

На правах рукописи

Коврижных Василина Владимировна

**КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭКСПРЕССИИ  
ТРАНСПОРТЕРОВ АУКСИНА СЕМЕЙСТВА PIN В КОРНЕ  
*ARABIDOPSIS THALIANA L.***

Математическая биология, биоинформатика

03.01.09

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в Федеральном исследовательском центре Институте цитологии и генетики СО РАН в секторе системной биологии морфогенеза растений, г. Новосибирск

**Научный руководитель:** Кандидат биологических наук,  
В.В. Миронова  
Институт цитологии и генетики СО РАН,  
г. Новосибирск

**Официальные оппоненты:** **Иванов Виктор Борисович**  
доктор биологических наук, профессор,  
ведущий научный сотрудник, ФГБУН  
Институт физиологии растений им. К.А.  
Тимирязева РАН, г. Москва

**Бандман Ольга Леонидовна**  
доктор технических наук, профессор,  
главный научный сотрудник, ФГБУН  
Институт вычислительной математики и  
математической геофизики СО РАН,  
г. Новосибирск

**Ведущее учреждение:** Санкт-Петербургский государственный  
политехнический университет Петра  
Великого, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится « » \_\_\_\_\_ 2017г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в конференц-зале Института по адресу:  
пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090,  
тел.: (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78;  
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

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

Автореферат разослан « » \_\_\_\_\_ 2017 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Хлебодарова Т. М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Фитогормон ауксин играет важную роль в регуляции роста и развития корня растения. Значительная часть ауксина синтезируется в надземной части и переносится к корню, обеспечивая поддержание ниши стволовых клеток в меристеме главного корня, а также закладку и поддержание меристем боковых и придаточных корней. В апикальной меристеме корня (АМК) ауксин регулирует положение клеток покоящегося центра (ПЦ), поддержание идентичности стволовых клеток, пролиферацию их дочерних клеток и, наконец, удлинение дифференцирующихся клеток. Многообразие физиологических эффектов этого гормона объясняется дозозависимыми механизмами действия и его неравномерным распределением в тканях [Benkova et al., 2009]. Межклеточное перемещение ауксина осуществляется за счет активного транспорта и пассивной диффузии. Гены семейства *PIN-FORMED (PIN)* кодируют трансмембранные белки-транспортёры, которые осуществляют отток ауксина из клетки [Petrasek et.al., 2006; Wisniewska, et.al., 2006]. В силу неравномерного (полярного) расположения PIN транспортёров на мембране клетки, в тканях формируются направленные потоки ауксина. В результате объединения и взаимодействия этих потоков, например, в кончике корня формируется распределение ауксина с максимумом в клетках ПЦ, который определяет поддержание ниши стволовых клеток в корне [Feraru and Friml, 2008]. Пластичность распределения ауксина в большой степени реализуется через молекулярно-генетическую регуляцию экспрессии PIN белков. Поэтому понимание механизмов регуляции экспрессии PIN белков ауксином является ключевым в исследовании многих морфогенетических процессов растения.

Известно, что ауксин регулирует экспрессию своих транспортёров на разных уровнях, включая транскрипцию, стабильность белков и их локализацию на мембране [Friml et al., 2004; Geldner et.al., 2001; Sauer et.al., 2006; Vieten et.al., 2005]. Исследование влияния положительных и отрицательных обратных связей в генной сети регуляции транспорта ауксина на формирование его распределения требует применения комбинированных экспериментально-компьютерных методов. Результаты расчетов математических моделей не только описывают экспериментально-наблюдаемые процессы, но также предоставляют предсказания,

которые могут быть проверены экспериментально. Методы математического моделирования давно и успешно применяются в исследованиях распределения ауксина в корне растения [Band et.al., 2014; Grieneisen et al., 2007; Mironova et.al., 2012]. Несмотря на значительные успехи в этой области, в большинстве математических моделей паттерн экспрессии и полярность PIN-транспортёров задается изначально и не меняется в процессе расчета. Актуальным является развитие альтернативного подхода [Mironova et al., 2010; Mironova et al., 2012], в основе которого лежат механизмы самоорганизации паттернов экспрессии PIN в зависимости от концентрации ауксина, так как такую модель можно адаптировать для исследования действия ауксина на морфогенез.

### **Цели и задачи исследования**

Целью данной работы является определение роли ауксина в формировании паттернов экспрессии семейства PIN-транспортёров в меристеме корня *Arabidopsis thaliana* L. Для этого было решено несколько задач:

1. Дизайн и экспертное сопровождение *in vivo* экспериментов по исследованию паттернов экспрессии PIN транспортёров ауксина в корне *A. thaliana* в норме и при изменении количества ауксина;
2. Компьютерный анализ экспериментальных изображений, с конфокального и флуоресцентного микроскопов с целью выявления качественных и количественных изменений в экспрессии PIN белков.
3. Математическое моделирование формирования паттернов экспрессии PIN-транспортёров в меристеме корня под управлением ауксина.

### **Научная новизна**

Впервые дано исчерпывающее описание особенностей экспрессии белков PIN1-PIN4, PIN7 в меристеме корня *A. thaliana* и определена вариабельность их доменов в растениях дикого типа. На основе сопоставления паттернов экспрессии PIN белков и распределения ауксина предложена гипотеза о том, что экспрессия семейства PIN транспортёров и их полярная локализация на мембране определяется специфическими концентрациями ауксина в клетках меристемы корня. В растениях с измененным уровнем ауксина выявлены качественные и количественные изменения в паттернах PIN белков, подтверждающие предложенную гипотезу.

Важной особенностью PIN белков является их способность быстро передислоцироваться на поверхности мембраны клетки, изменяя тем самым поток ауксина в ответ на внешнее воздействие. До настоящего времени математическое моделирование таких процессов было затруднено, так как это потребовало бы динамического переписывания уравнений модели. В данной работе распределение ауксина исследовалось в модели типа «клеточный автомат», в которой изменения полярности клеток и набора экспрессирующихся в них PIN белков были заданы в виде логических правил. Такой подход позволил впервые описать самоорганизацию PIN-опосредованных потоков ауксина в меристеме корня. Предсказания модели для паттернов экспрессии PIN белков в линии *35S::PIN1* были подтверждены экспериментально.

### **Теоретическая и практическая ценность**

Фитогормоны, особенно ауксин, давно и активно используются в сельском хозяйстве, например, для вегетативного размножения растений. Результаты, полученные в данной диссертационной работе, способствуют более полному пониманию механизмов действия ауксина, что имеет ценность как для прикладной области науки, так и для изучения фундаментальной биологической проблемы - морфогенеза растений.

Математическая модель, предложенная в данной диссертационной работе может быть использована для исследования функционирования меристемы корня в ответ на внешние стимулы. Например, модель может предсказывать способы сохранения ниши стволовых клеток корня при неблагоприятных факторах внешней среды.

Практическая ценность данной работы состоит в том, что знания о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии PIN белков, позволят использовать эти белки в качестве маркеров в исследованиях морфогенеза. Например, при индукции соматического эмбриогенеза для контроля дозы экзогенных гормонов.

### **Методология и методы исследования**

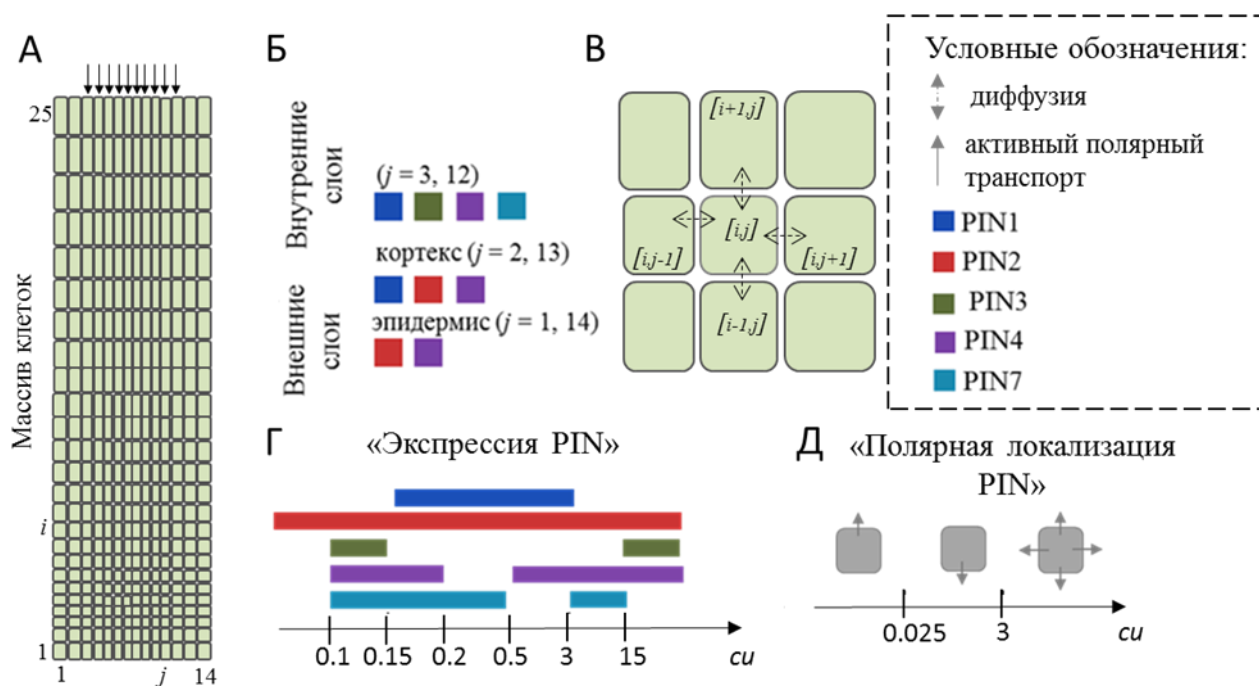
В диссертационной работе применялся системный подход, который включает экспериментальные методы и математическое моделирование. Мы разрабатывали схемы экспериментов (планировали условия и последовательность действий, подбирали концентрации действующих веществ), эксперименты

проводились Тарасом Пастернак в университете Фрайбурга (Германия). Были использованы самых современных методов: репортерных генов, иммунолокализации белков [Pasternak et.al., 2015], конфокальной микроскопии. Качественный анализ двухмерных (2D) и трехмерных изображений (3D) кончиков корней с визуализацией PIN белков, полученных с помощью этих методов, был проведен мною в программах ZEN и iRoCs Toolbox [Schmidt et.al., 2014]. На основе полученных данных было составлено подробное описание особенностей экспрессии и полярной локализации PIN белков в корнях растений в норме, после обработки экзогенным ауксином, а также в трансгенных растениях *ucl1-D*; *35S::PIN1* и одиночных мутантах по генам *pin*.

С помощью программы ImageJ [Schindelin et al., 2012] проводился количественный анализ изображений, измерялись средняя и максимальная интенсивности свечения. Статистическая достоверность различий значений интенсивности свечения в обработанных ауксином образцах в сравнении с контролем определялась по U-тесту Манна-Уитни.

Методами математического моделирования был исследован процесс формирования распределения ауксина и паттерны PIN белков в меристеме корня в диком типе и растениях *35S::PIN1*. За основу была взята математическая модель типа «клеточный автомат», разработанная Федором Казанцевым (ИЦиГ СО РАН) в пакете MatLab©. Модель была адаптирована для изучаемого процесса следующим образом. Моделируемая область корня фиксированного размера была представлена в виде прямоугольного массива 25\*14 клеток, линейные размеры которых различались для разных слоев и рядов (Рис. 1А). Чтобы 2D ансамбль клеток имитировал дифференцировку и поддержание клеток меристемы, в модели были заложены ограничения на синтез и деградацию заданных в клетке белков-транспортеров PIN в зависимости от положения в массиве (Рис. 1Б). Распределение ауксина по массиву клеток моделировалось с помощью нерегулируемой диффузии (Рис. 1В) и PIN-опосредованного активного транспорта (Рис. 1Г, Д). Скорость активного транспорта, опосредованного разными PIN белками, была задана одинаковой. Включение и выключение PIN белков задано кусочно-линейной функцией от концентрации ауксина (рис. 1Г). PIN белки, экспрессирующиеся при

данной концентрации ауксина в клетке, работали в определенном направлении в соответствии с правилами смены полярной локализации (Рис. 1Д).



**Рисунок 1. Основные принципы, заложенные в математическую модель регуляции экспрессии PIN белков в зависимости от уровня эндогенного ауксина.**

**А.** Моделируемая часть корня, представленная в виде прямоугольного массива клеток (25\*14 клеток); **Б.** Ограничения в зависимости от слоя на экспрессию PIN; **В.** Распределение ауксина по массиву с помощью диффузии и активного полярного транспорта; **Г.** Профиль экспрессии PIN в зависимости от концентрации ауксина; **Д.** Правила смены полярной локализации PIN в зависимости от концентрации ауксина.

### Положения, выносимые на защиту

1. Достаточность механизма дозозависимой регуляции экспрессии ауксином своих транспортеров для формирования максимума концентрации ауксина в покоящемся центре меристемы корня в растениях дикого типа и *35S::PIN1* показана методом математического моделирования.

2. Экспрессия белков семейства PIN и их полярная локализация на мембране определяется специфическими дозами ауксина в клетках меристемы корня.

3. Вариабельность доменов экспрессии PIN транспортеров ауксина в меристеме корня *Arabidopsis thaliana* связана с различиями в эндогенном уровне ауксина в индивидуальных корнях.

### Апробация работы

Материалы работы вошли в отчеты по грантам Российского фонда фундаментальных исследований и Российского научного фонда. Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях в виде устных и стендовых докладов: Международные конференции по биоинформатике, структуре и регуляции генома (BGRS2012, BGRS2014, г. Новосибирск), II(X) международная ботаническая конференция молодых ученых (2012, г. Санкт-Петербург), международные конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (2012, г. Иркутск, 2015, г. Новосибирск), 4-ом международном симпозиуме «Plant signaling and behavior» (2016, г. Санкт-Петербург), конференции «Auxin» (2016, г. Санья, Китай).

#### **Личный вклад автора**

Основные результаты, изложенные в диссертации, получены и проанализированы автором лично.

#### **Структура и объем диссертации**

Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной и теоретической частей, заключения, выводов, списка литературы (108 наименований), а также списка используемых в работе сокращений. Материал изложен на 102 страницах, содержит 22 рисунка и 3 таблицы.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

Первая глава диссертации представляет собой обзор литературы. В разделе 1.1. описана анатомия корня *A. thaliana* и структура АМК. В следующем разделе приводятся механизмы действия ауксина, его метаболизм в растении, другие вещества с ауксиновой активностью, методы измерения концентрации в тканях и полученные с их помощью данные о распределении ауксина в АМК. Заключительной частью этого раздела является описание транспорта ауксина в растении. Раздел 1.3. содержит подробное описание семейства PIN транспортеров ауксина, их роли в поддержании АМК, их локализации в клетке, регуляции экспрессии генов *PIN* ауксином на различных уровнях (транскрипционном, посттрансляционном, в том числе регуляции локализации на мембране), компенсаторных изменений паттернов экспрессии PIN в случае мутации одного из них. В разделе 1.4. представлены методы компьютерного анализа изображений с конфокального микроскопа и используемые для этих целей программы с примерами для исследуемого в данной работе объекта. В разделе 1.5 приводится общее описание математического моделирования пространственного распределения морфогенов и примеры математических моделей динамики распределения ауксина PIN-транспортерами в АМК. Заключительный раздел 1.6. суммирует опубликованные ранее данные и заканчивается формулировкой задач исследования, для решения которых используется системный подход, который включает проведение экспериментального исследования (глава 2) и применение методов математического моделирования (глава 3).

### Глава 2. Экспериментальное исследование паттернов экспрессии PIN в корне

В разделах 2.1. – 2.3. приводится описание растительного материала и условий выращивания, микроскопический анализ и методы анализа изображений. Раздел 2.4. включает все полученные в экспериментальной части результаты. Ниже приведены основные результаты.

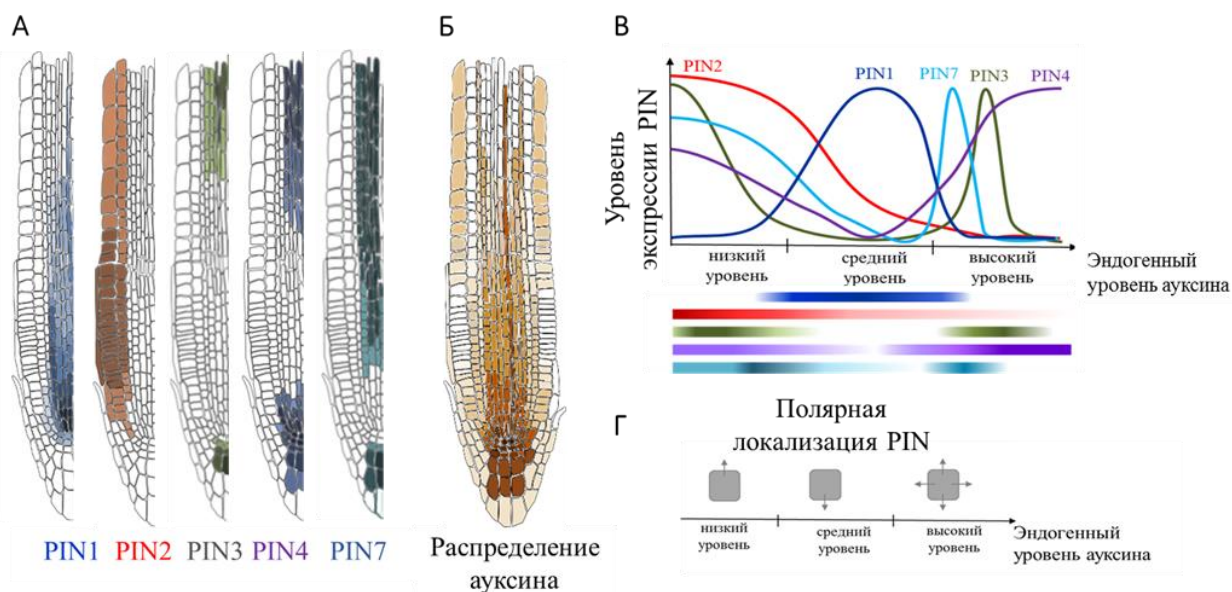
#### Описание особенностей экспрессии PIN белков в диком типе

Эксперименты по визуализации PIN1 – PIN4, PIN7 с применением методов репортерных генов и иммуногистохимической окраски со специфическими

антителами не только подтвердили описанные ранее паттерны экспрессии каждого отдельного PIN белка [Blilou et.al., 2005, Friml et.al., 2002a, Friml et.al., 2002b], но и позволили заметить некоторые неизвестные ранее закономерности. Так, была описана вариабельность экспрессии PIN белков в индивидуальных корнях. Ауксин регулирует экспрессию своих транспортеров, поэтому можно предположить, что вариабельность доменов экспрессии PIN связана с различиями в распределении ауксина в этих корнях.

### Определение роли ауксина в экспрессии PIN белков

На основе сопоставления паттернов экспрессии PIN белков (Рис. 2А) с распределением ауксина (Рис. 2Б) была сформулирована гипотеза о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии своих белков-транспортеров семейства PIN и их полярной локализации (Рис.2В-Г). А именно, PIN1 максимально экспрессируется при промежуточных концентрациях ауксина. Экспрессия PIN2 начинается при самых низких концентрациях и снижается при промежуточных. Белки PIN3, PIN4, PIN7 предположительно реагируют как на низкие, так и на высокие уровни ауксина.

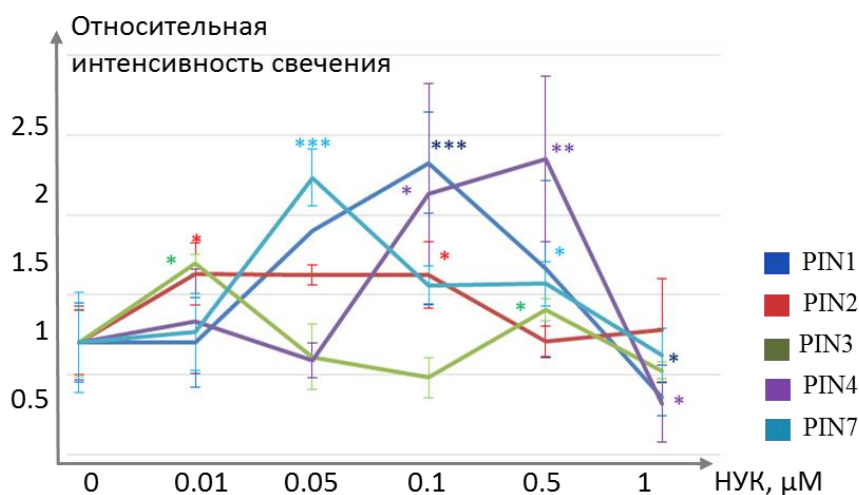


**Рисунок 2. Гипотеза о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии PIN белков. А.** Схемы паттернов экспрессии PIN, полученные по анализу конфокальных изображений (глава 2.4.1.1). **Б.** Карта распределения ауксина, реконструированная на основе экспериментальных данных по ауксин-чувствительным репортерным конструкциям DR5, DII::VENUS, R2D2 и данным масс-спектрометрии. **В, Г.** Гипотеза о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии и полярной локализации PIN белков, предложенная в данной работе.

Кроме того, было отмечено, что клетки с разной концентрацией ауксина имеют разную полярную локализацию PIN (Рис. 2Г). В колумелле и ПЦ, где

наблюдается высокий уровень ауксина, все PIN белки расположены не полярно. В сосудистой системе в клетках с промежуточным уровнем ауксина все экспрессирующиеся белки находятся на нижней стороне. Во внешних слоях PIN2 может локализоваться как на нижней, так и на верхней стороне клетки.

Экспериментальная проверка гипотезы (Рис. 2В, Г) включала анализ изменений паттернов экспрессии PIN при повышении уровня ауксина: после обработки проростков *A. thaliana* разными концентрациями экзогенного ауксина и в растениях *uic1-D*, с повышенным эндогенным уровнем ауксина. Обработка разными концентрациями НУК показала, что обратная связь в регулировании экспрессии PIN транспортеров ауксином является дозозависимой, причем разные PIN экспрессируются в разных диапазонах концентрации этого гормона (Рис. 3). Статистический анализ количественных данных интенсивности экспрессии PIN белков в ответ на экзогенный ауксин показал, что наиболее значимое изменение ( $p$ -value < 0,05, U-критерий) уровня экспрессии PIN1 происходило при 0,1  $\mu$ M, для PIN2 - 0,01 и 0,1  $\mu$ M, для PIN3 - 0,01 и 0,5  $\mu$ M, PIN4 - 0,1 и 0,5  $\mu$ M и PIN7 - 0,05 и 0,5  $\mu$ M НУК. При этом максимальное повышение уровня экспрессии в ответ на повышение концентрации экзогенного ауксина было в следующей последовательности: PIN3, PIN2 < PIN7 < PIN1 < PIN4.



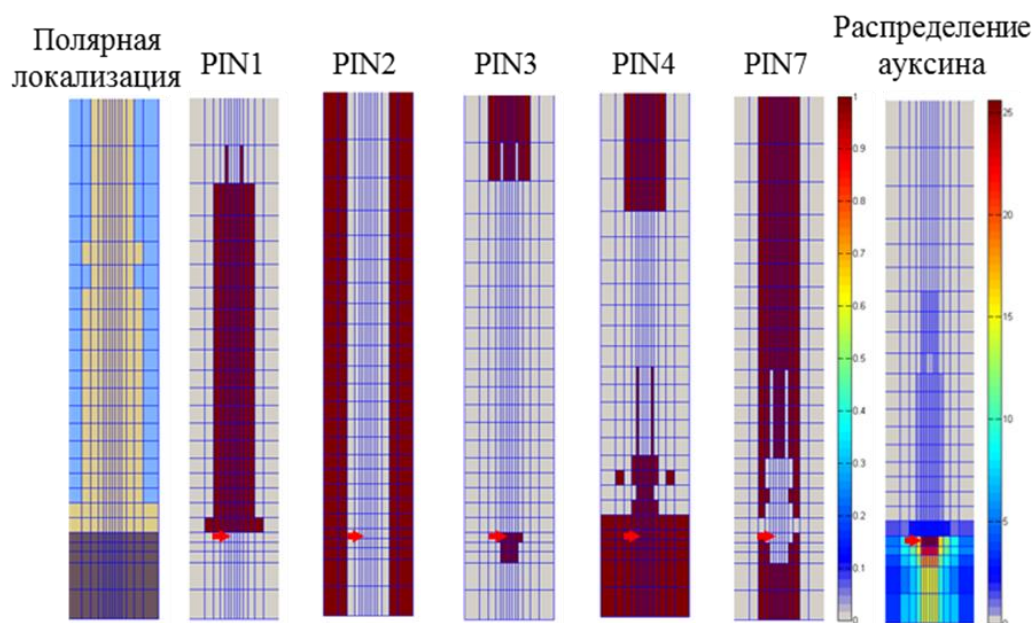
**Рисунок 3. Графики зависимости изменения максимальной интенсивности свечения репортерных белков или специфических антител к белкам PIN от концентрации НУК. По оси у показано во сколько раз изменилась экспрессия PIN. \* $p$ -value < 0.05; \*\* < 0.01; \*\*\* < 0.001.**

Повышенный эндогенный уровень ауксина в мутантах *uic1-D* вызывал значительное снижение уровень экспрессии PIN2, для остальных PIN изменения были недостоверными.

### **Глава 3. Математическое моделирование паттернов экспрессии PIN транспортеров в корне**

Для проверки гипотезы (Рис. 2) на непротиворечивость использовалась математическая модель типа «клеточный автомат», разработанная ранее Федором Казанцевым (ИЦиГ СО РАН) для описания распределения морфогена по прямоугольному массиву клеток. В данной работе мы развили модель для описания перераспределения ауксина по слою клеток, расположенных на продольном срезе меристемы корня, с учетом регуляции дифференцировки клеток (выбор экспрессирующихся в клетке PIN транспортеров ауксина и их полярной локализации) в зависимости от дозы ауксина. При развитии модели мы использовали принцип ауксин-зависимой экспрессии PIN, предложенный ранее в модели Мироновой и соавторов [Mironova et.al., 2012], экстраполировав его на все PIN белки в соответствии с экспериментальными данными (глава 2.4.2.3.). Также, в модели были учтены различия в размерах клеток меристемы.

В разделах 3.1 – 3.3 описаны моделируемая область, правила работы клеточного автомата и математическая реализация модели. В разделе 3.4 были подобраны параметры модели в соответствии с двумя принципами. Во-первых, максимум концентрации ауксина должен был формироваться в пятом ряду клеток, что соответствует экспериментальным данным о распределении ауксина. Во-вторых, в решении модели должны сформироваться все клеточные типы (различающихся по набору экспрессирующихся PIN и их полярности), реализуемые в гипотезе. В результате численного расчета модели с нулевыми начальными данными и подобранным набором параметров мы получили стационарное решение, в котором паттерн распределения ауксина и паттерны PIN белков хорошо согласовывались с экспериментальными данными (Рис. 4).



**Рисунок 4. Стационарное решение математической модели. Полярная локализация обозначена цветом: голубой – локализация PIN на нижней стороне, желтый – на верхней, серо-фиолетовый – на всех сторонах клетки. Максимум концентрации ауксина – красный, минимум – серый. Красные стрелки указывают на положение ПЦ в реальном корне.**

На следующем этапе в разделе 3.4.1, проводилось исследование стационарного решения на устойчивость к изменению начальных данных, порогов концентрации ауксина для изменения полярной локализации и для включения/выключения экспрессии PIN белков. Изучалась как устойчивость распределения ауксина, так и устойчивость доменов экспрессии PIN к варьированию параметров. Для предложенной в данной работе математической модели было показано, что формирование максимума концентрации ауксина в пятой клетке от кончика корня более устойчиво, чем домены экспрессии PIN как при изменении начальных условий, так и при варьировании порогов экспрессии PIN и их полярной локализации. Кроме того, интервалы варьирования параметров с устойчивым положением максимума ауксина значительно превышали таковые, наблюдаемые для модели в обыкновенных дифференциальных уравнениях [Mironova et.al., 2012].

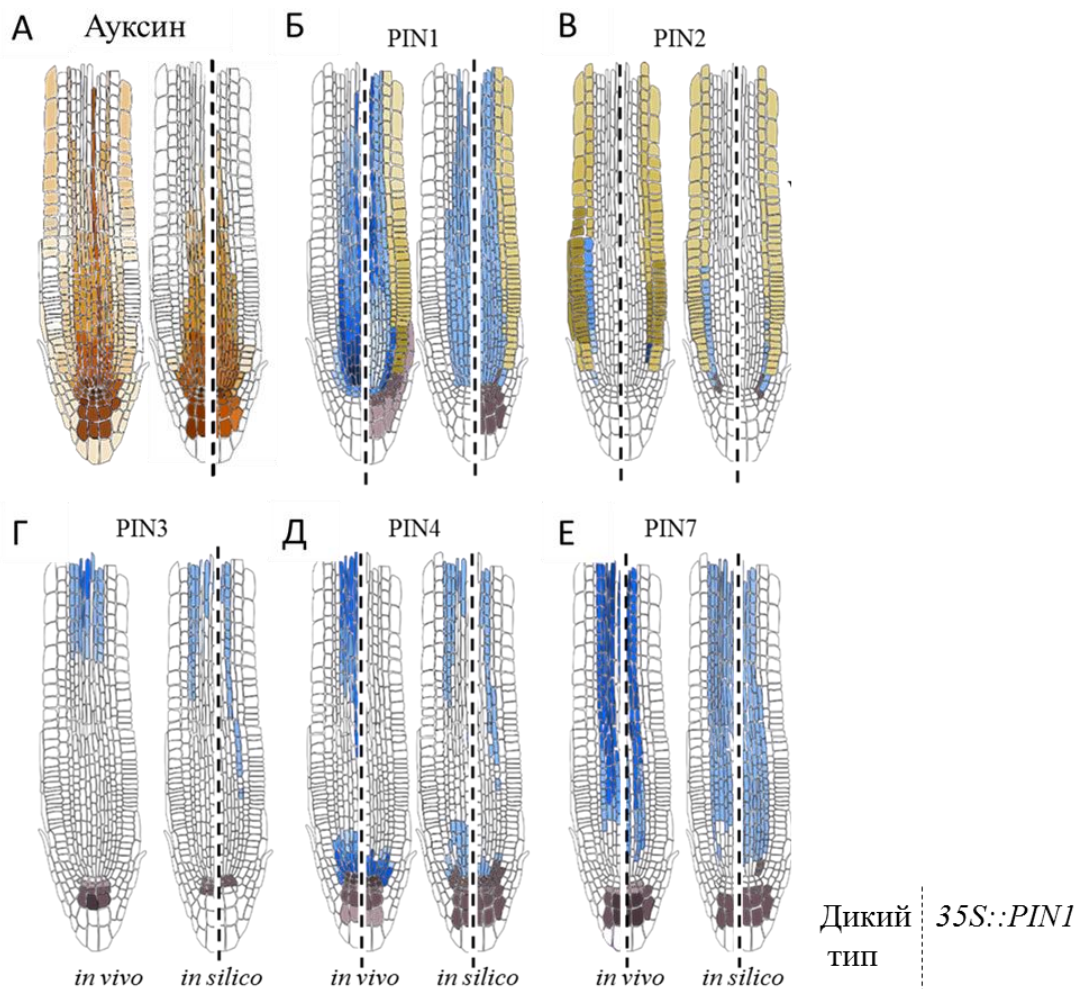
В разделе 3.5, приводятся результаты сравнительного анализа локализации PIN белков в стационарном решении модели с данными эксперимента полученными для дикого типа. Получившийся паттерн распределения ауксина и домены экспрессии белков транспортеров семейства PIN хорошо согласовывались с данными эксперимента. Это говорит о непротиворечивости предложенной нами гипотезы (Рис. 2В, Г), то есть экспериментально показанной регуляции ауксином

экспрессии PIN-белков в корне достаточно для генерации позиционной информации, позволяющей адекватно локализовать домены PIN белков.

В разделе 3.6., доработанная математическая модели была проверена в независимом эксперименте на трансгенной линии *35S::PIN1* со сверхэкспрессией гена *PIN1*. Для того чтобы исследовать распределение ауксина в этой линии в модели, мы задали экспрессию PIN1 во всех клетках и при любых концентрациях ауксина. В результате расчетов модели для этой линии был предсказан сниженный уровень ауксина в меристеме корня. Это изменение в распределении ауксина повлияло на размеры доменов все исследуемых PIN белков. Несмотря на то, что PIN1 экспрессировался во всех клетках, его полярная локализация различалась. В клетках, соответствующих корневому чехлику он локализовался на всех сторонах клетки, в наружных слоях преимущественно на верхней стороне, за исключением кортекса в меристематической зоне, во всех остальных клетках PIN1 располагался на нижней стороне (рис. 5Б). Домен экспрессии PIN2 в кортексе, где он находится на нижней стороне сократился по сравнению с диким типом (рис. 5В). Домен PIN3 редуцировался в клетках соответствующих колумелле (рис. 5Г). В сосудистой системе домен PIN4 сократился в проксимальной меристеме (рис. 5Д). Напротив, домен PIN7 удлинился в сосудистой системе, и расширился в колумелле на 1 ряд (рис. 5Е).

Чтобы проверить предсказания модели, мы провели экспериментальный анализ экспрессии PIN в трансгенных растениях *35S::PIN1*, с помощью специфических антител. Анализ микроизображений подтвердил большинство предсказаний модели о доменах экспрессии исследуемых PIN и их полярной локализации (Рис. 5).





**Рисунок 5.** Паттерны распределения ауксина и экспрессии PIN белков на продольном срезе кончика корня дикого типа и в трансгенном растении *35S::PIN1 A. thaliana* в *in vivo/in silico* экспериментах. Результаты моделирования преобразованы из прямоугольного массива в макет корня *A. thaliana*.

**А.** Схема *in vivo* (слева) показывает распределение ауксина в диком типе. Схема *in silico* (справа) показывает распределение ауксина, формирующиеся в стационарном решении математической модели для дикого типа и *35S::PIN1*. Максимум концентрации ауксина – коричневый, минимум – белый. **Б-Е.** Схемы паттернов экспрессии PIN1-4 и PIN7, соответственно. Схемы *in vivo* созданы в результате анализа микрофотографий корней с иммулокализацией PIN белков и репортерных линий PIN::PIN-GFP. Градиент цвета в схемах *in vivo* отражает интенсивность свечения репортерного белка. Схемы *in silico* соответствуют расчетам математической модели. Полярная локализация белков на *in vivo/in silico* изображениях обозначена цветами: голубой – локализация на нижней стороне, желтый – на верхней, серо-фиолетовый – на всех сторонах.

## ВЫВОДЫ

1. На основе компьютерного анализа конфокальных изображений составлены карты паттернов экспрессии белков-транспортеров ауксина PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 и определена вариабельность доменов их экспрессии в диком типе *A. thaliana*;
2. Предложена гипотеза о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии PIN белков и их полярной локализации в клетках корня. Ауксин в низких концентрациях активирует экспрессию PIN2, в промежуточных – PIN1, а экспрессию PIN3, PIN4, PIN7 как при низких, так и при высоких концентрациях. Также при низких концентрациях ауксина PIN белки локализуются на мембране клеток по направлению к побегу, при промежуточных – по направлению к корню, а при высоких – PIN белки локализуются на всех сторонах клетки.
3. Непротиворечивость гипотезы показана в экспериментах и с помощью математической модели:
  - В экспериментах по обработке растений дикого типа в течении 24 часов разными концентрациями НУК мы наблюдали значимое повышение экспрессии PIN1 при 0.1  $\mu\text{M}$ , PIN2 при 0.01  $\mu\text{M}$  и 0.1  $\mu\text{M}$ , PIN3 при 0.01  $\mu\text{M}$ , PIN4 при 0.1  $\mu\text{M}$  и 0.5  $\mu\text{M}$ , PIN7 при 0.05  $\mu\text{M}$ , что подтверждает очередность включения PIN белков ауксином, предложенную в гипотезе;
  - В растениях *uic1-D*, в которых увеличен уровень эндогенного ауксина, мы наблюдали пониженную экспрессию PIN2;
  - Математическое моделирование распределения ауксина в меристеме под управлением заложенных в гипотезе правил показало формирование экспериментально-наблюдаемых доменов экспрессии PIN белков;
4. Для растений *35S::PIN1* со сверхэкспрессией гена PIN1 математическая модель предсказала изменения доменов экспрессии PIN белков и их полярной локализации. Все предсказания модели были подтверждены в экспериментах по иммунолокализации PIN белков.



## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации

1. **В.В. Коврижных**, Н.А. Омелянчук, Т.П. Пастернак, В.В. Миронова. Ключевая роль PIN белков в транспорте ауксина в корне *Arabidopsis thaliana* L.// Вавиловский журнал генетики и селекции растений. 2014, Т. 18, № 4/1, С 797-806
2. Omelyanchuk N.A.#, **Kovrizhnykh V.V.#**, Oshchepkova E.A#, Pasternak T.P, Palme K, Mironova V.V. A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in *Arabidopsis thaliana* root //BMC plant biology. 2016, Т 16, № 1, С 1-12. #равный вклад.

### Тезисы

1. **Chernova V.V.**, Ermakov A.A., Doroshkov A.V., Omelyanchuk N.A., Mironova V.V. – Analysis of transcriptional and post transcriptional regulation of auxin carrier AtPIN1. //BGRS conference, Novosibirsk. June. 2012.
2. Ermakov A.A., **Chernova V.V.**, Doroshkov A.V., Sangaev S.S., Omelyhuk N.A., Kochetov A.V., Mironova V.V. – The model for auxin regulated AtPIN1 expression in the root apical meristem. //PlantGen Conference, Irkutsk, July. 2012.
3. **Чернова В.В.**, Ермаков А.А., Дорошков А.В., Омелянчук Н.А., Миронова В.В. - Транскрипционная и посттранскрипционная регуляция ауксином активности гена его белка-транспортера PIN1 в корне *Arabidopsis thaliana* L.//II(X) международная ботаническая конференция молодых ученых. Санкт- Петербург, 2012
4. **В. В. Чернова** – Ауксин-зависимая регуляция активности экспрессии гена PIN1 в корне *Arabidopsis thaliana* L.//МНСК. Новосибирск, 2013
5. **V. V. Chernova**, A.V. Doroshkov, N.A. Omelyanchuk, V.V. Mironova - PIN-transporters in the root meristem of *Arabidopsis thaliana* L: image analysis of expression patterns. // BGRS conference, Novosibirsk. June. 2014.
6. **V. V. Kovrizhnykh**, V. V. Mironova, F. V. Kazantsev, N. A. Omelyanchuk1, T. P. Pasternak. The compensatory mechanism providing for the root meristem development in pin mutants of *A. thaliana*. PlantGenConference, Novosibirsk. June. 2015.
7. **V.V. Kovrizhnykh**, T. Pasternak, N.A. Omelyanchuk, V.V. Mironova – Expression map of PIN transporters in the root meristem of *Arabidopsis thaliana*. //Plant signaling and behavior, Санкт-Петербург, 2016.
8. **V. V. Kovrizhnykh**, F.V. Kazantsev, N.A. Omelyanchuk, V.V. Mironova. Mathematical modeling a reciprocal interactions between auxin and its PIN transporters in the root tip of *A. thaliana* L.// BGRS conference, Novosibirsk. August. 2016.
9. **В.В. Коврижных**, Т. Пастернак, Н.А. Омелянчук, В.В. Миронова. Дозозависимая регуляция ауксином PIN экспрессии и полярной локализации в меристеме корня *A. thaliana* L. // V Международная школа для молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология», Санкт-Петербург. Октябрь. 2016.
10. **V.V. Kovrizhnykh**, T. Pasternak, F.V. Kazantsev, N.A. Omelyanchuk, V.V. Mironova. PINs expression maps are dose-dependent regulated by auxin in the root meristem of *Arabidopsis thaliana*//Auxin 2016 conference, Hainan, China. October. 2016.

Подписано к печати  
Формат бумаги 60×90<sup>1/16</sup>. Печ. л. 1. Уч.-изд. 0,7  
Тираж 110 экз. Заказ №

Отпечатано на полиграфической базе ИЦиГ СО РАН  
630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10