



Моделирование регуляции развития меристемы побега в эмбриогенезе *Arabidopsis thaliana* L.

Докладчик:

м.н.с. Акбердин И. Р.

Лаборатория теоретической генетики
Отдел системной биологии

Специальность:

03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

Научный руководитель:

д.б.н., доц. Лихошвай В. А.

Тема утверждена:

Учёный совет, протокол №11 от 07.05.08

Межлабораторный семинар, протокол №5 от 11.04.08

Объект исследования: *Arabidopsis thaliana*



Arabidopsis thaliana

Преимущества Арабидопсиса, как модельного организма:

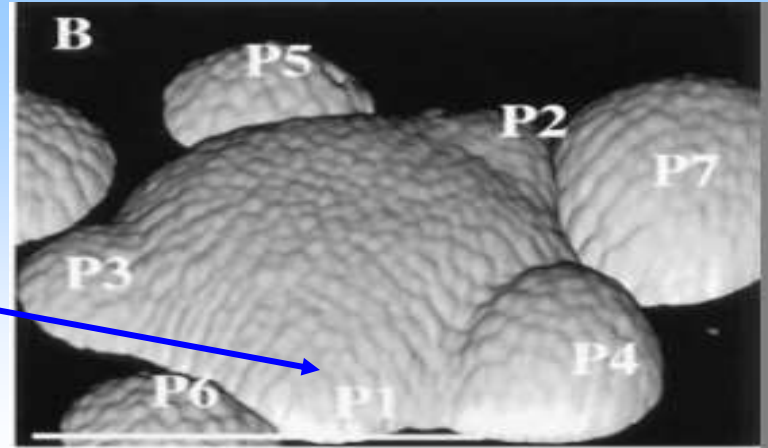
- 1) Один из самых маленьких известных геномов у высших растений (125 млн. пар оснований)
- 2) Всего 5 хромосом
- 3) Короткий жизненный цикл (~35 дней)
- 4) Большое количество семян (до 5000 на растение)
- 5) Неприхотлив, легко выращивается в лабораторных условиях, в том числе *in vitro*

***Arabidopsis* был первым растением, геном которого был полностью секвенирован. Существует программа, по которой к 2012 году планируется определить функции всех генов этого растения.**

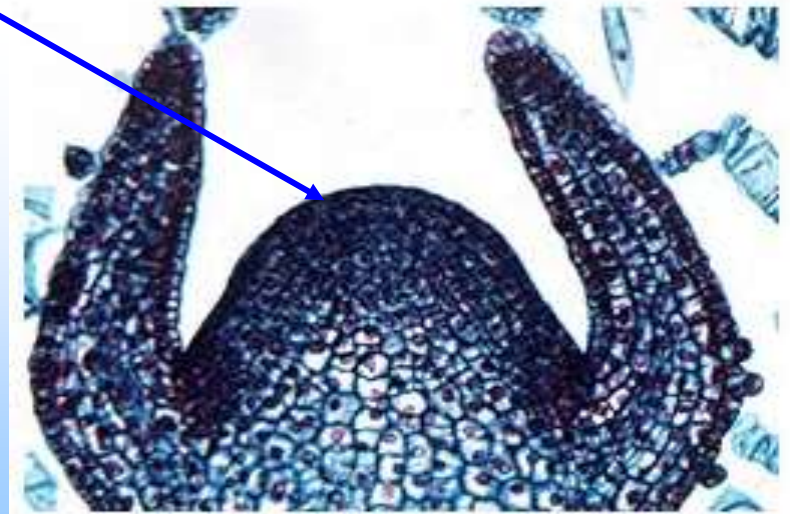
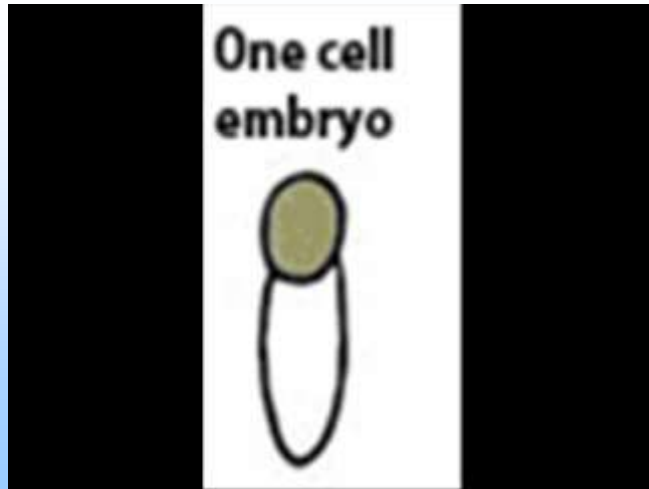


Новосибирск, 2009

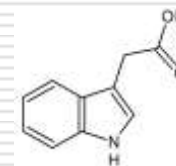
Меристема побега *Arabidopsis thaliana*:



Апикальная меристема побега (АМП)
с формирующимися листьями

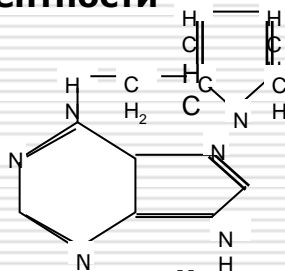


Основные гормоны, регулирующие рост и развитие растений:



1. **Ауксин** — основной гормон растений, который регулирует деление клеток и является фактором дифференцировки - Индолилуксусная кислота (ИУК или гетероауксин).
2. **Цитокинин** - растительный гормон, производный 6-аминопурина; Основной природный цитокинин - зеатин (его синтетический аналог - кинетин); отвечает за поддержание тотипотентности

6-фурфуриламинопурин



Сверхзадача информационной биологии в области исследований данного объекта: Разработка методов и компьютерного обеспечения, позволяющего воспроизвести развитие данного организма *in silico*



Цель и задачи исследования:

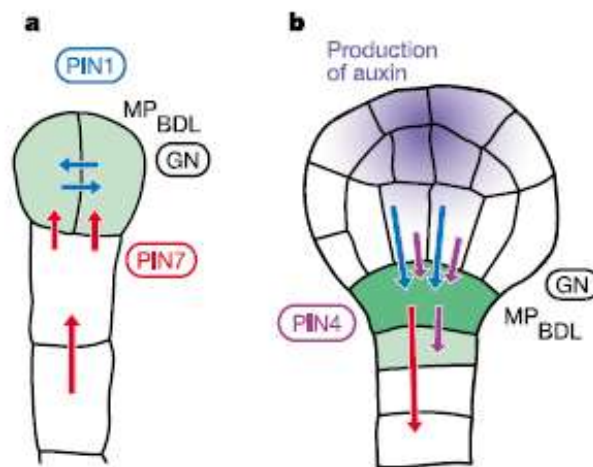
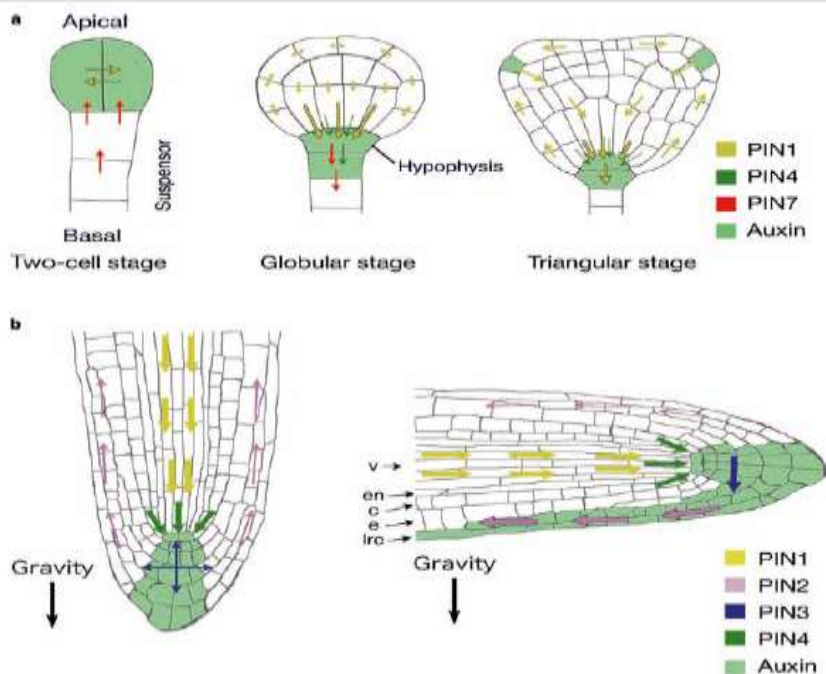
Цель:

Теоретическое изучение молекулярно-генетических механизмов метаболизма и транспорта фитогормонов, регулирующих рост и развитие апикальной меристемы побега *Arabidopsis thaliana*.

Задачи:

- Разработка компьютерной технологии конструирования математических моделей регуляторных контуров генных сетей;
- Реконструкция строения генной сети метаболизма ауксина – регулятора поддержания тотипотентности и дифференцировки клеток при развитии меристемы побега и разработка элементарных математических моделей ее подсистем;
- Разработка математической модели внутриклеточного метаболизма ауксина с учетом генетической регуляции;
- Разработка пространственно-распределённой модели развития меристемы побега, протекающего под контролем стволового и базального сигналов, а также сигнала дифференцировки;
- Проведение численных экспериментов с использованием разработанных моделей и биологическая интерпретация полученных результатов.

Накопление и транспорт ауксина:



Паттерны распределения и накопления ауксина в побеге и корне;

Зеленым обозначены места накопления ауксина

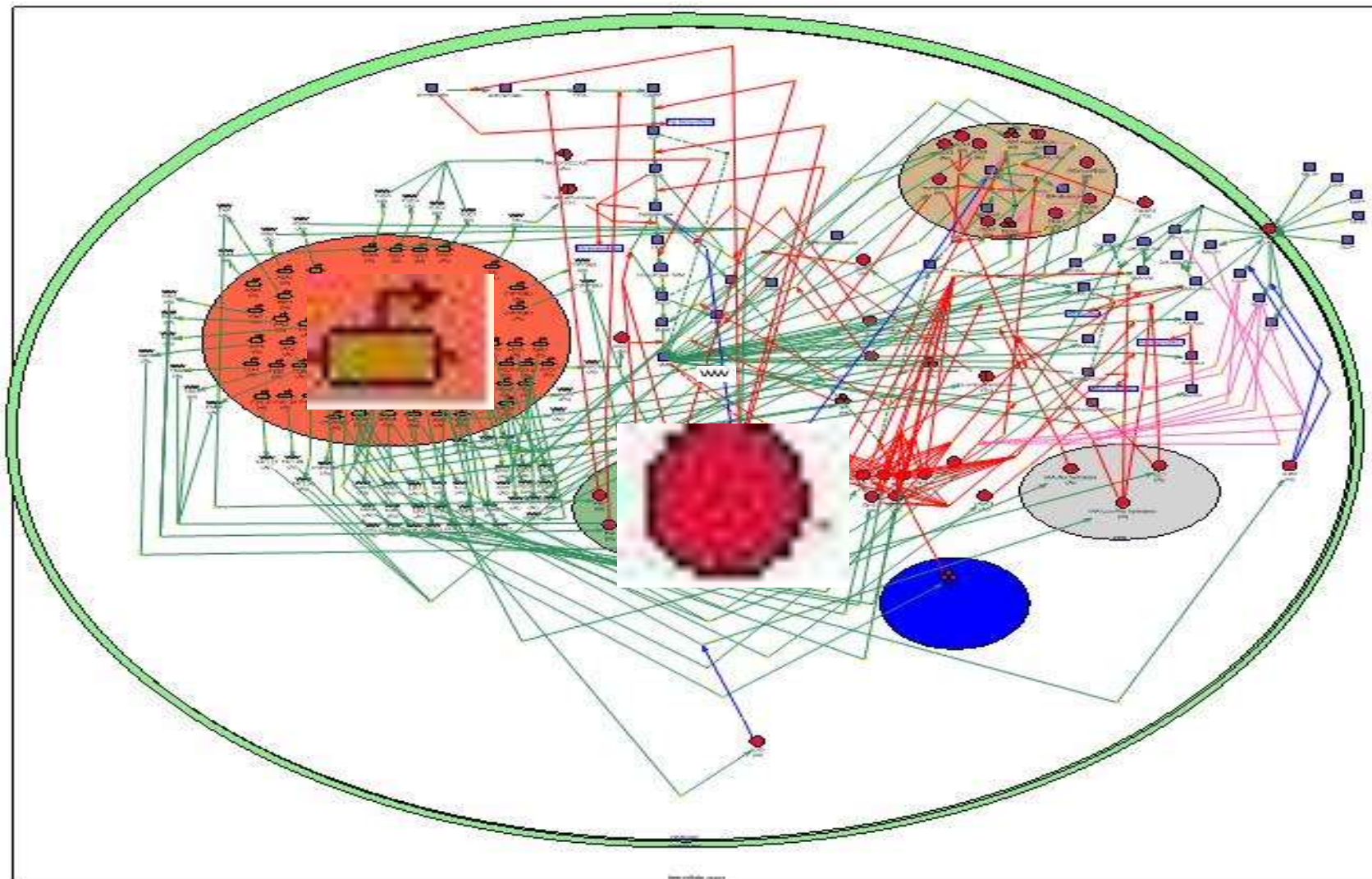
Модель роли ауксина в эмбриогенезе; Зеленым цветом обозначены места накопления ауксина и ауксинового ответа. Ауксин накапливается в проэмбрионе за счёт PIN7 системы, осуществляя спецификацию апикальную части растения; затем свободная форма ауксина начинает нарабатываться в апексе и транспортироваться обратно.

H. Tanaka et al., 2006

Friml et al., 2003

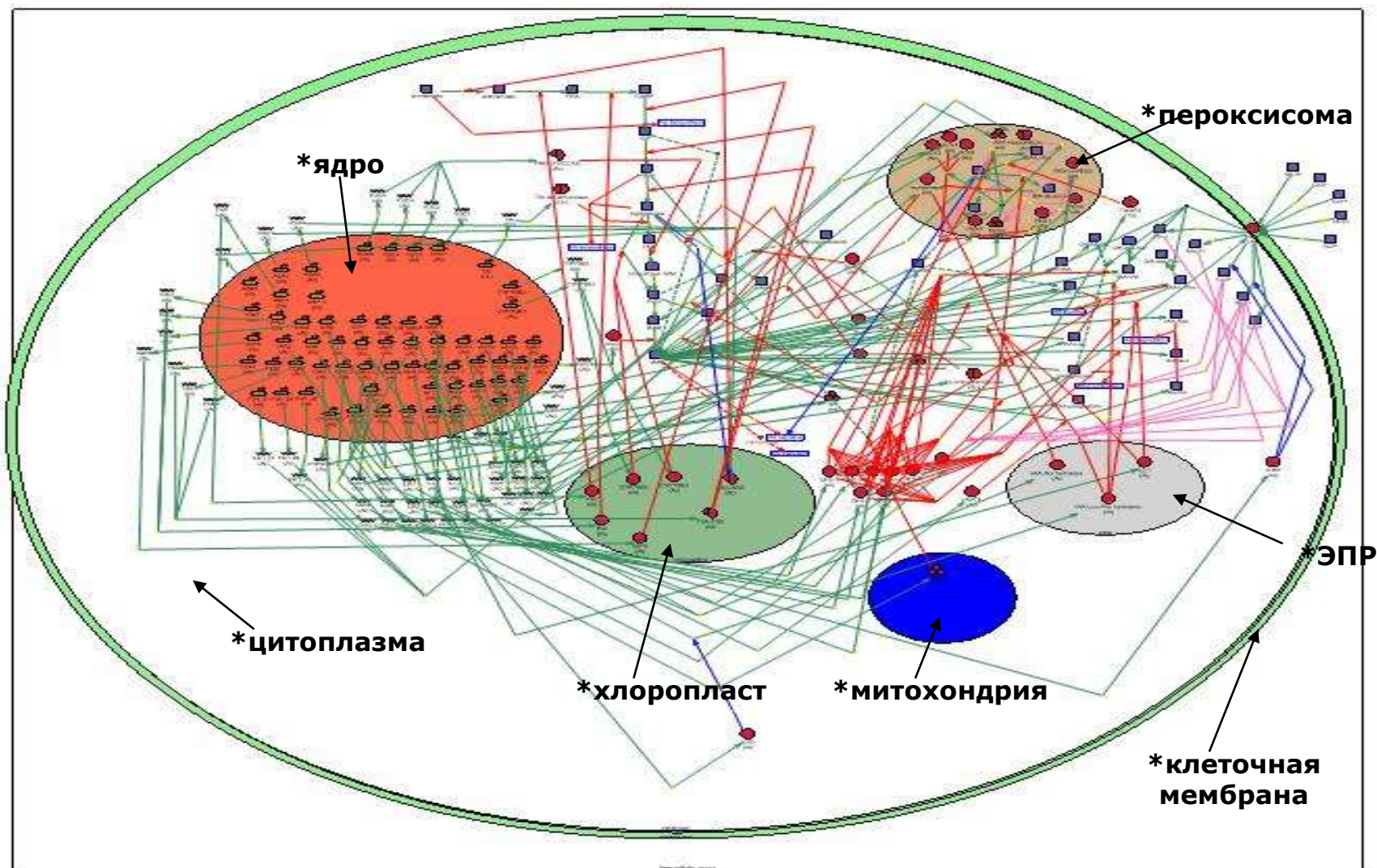
Новосибирск, 2009

Структурная модель генной сети метаболизма ауксина*:

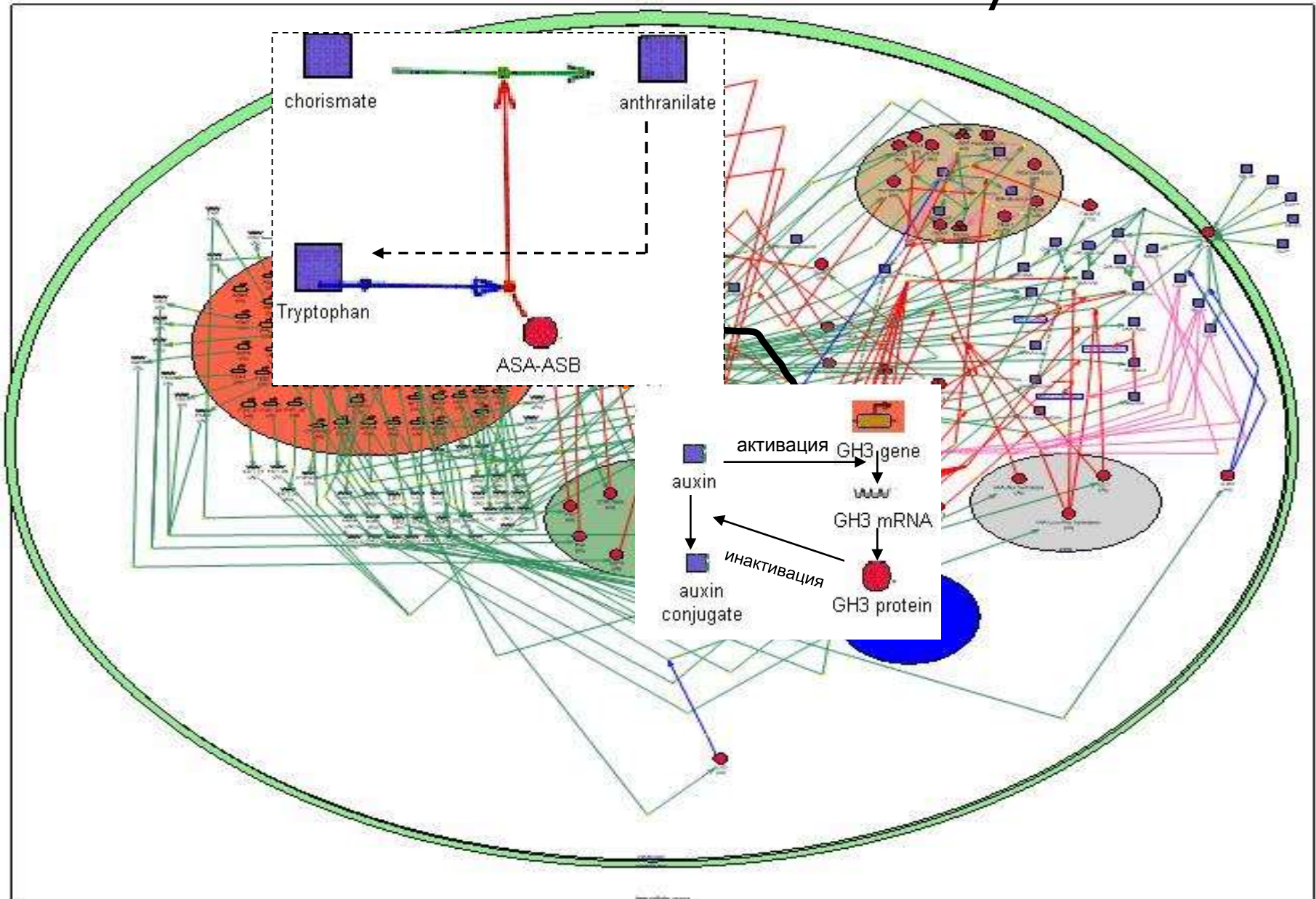


*-Ananko et al., 2005

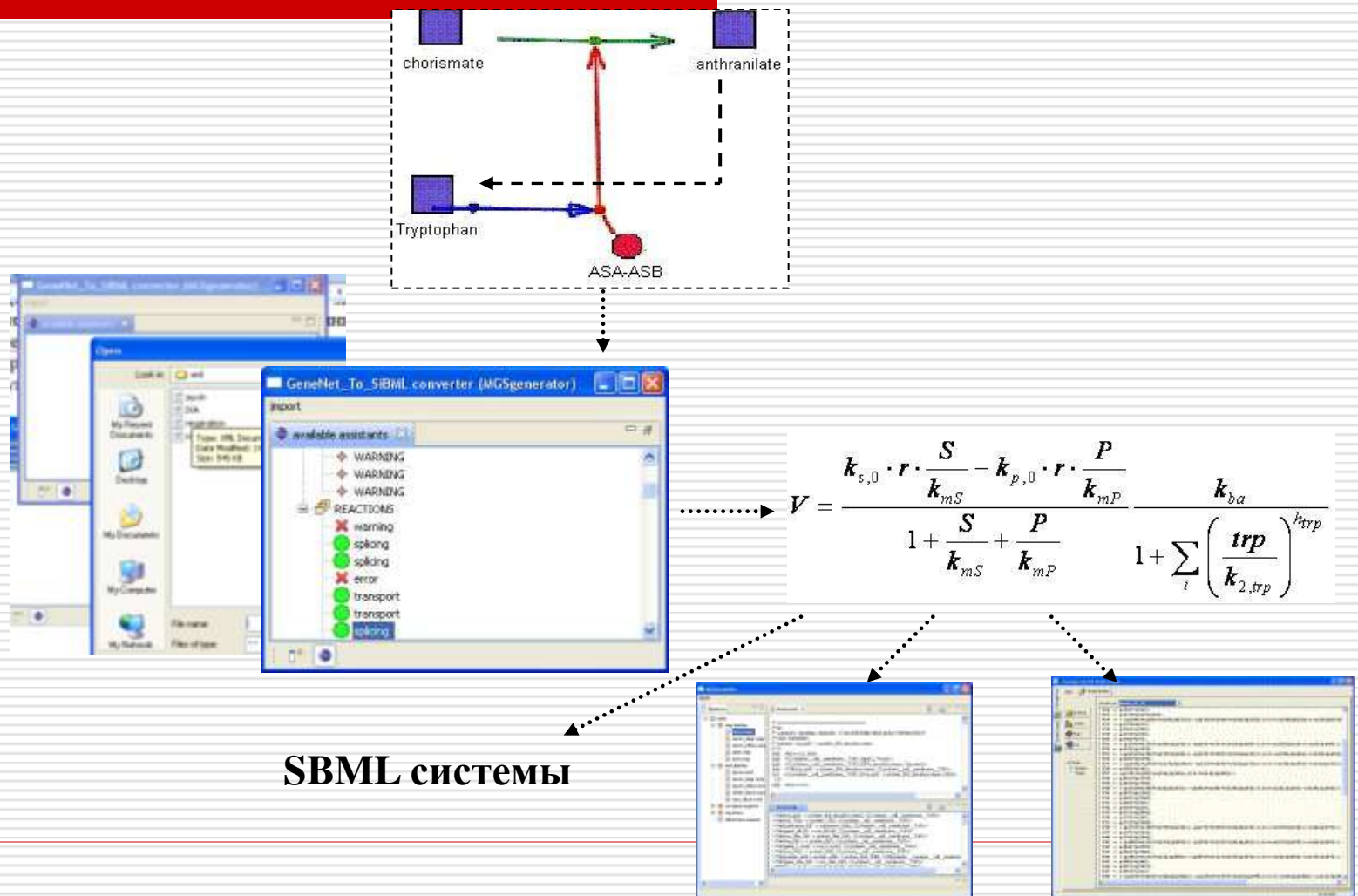
Структурная модель генной сети метаболизма ауксина:



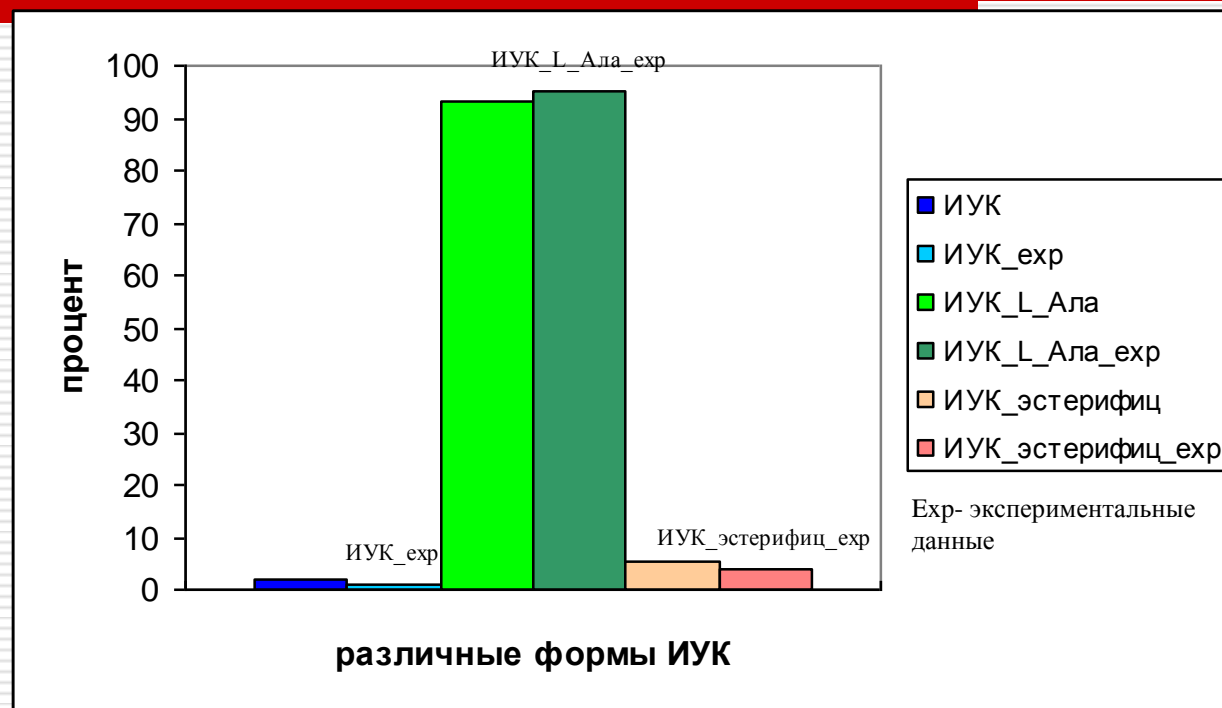
Структурная модель генной сети метаболизма ауксина:



Компьютерная технология автоматической генерации математических моделей:



Результаты моделирования процентного содержания различных форм ауксина в клетке меристемы побега:



Расчёты модели:

Процентное содержание различных форм ауксина (ИУК) в клетке:

По оси y-проценты

По оси x-форма ИУК

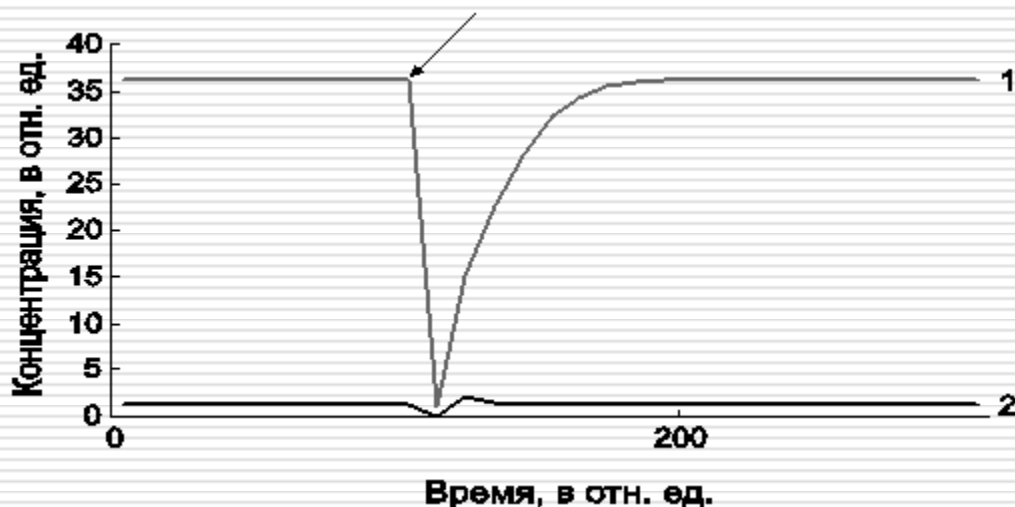
В клетках побега Арабидопсиса, свободная форма ауксина и его эстерифицированная форма составляют только <1% и 4% от общего пула ауксина, соответственно. Оставшийся пул ауксина (95%) составляют амидные формы ауксина (Park et al., 2001).

Karin Ljung, 2002

Новосибирск, 2009

Результаты моделирования динамики изменения концентрации ИУК и GH3 белка в клетке в зависимости от начальной концентрации:

Момент времени-переключения системы из равновесного состояния в состояние с измененными значениями концентрации ауксина (ИУК) и GH3 белка



Расчёты модели:

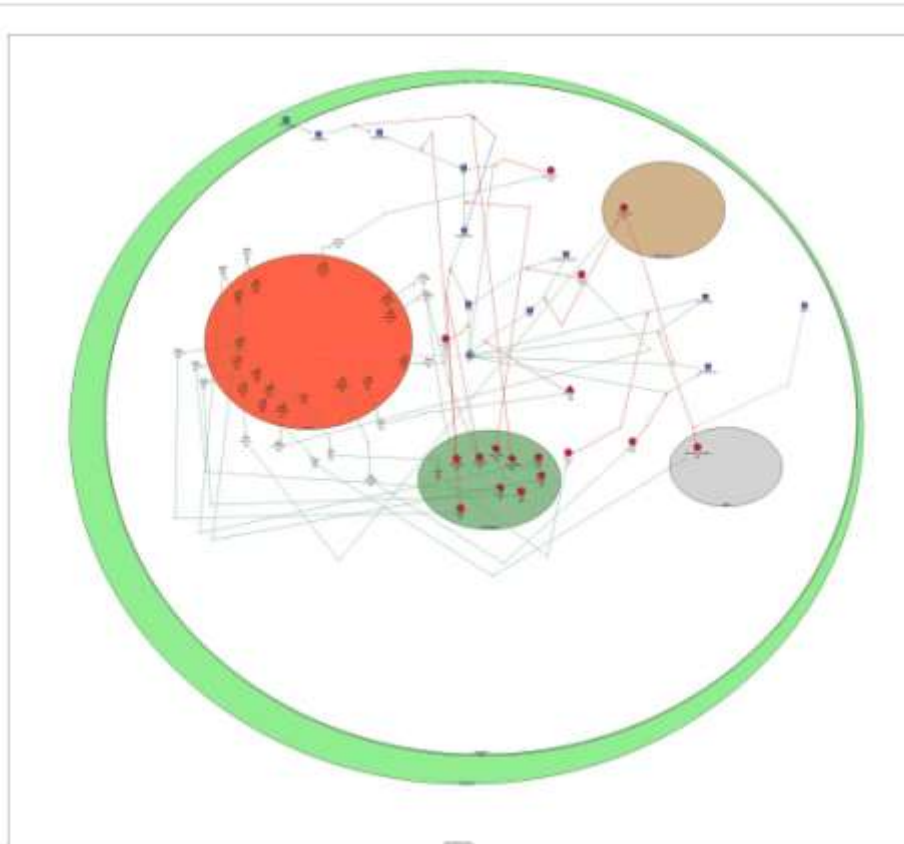
Концентрация ИУК и GH3 белка в клетке в зависимости от начальной концентрации:

По оси y-концентрация ИУК (2) и GH3 белка (1)

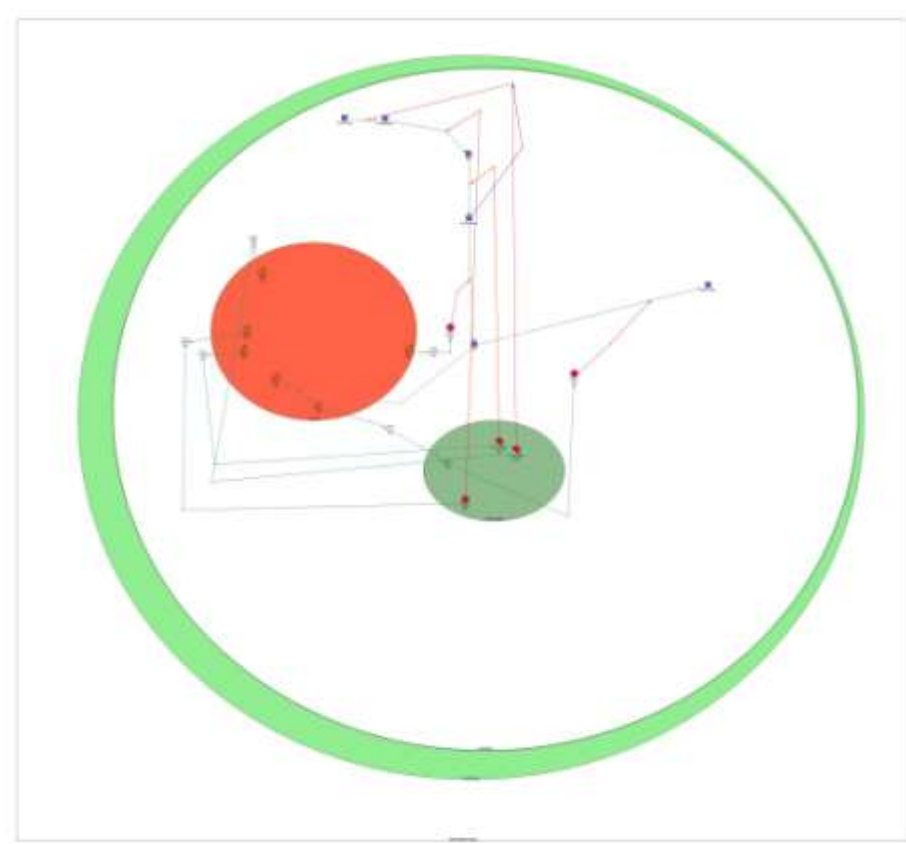
По оси x-время расчёта

Ферменты, которые осуществляют реакции конъюгации ИУК с аминокислотами, кодируются белками семейства GH3, которые кодируются ауксин индуцируемыми генами. Эти ферменты входят в суперсемейство люцифераз (Staswick et al., 2002). Также известно, что ауксин быстро и мимолётно индуцирует накопление, по крайней мере, трёх семейств транскриптов: SMALL AUXIN-UP RNAs (SAURs), GH3-связанные транскрипты и члены семейства AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA).

Сравнительный анализ генных сетей метаболизма ауксина у высших и низших видов растений:



**ГС метаболизма ауксина у высших
видов растений**



**ГС метаболизма ауксина у низших
видов растений**

Сравнительный анализ генных сетей метаболизма ауксина у высших и низших видов растений:

Характеристика ГС*	Генная сеть для высших видов	Генная сеть для низших видов
Компартменты	7	5
Белки	17	5
Реакции	64	24
Гены	15	5
РНК	15	5
Метаболиты	12	7

* - КОЛИЧЕСТВО

Динамика изменения концентраций метаболитов и белков в модели высших видов растений:

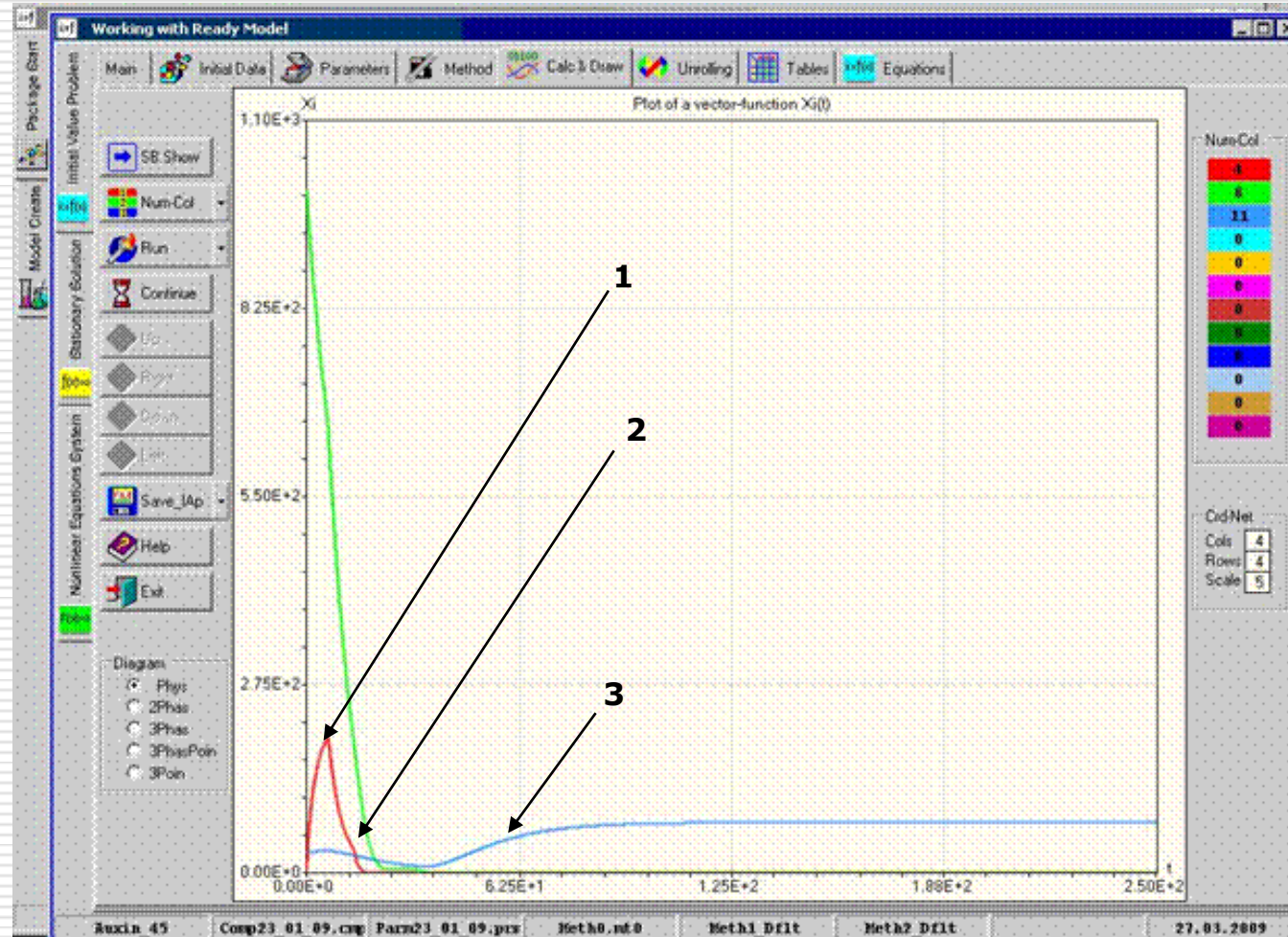
Расчет модели количественно совпадает с экспериментальными данными:

[Sztein E. et al., 2000]

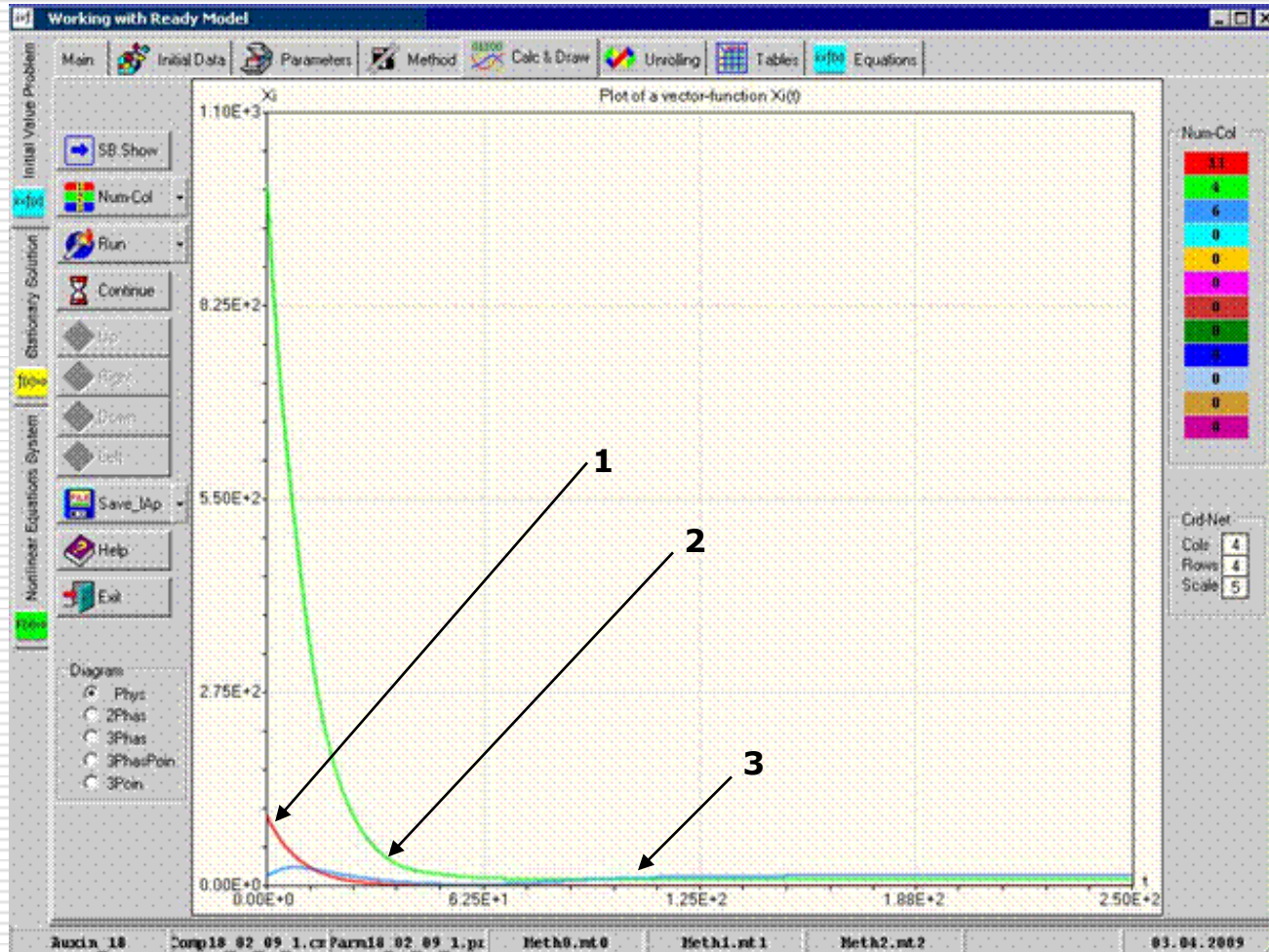
- 1) ауксин (0.00992 mM);
- 2) триптофан;
- 3) ГНЗ белка.

Ось y - концентрация (mM)

Ось x – время расчета (сек)



Динамика изменения концентраций метаболитов и белков в модели низших видов растений:

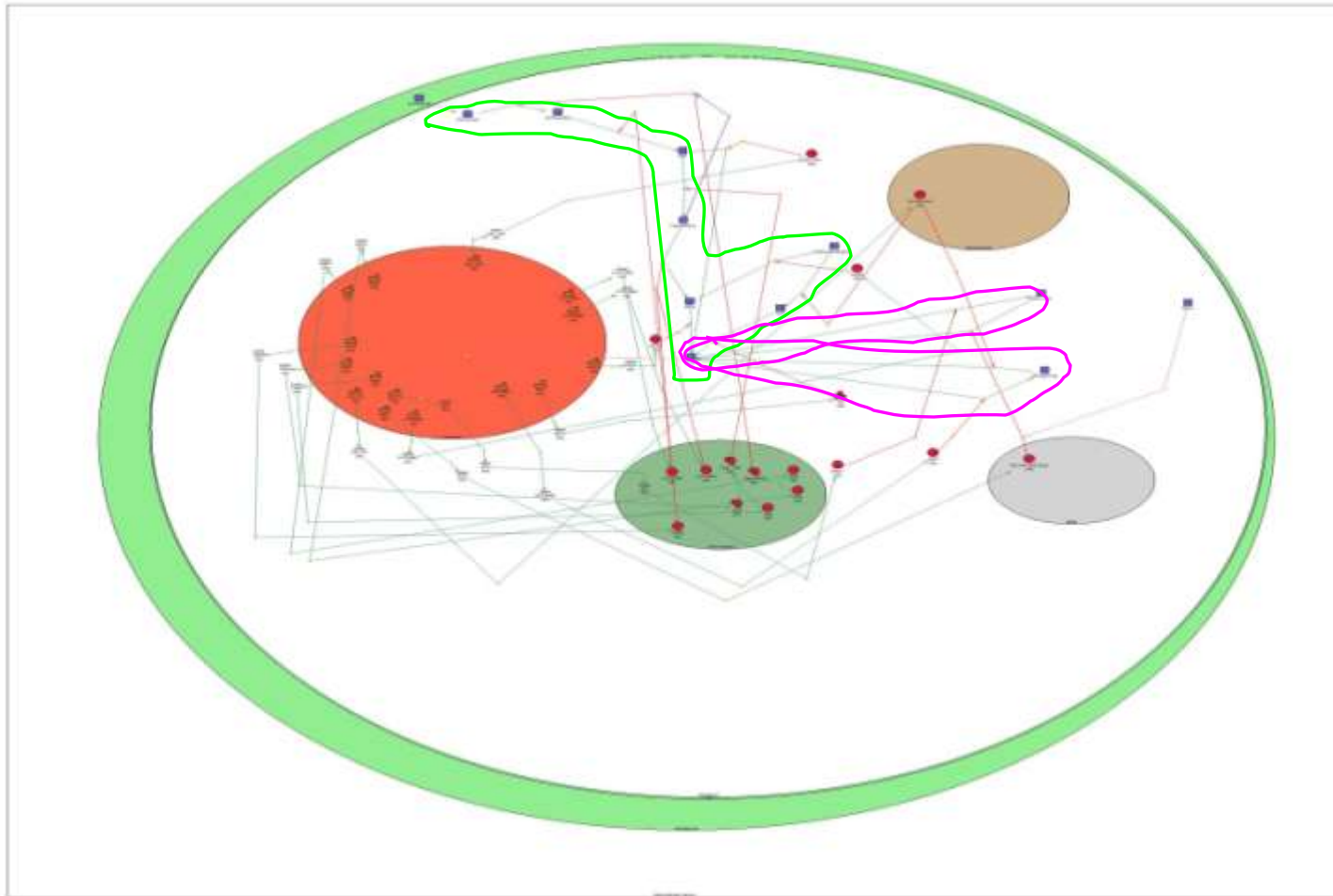


Расчет модели количественно совпадает с экспериментальными данными:
[Sztejn E. et al., 2000]

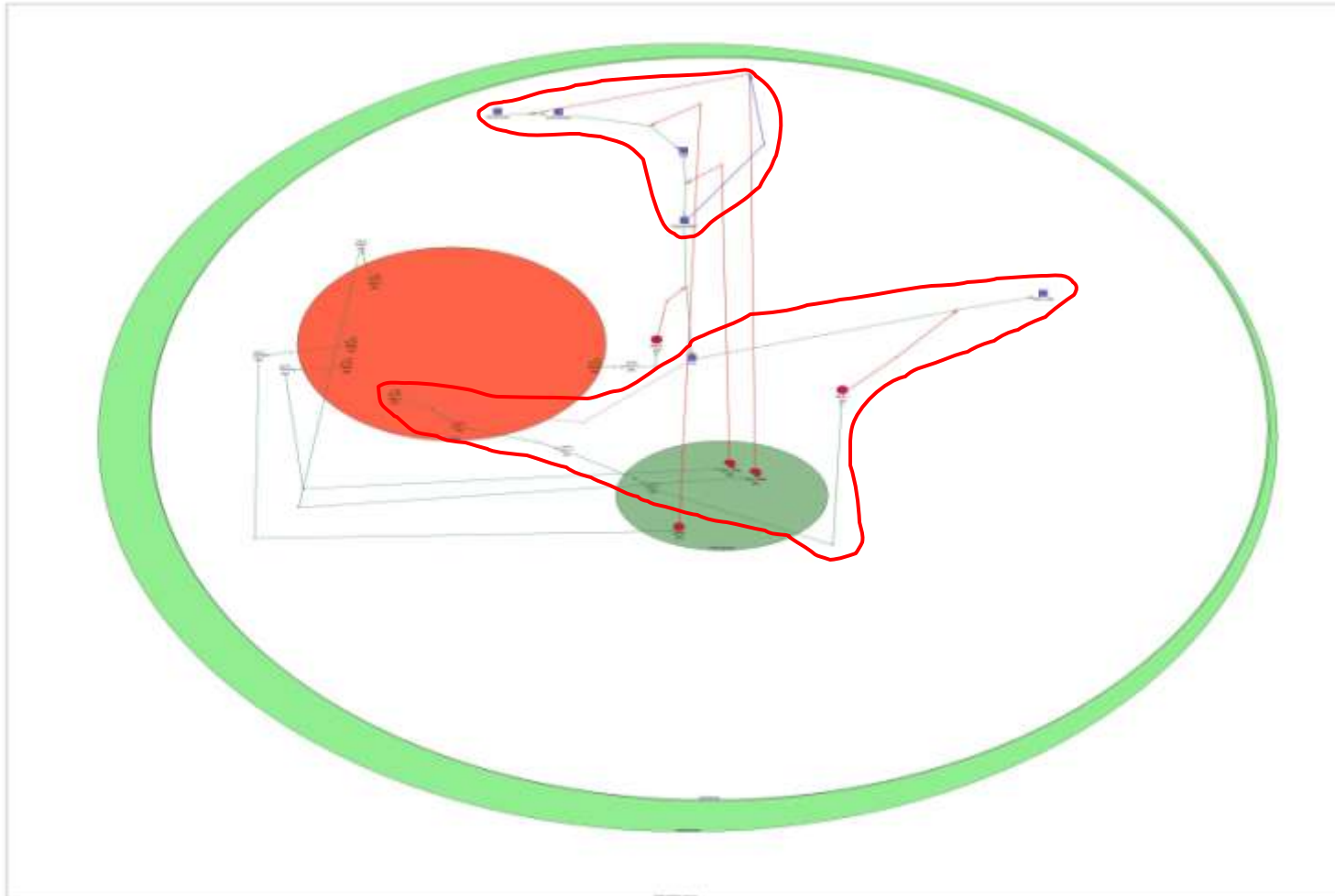
- 1) ауксин (0.1446 mM);
- 2) триптофан;
- 3) G3 белка.

Ось y - концентрация (mM)
Ось x – время расчета (сек)

Анализ чувствительности модели метаболизма ауксина у высших видов растений:

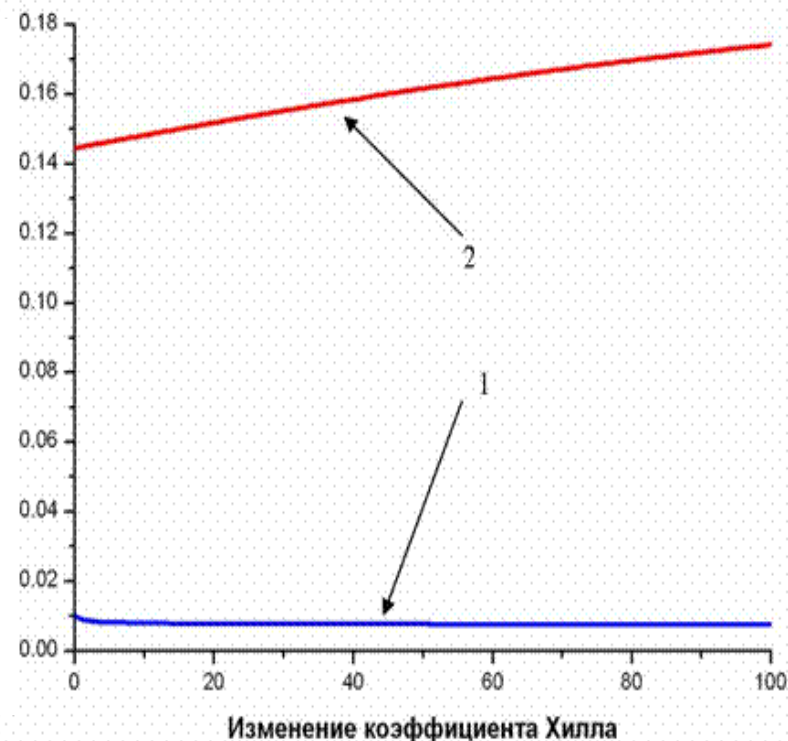
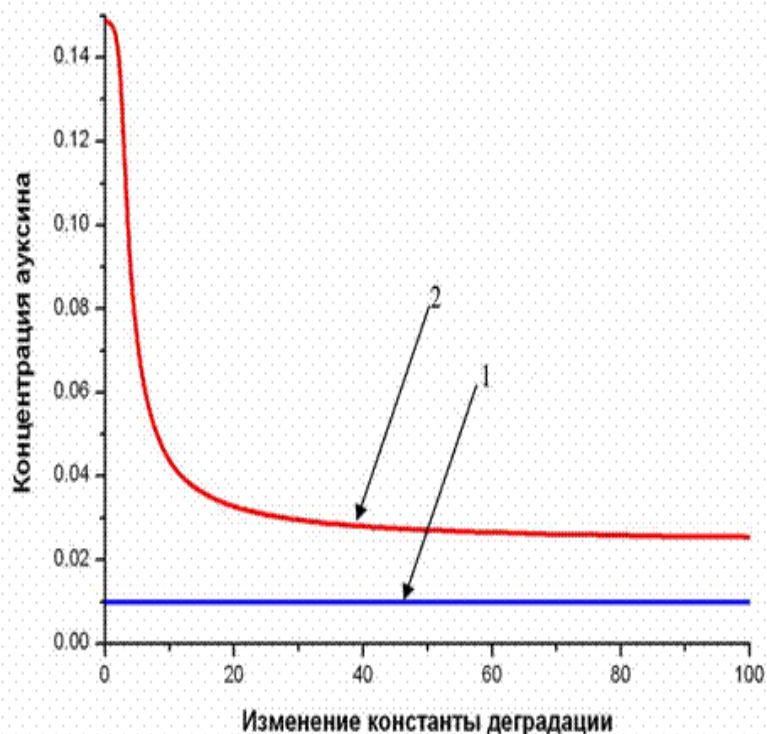


Анализ чувствительности модели метаболизма ауксина у низших видов растений:



Анализ чувствительности моделей метаболизма ауксина:

1 – для высших видов, 2- для низших видов



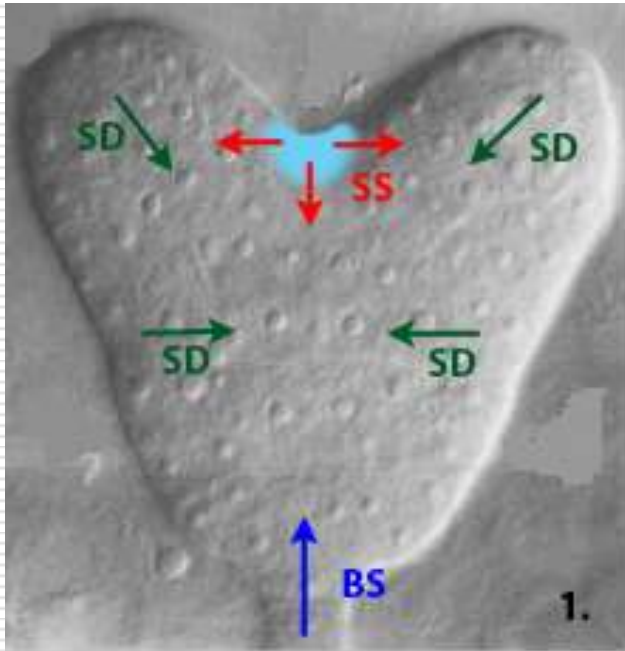
Изменение концентрации ауксина в зависимости от константы деградации Рнк гена *gh3*.

Изменение концентрации ауксина в зависимости от коэффициента Хилла в реакции превращения хоризмата в антранилат.

Разработка пространственно – распределённой модели:

Основные принципы:

- Клетки автомата могут обмениваться химическими сигналами. Было выбрана 3 типа сигналов имеющих биологический смысл:
 - стволовой сигнал (SS);
 - сигнал дифференцировки (SD);
 - базальный сигнал (BS);
- Все клетки разделены на несколько типов в зависимости от типа продуцируемого ими сигнала, причем клетки могут менять свой тип;
- Тип клетки и продолжительность клеточного цикла зависят от локальной концентрации сигналов;
- Направления деления зависят от градиентов распределения сигналов.



*Сердечковидная
стадия развития
меристемы побега*

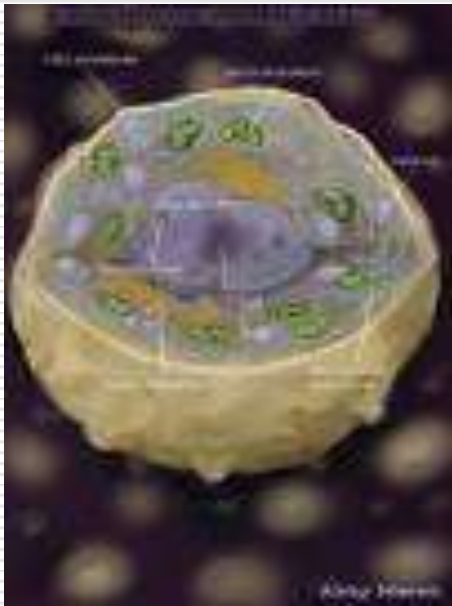
(Friml et al., 2003)



Типы клеток автомата:

- **Промеристем** - клетки меристемы зародыша. Эти клетки продуцируют SS и находятся в верхней части зародыша. В процессе развития эти клетки переходят в клетки типа Л2меристемы Л3меристем.
- **Л2меристем** - клетки меристемы, находящиеся во втором слое (считая от эпидермального слоя) верхней части зародыша. Эти клетки продуцируют SS.
- **Л3меристем** - клетки, находящиеся на слой ниже клеток типа Л2меристем. Так же продуцируют SS.
- **Транзитные** - клетки, находящиеся вблизи меристемы. Они так же продуцируют низкий SD, но имеют самый высокий темп деления.
- **Латеральные** - клетки этого типа имитируют «дифференцированные» клетки, которые продуцируют SD.
- **Суспензорные** - клетки суспензора. Эти клетки продуцируют BS и располагаются в нижней части зародыша. В модели их всегда две.

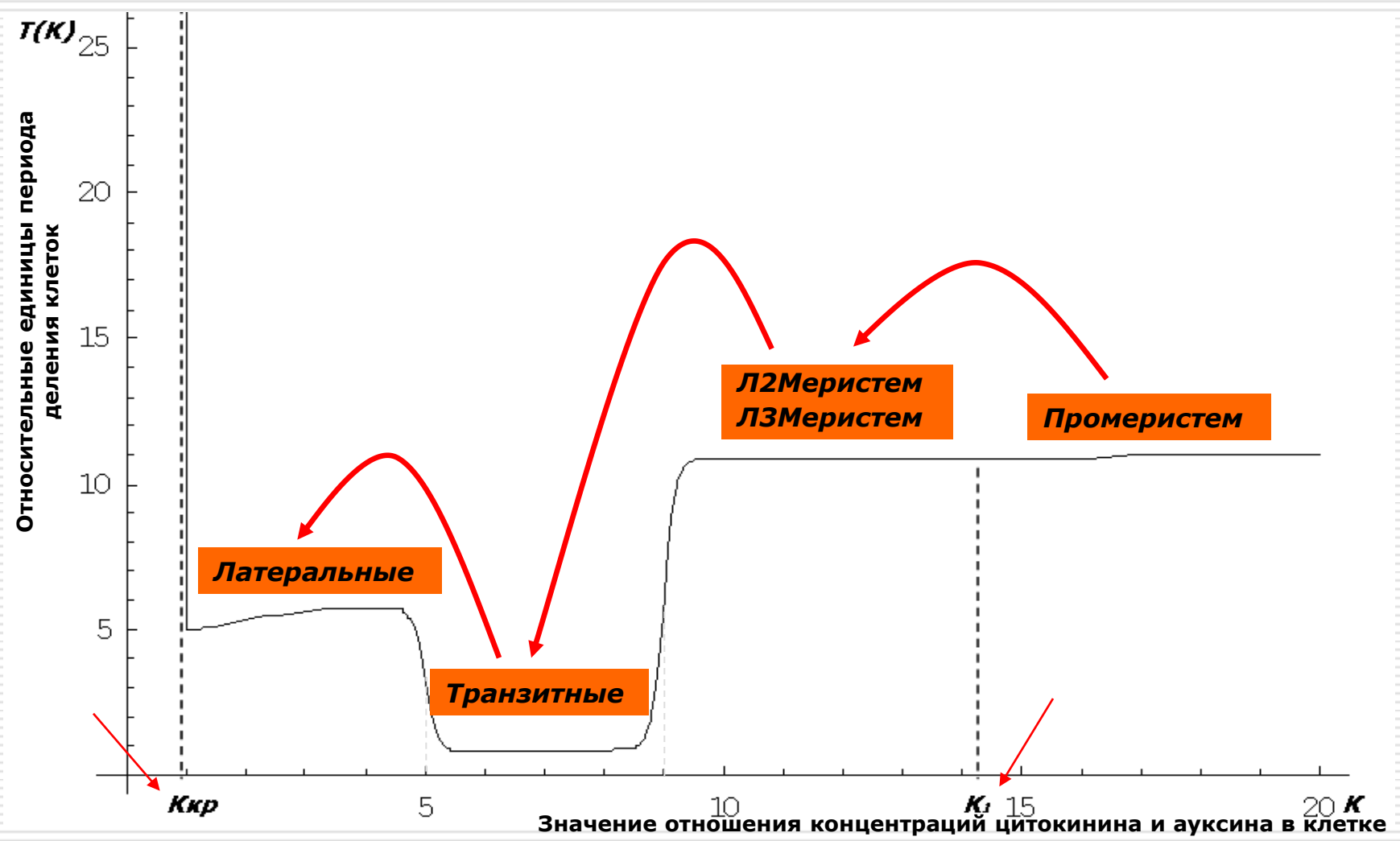
Внутренние параметры «клетки» модели:



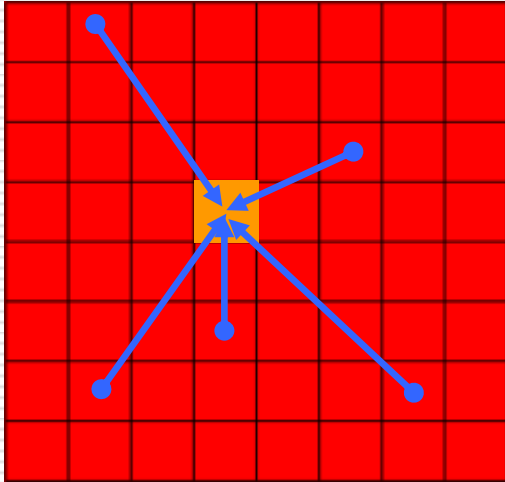
- ❑ **Type** – тип клетки
- ❑ **BS0, SS0, SD0** – значения сигналов продуцируемых данной клеткой.
- ❑ **BS, SS, SD** – значения сигналов с учетом влияния клеток ткани.
- ❑ **K** – отношение стволового сигнала к сигналу дифференцировки,
$$K=SS/SD.$$
- ❑ **T** – продолжительность клеточного цикла, $T=T(K).$
- ❑ **Tr** – возраст клетки считая от последнего деления.



Темпы делений клеток меристемы побега:



Взаимодействие «клеток» модели:



$$BS_{ij} = \alpha_{ij}^B \sum BSO_{km} e^{-\frac{n}{R_B}}$$

$$SS_{ij} = \alpha_{ij}^S \sum SSO_{km} e^{-\frac{n}{R_S}}$$

$$SD_{ij} = \alpha_{ij}^D \sum SDO_{km} e^{-\frac{n}{R_D}}$$

$$n = |i - k| + |j - m|$$

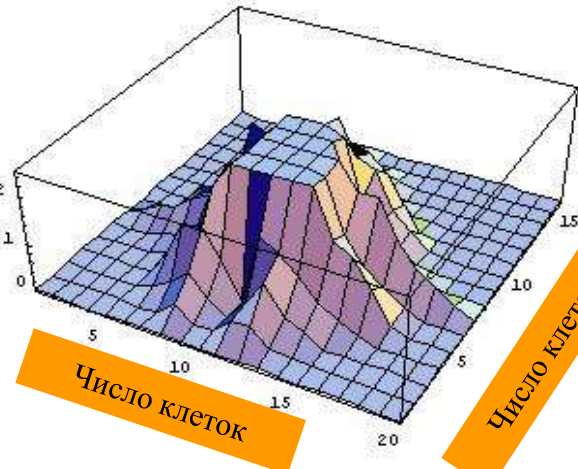
□ Глобальное взаимодействие

Суммарное влияние на клетку с координатой (i, j) есть сумма продуцируемых сигналов по всем клеткам ткани с весами экспоненциально убывающими от расстояния между клетками.

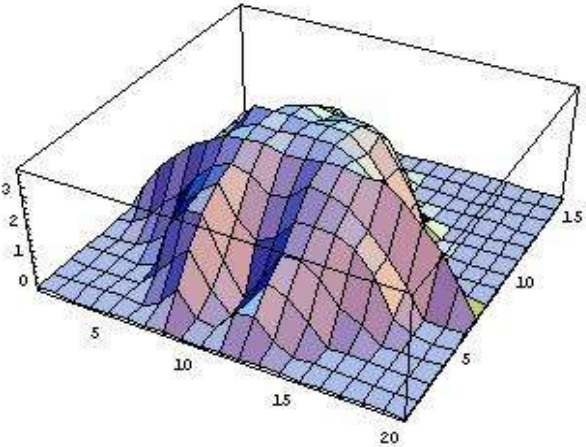


Визуализация модели клеточного автомата:

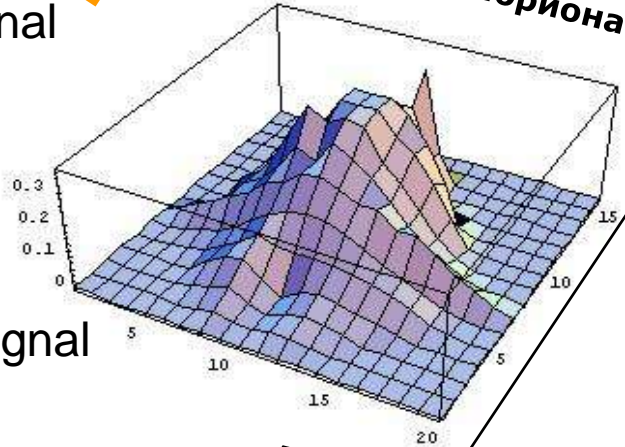
Случайные единицы концентрации сигнала в клетке



Stem signal



Differentiation signal

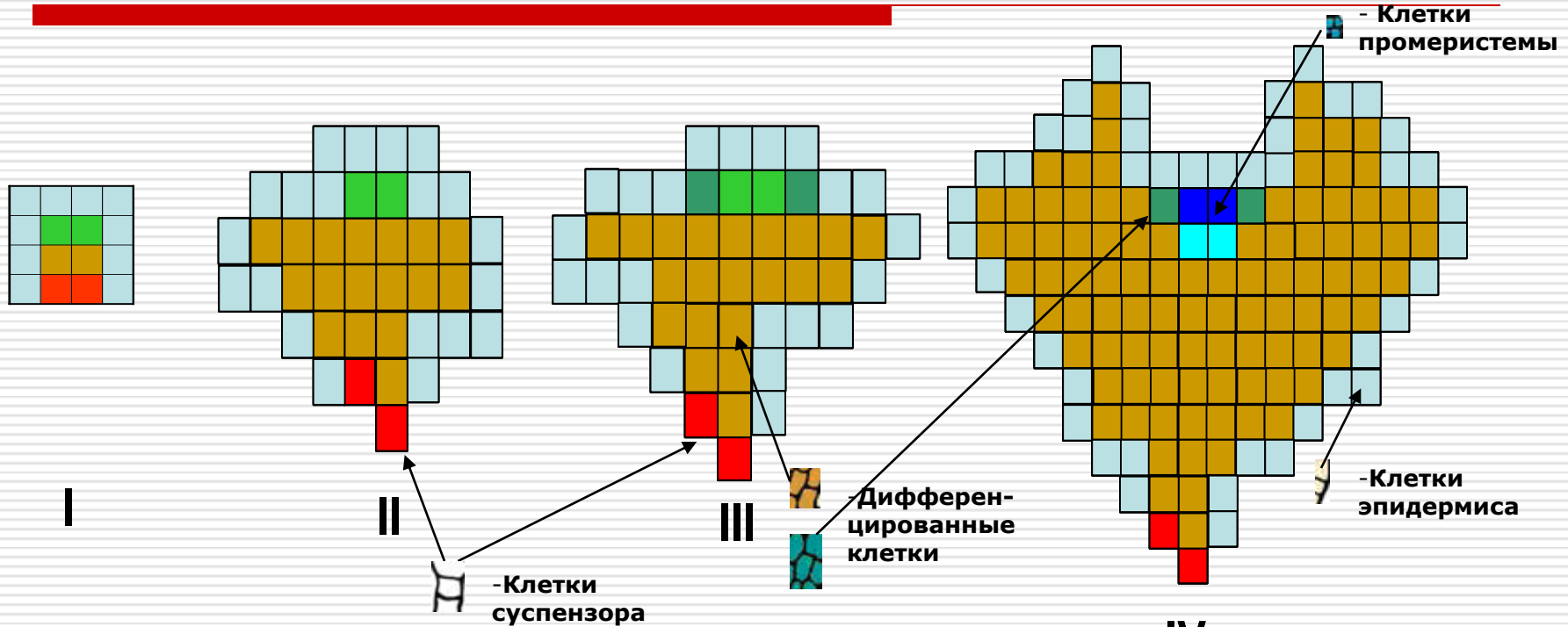


Basal signal

Базальная часть эмбриона

Апикальная часть эмбриона

Результаты моделирования. Нормальное развитие зародыша:



I-16 клеточный эмбрион (■ - Эпид., ■ - Промеристем, ■ - Латерал., ■ - Суспенз.); II-глобулярная стадия (нет новых клеточных типов), III-сердечковидная стадия (■ - Транз.), IV-торпедная стадия (■ -Л2Меристем, ■ - Л3Меристем);

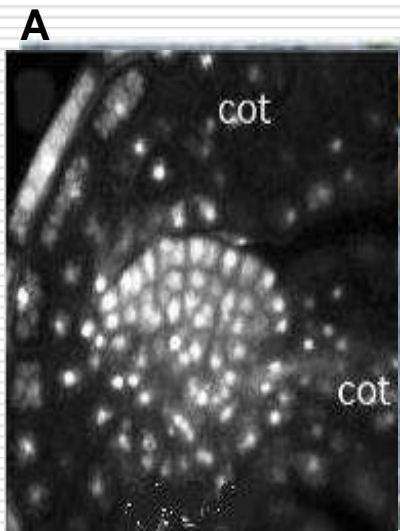


Результаты моделирования. Мутантное развитие зародыша:

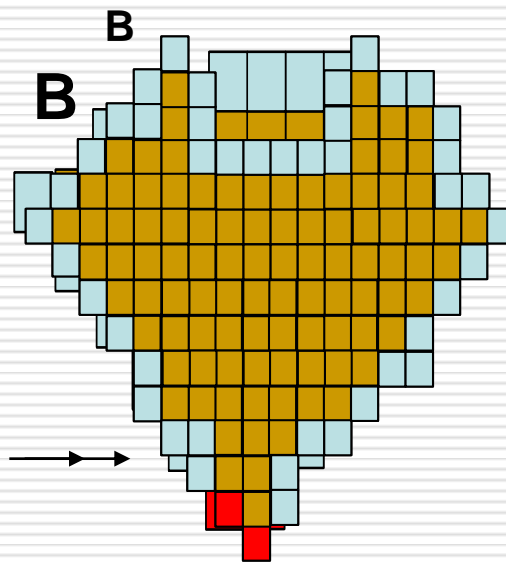
мутация I вида ам:

Модель: чувствительность Промеристем к Signal of Differentiation (больше), чувствительность L2, L3 к Stem Signal (меньше)

Организм: *clv3-2 cuc1 cuc2*



← Из эксперимента
← Из эксперимента



Расчёт делений →

I-16 клеточный эмбрион (- Эпид., - Промеристем, - Латерал., - Суспенз.); II-глобулярная стадия (нет новых клеточных типов), III-сердечковидная стадия (- Транз.), IV-торпедная стадия (- L2 Меристем, - L3 Меристем);

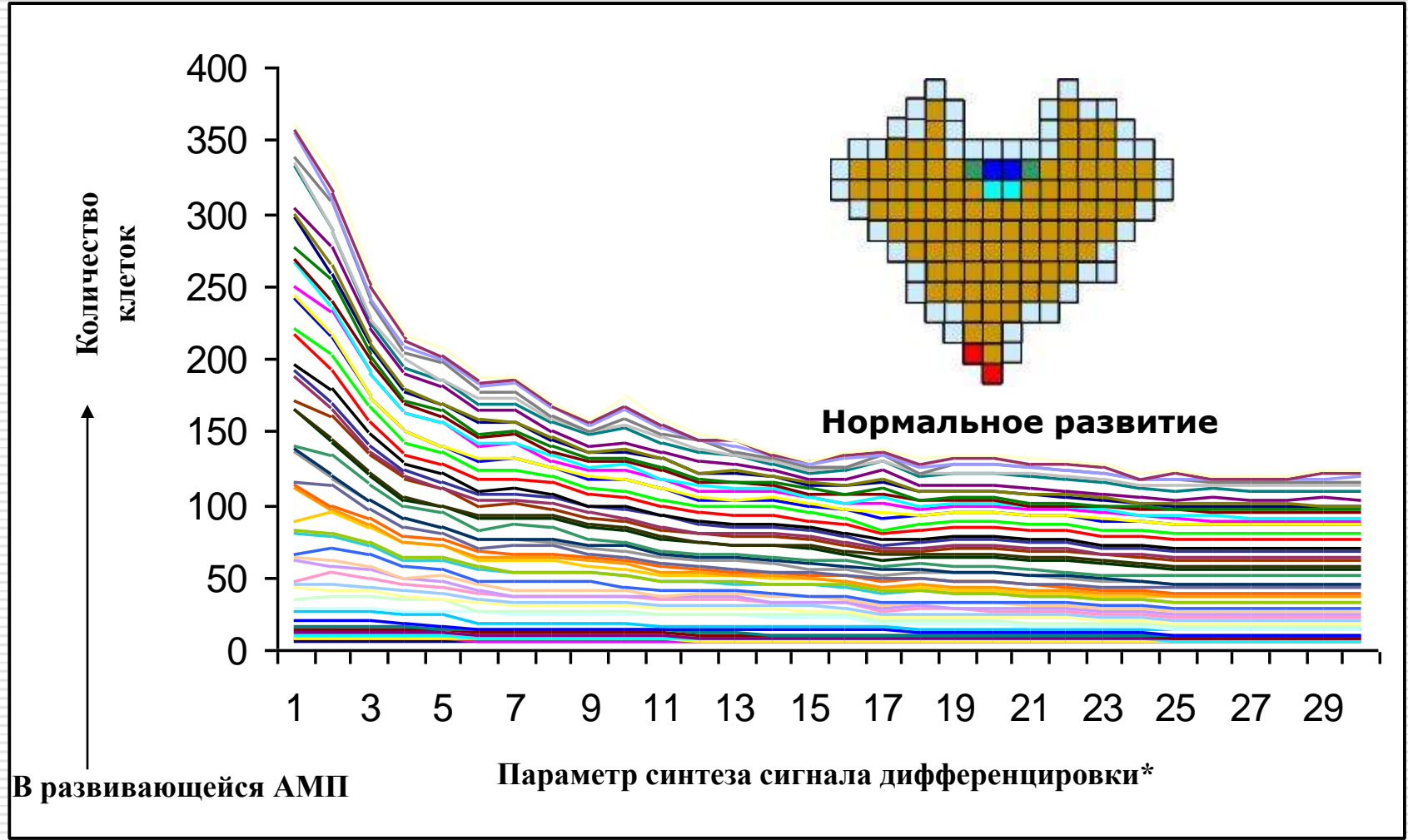
Aida M., Ishida T., Tasaka M. (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: *Новосибирск, 2009*

Interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development*, 119, 823-831

Sharma V.K. and Fletcher J.C. (2003). Maintenance of Shoot and Floral Meristem Cell Proliferation and Fate. *PLoS*. 100. 11823- 11829.



Анализ чувствительности модели к параметрам транспорта и синтеза SD (сигнала дифференцировки):

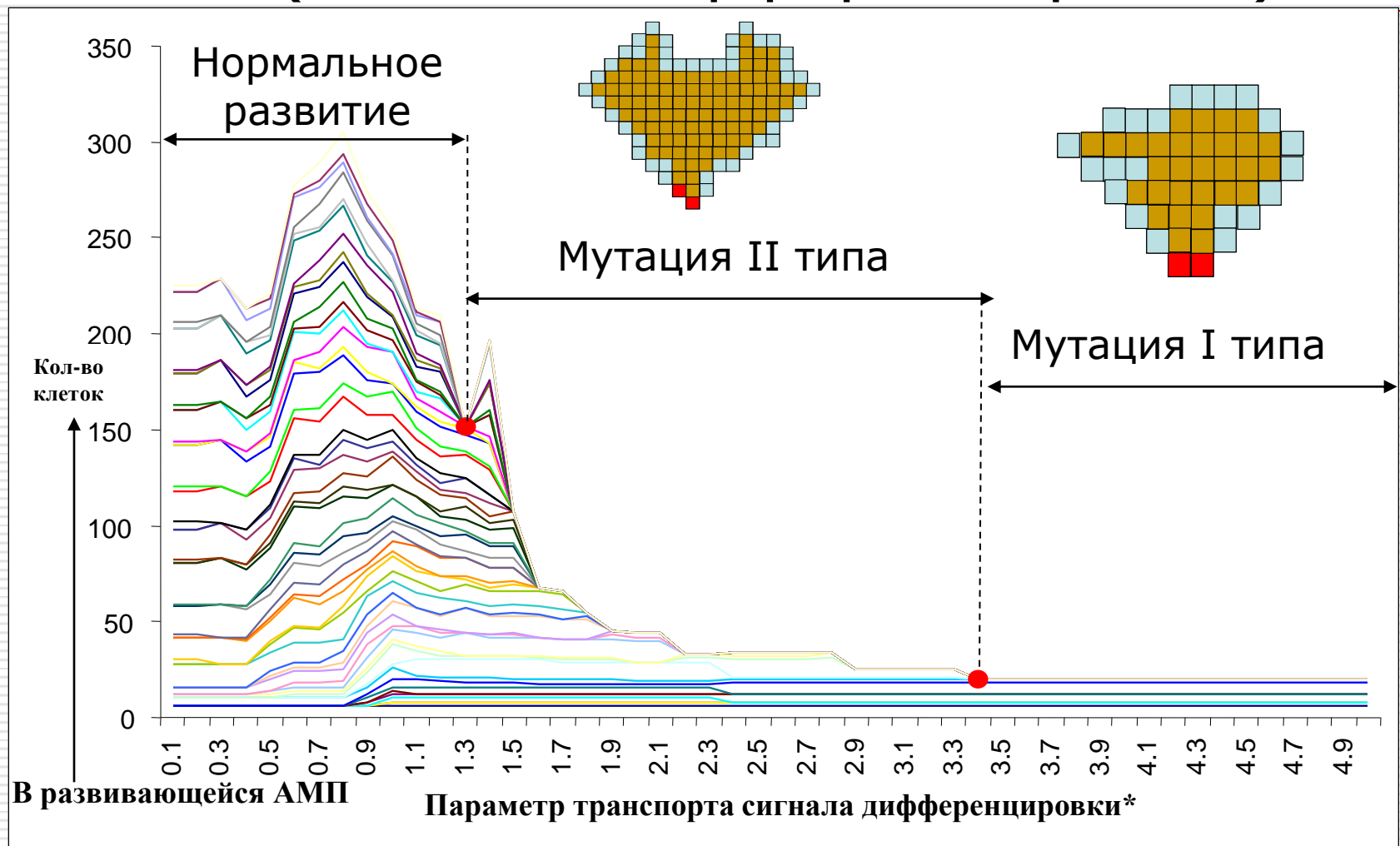


Влияние параметра синтеза SD (differentiation signal) на эволюцию клеточного автомата (* - значения параметра в относительных единицах)

Новосибирск, 2009



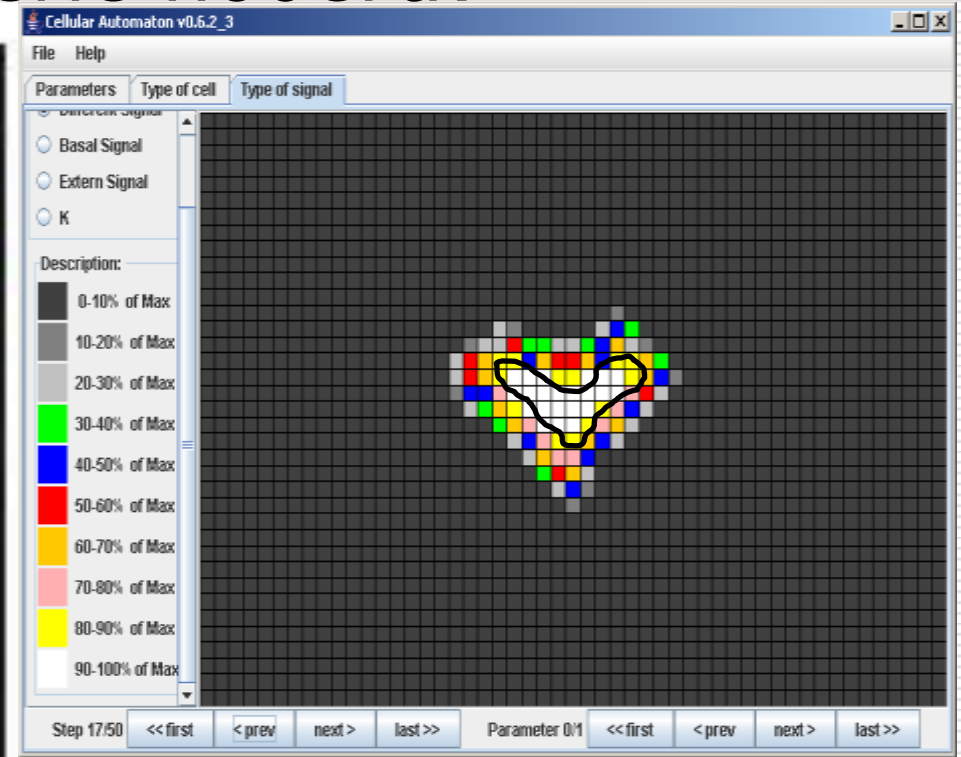
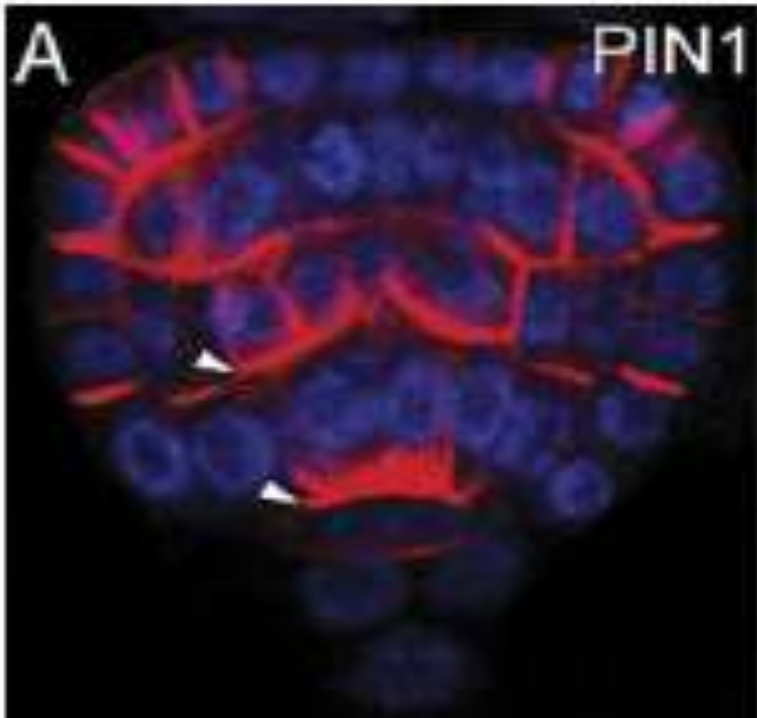
Анализ чувствительности модели к параметрам транспорта и синтеза SD (сигнала дифференцировки):



Влияние параметра транспорта SD (differentiation signal) на эволюцию клеточного автомата (* - значения параметра в относительных единицах). Новосибирск, 2009



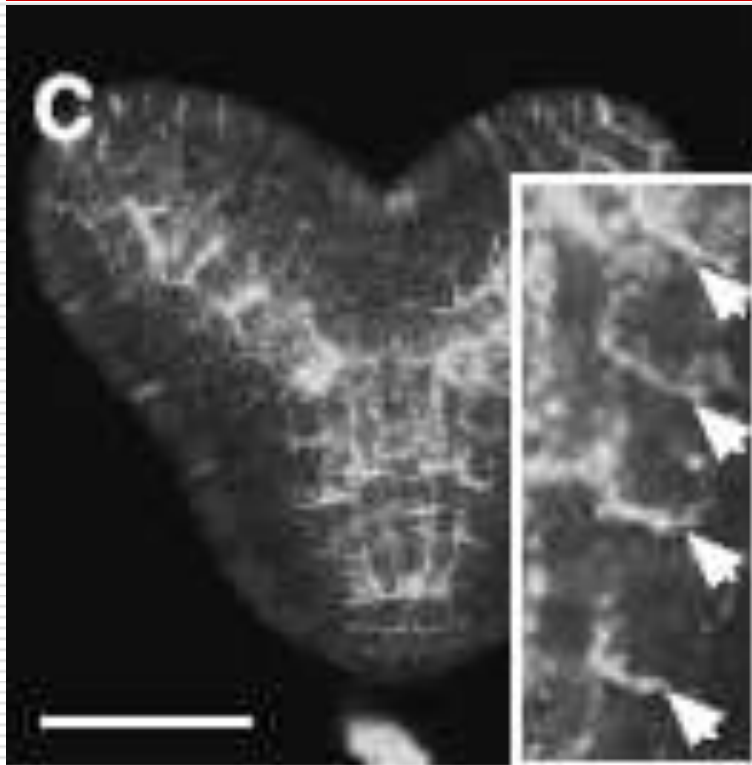
Распределение паттернов ауксина в развивающейся апикальной меристеме побега:



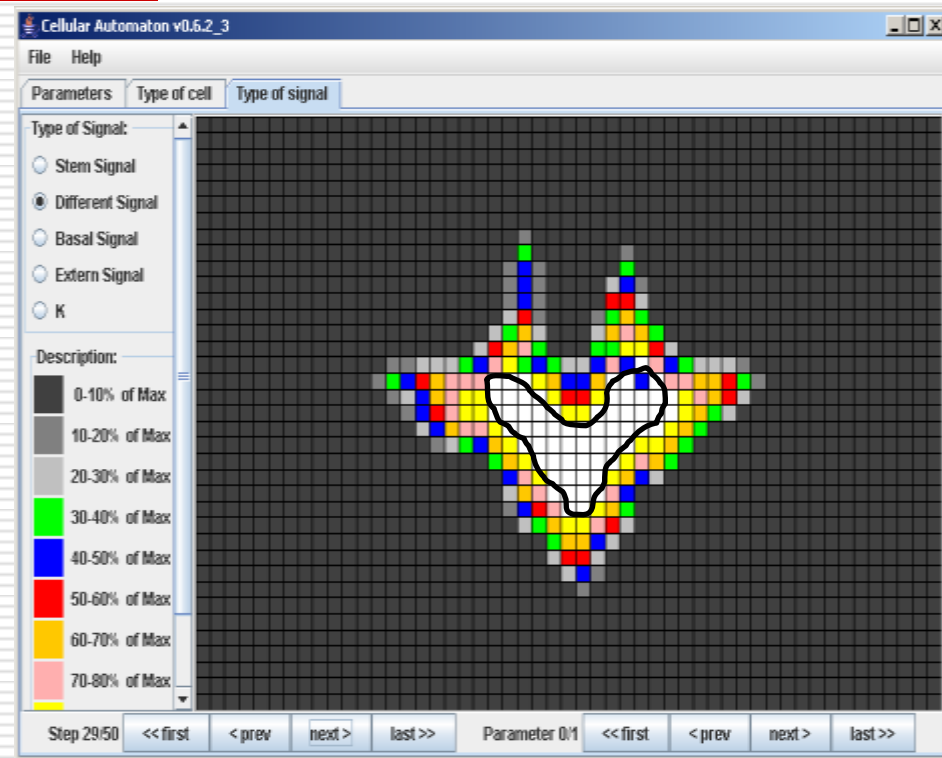
Иммунная локализация белков PIN1 в эмбрионе: окрашена полярное расположение PIN1 в диком типе (Michniewicz M. et al., 2007)

Распределение относительного максимума ауксина, полученное с помощью модели

Распределение паттернов ауксина в развивающейся апикальной меристеме побега:



Полярная локализация белков PIN1
на более поздней стадии развития
(Steinmann T. et al., 1999)



Распределение относительного
максимума ауксина,
полученное с помощью модели



Выводы:

1. Разработана компьютерная технология конструирования математических моделей генных сетей.
2. Реконструирована генная сеть метаболизма ауксина в клетке побега *Arabidopsis thaliana*. Выявлены два регуляторных отрицательных контура и восемь путей биосинтеза и конъюгации ауксина. Показано, что регуляторные контуры идентичны для низших и высших классов растений, т.е. они являются консервативными ключевыми факторами поддержания гомеостаза ауксина. Напротив, количество параллельных путей биосинтеза, деградации, конъюгации ауксина растет от низших видов растений к высшим.
3. Разработана математическая модель метаболизма ауксина в клетке растения. Подобран оптимальный набор значений параметров, при котором модель адекватно воспроизводит экспериментальные данные.



Выводы:

4. Проведен параметрический анализ чувствительности математических моделей метаболизма ауксина у высших и низших видов растений. Сделан вывод, что у низших растений стационарная концентрация ауксина более чувствительна к мутациям, затрагивающим регуляторных контуры.
5. Разработана пространственно-распределённая математическая модель развития меристемы побега *Arabidopsis thaliana*. Для модели подобран оптимальный набор значений параметров, при котором модель воспроизводит пространственное распределение паттернов ауксина в процессе развития апикальной меристемы побега; режимы нормального и аномального развития меристемы, соответствующие таким фенотипам, как дикий тип и мутантам *suc1 suc2* и *clv3-2*. Модель предсказывает отсутствие других фенотипических проявлений в развитии апикальной меристемы побега.



Выводы:

6. Показано, что развитие меристемы побега *Arabidopsis thaliana* на ранних этапах обеспечивается ненаправленной диффузией базального и стволового сигналов, сигнала дифференцировки и фиксированным положением клеток суспензора. Также показано, что эффективность синтеза сигналов в клетках слабо влияет на характеристики развивающейся апикальной меристемы побега.
7. Выявлены интервальные значения параметров транспорта и синтеза ауксина, определяющие быстрое увеличение (уменьшение) биомассы надземной части растения.



Публикации:

Семь работ в рецензируемых журналах, из них пять из списка ВАК. Одна публикация представлена в рецензируемой коллективной монографии и одна – в учебном пособии по биоинформатике, десять – в рецензируемых трудах конференций и тринадцать тезисов конференций. По тематике исследования получено два свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ.



Спасибо за внимание!
