей одного вида, расположенных на разных полюсах корня, могут происходить неодновременно (Рис. 4 Б,В). Оба предсказания были подтверждены экспериментально.



**Рис. 4.** Следствие естественной асимметрии строения апикальной меристемы корня *A. thaliana* на распределение ауксина. **А.** Право-левая асимметрия в распределении белка PIN2, полученная в модели. **Б.** Распределение ауксина в нише стволовых клеток апикальной меристемы, цифрами обозначены различные типы инициалей (соответствуют отраженным на рис. 4В). **В.** Расчетная концентрация ауксина в симметрично расположенных инициалах различных типов тканей корня.

## ВЫВОДЫ

1. Создана серия компьютерных математических моделей распределения ауксина в тканях корня *Arabidopsis thaliana* с различной степенью детализации: (1) с прямоугольным или реалистичным клеточным ансамблем; (2) статических или с ростом и делением клеток; (3) с различным числом PIN транспортеров.

2. Открыт механизм адаптации апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana* к действию низких положительных температур (4°C), при котором селективная гибель дочерних клеток инициалей колумеллы позволяет поддержать максимум концентрации ауксина в клетках покоящегося центра и сохранить целостность ниши стволовых клеток. Механизм дает адаптивные преимущества при последующих стрессовых воздействиях.

3. С помощью методов компьютерного моделирования показана достаточность WOX5-опосредованной регуляции TAA1-зависимого синтеза ауксина для воспроизведения клеточной динамики в корневом чехлике, характерной для дикого типа, *wox5-1* и *35S::WOX5-GR*.



4. Разработан пакет программ PlantLayout на языке MATLAB, который позволяет создавать двумерные компьютерные структурные модели тканей и органов растений, внедряет их в математические модели и упрощает проведение численного анализа полученных моделей.

5. С помощью компьютерного моделирования распределения ауксина в реалистичном клеточном ансамбле кончика корня *Arabidopsis thaliana*, полученном с помощью PlantLayout, показано наличие ярко выраженных асимметричных, относительно центральной оси корня, градиентов распределения ауксина. Эти градиенты могут обеспечивать волнообразный характер роста корня, асинхронность деления инициалей одного типа и различия в частоте делений инициалей разных типов.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

### ДИССЕРТАЦИИ:

#### Публикации в рецензируемых журналах:

1. Ощепкова, Е. А., Омельянчук, Н. А., **Савина, М. С.**, Пастернак, Т., Колчанов, Н. А., Землянская, Е. В. // Системно-биологический анализ гена *WOX5* и его функций в нише ствольных клеток корня // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Том 5 – № 4 – стр. 459-474.
2. Jing Han Hong, **Maria Savina**, Jing Du, Ajay Devendran, Karthikbabu Kannivadi Ramakanth, Xin Tian, Wei Shi Sim, Victoria V. Mironova, and Jian Xu // A Sacrifice-for-Survival Mechanism Protects Root Stem Cell Niche from Chilling Stress // Cell. – 2017. – Vol. 170. – p. 102-113.

#### Тезисы в сборниках конференций:

1. **Савина М.С.**, Казанцев Ф.В., Миронова В.В. // Моделирование воздействия холода на физиологическое распределение ауксина в корне *A. thaliana* // Материалы XXIII международной конференции "Математика. Компьютер. Образование", Дубна, Россия, 25-30 января, 2016, стр. 130.
2. **M.S. Savina**, F.V. Kazantsev, V.V. Mironova. // Mathematical modeling of active substanses and factors influence on functioning of plant root meristem // In proceedings of the eighth international young scientists school 'System Biology and Bioinformatics'. Novosibirsk, Russia, 22-25 August 2016, p. 65.
3. **M.S. Savina**, F.V. Kazantsev, V.V. Mironova. // Mathematical modeling of active substanses and factors influence on functioning of plant root meristem // In proceedings of the 2nd International Cnference 'Mathematical Modeling and

- High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology'. Novosibirsk, Russia, 29 August – 2 September 2016, p. 92.
4. **Maria Savina**, Jing Han Hong, Jian Xu, Victoria Mironova // Mathematical modeling of the effects of chilling stress on *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche // In proceedings of the International Symposium “Auxins and Cytokinins in Plant Development ... and Interactions with Other Phytohormones”. Prague, Czech Republic, 1–5 July 2018, p. 54.
  5. **M.S. Savina**, J.H. Hong, J. Xu, V.V. Mironova // Mathematical modeling of chilling stress induced changes in *Arabidopsis thaliana* root meristem // In proceedings of the Eleventh International Conference “BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE\systems biology”. Novosibirsk, Russia, 20-25 August 2018, p. 181.
  6. **Maria Savina**, Jing Han Hong, Jian Xu, Victoria Mironova // MATHEMATICAL MODELING OF CHILLING STRESS EFFECT ON THE PLANT ROOT MERISTEM // In proceedings of the first international Plant Systems Biology meeting. Roskoff, France, 10-14 September 2018, p. 24.
  7. **Savina M.S.**, Kazantsev F.V. and Mironova V.V. // What can we learn about stress-induced root growth by mathematical modeling of auxin distribution? // In proceedings of Plant Organ Growth Symposium 2019. Bordeaux, France, 24-26 April 2019, p. 23.
  8. **Савина М.С.**, Миронова В.В. // Моделирование распределения ауксина при регенерации меристемы корня *Arabidopsis thaliana* // Материалы VII съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Санкт-Петербург, Россия, 18-22 июня 2019, стр. 133.
  9. **Savina M.S.**, Lavrekha V.V., Pasternak T., Mironova V.V. // Systems biology study on the *WOX5* role in the distal part of the root meristem in *Arabidopsis thaliana* // In proceedings of the 5th International Scientific Conference “Plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology” (PlantGen2019). Novosibirsk, Russia, 24-29 June 2019, p. 175.

**Авторские свидетельства:**

**Савина М.С.**, Миронова В.В. Создание двумерных моделей тканей растений (PlantLayout), Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2018661009 от 30 июля 2018 года.