

**Федеральный исследовательский центр
Институт Цитологии и Генетики
Сибирского Отделения РАН**

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

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. В.В. Миронова.

Новосибирск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Корень, как объект исследования.....	13
1.1.1. Анатомическое строение корня.....	14
1.1.2. Строение АМК.....	15
1.2. Ауксин.....	16
1.2.1. Механизмы действия ауксина.....	17
1.2.2. Метаболизм ауксина.....	18
1.2.3. Другие вещества с ауксиновой активностью.....	19
1.2.4. Методы измерения ауксина.....	19
1.2.5. Распределение ауксина в АМК.....	21
1.2.6. Транспорт ауксина.....	23
1.2.7. Полярный транспорт ауксина.....	24
1.3. Семейство PIN белков.....	24
1.3.1. Роль экспрессии PIN генов для поддержания функционирования АМК.....	25
1.3.2. Локализация PIN белков в клетке.....	27
1.3.3. Регуляция экспрессии генов PIN ауксином.....	28
1.3.3.1. Транскрипционная регуляция экспрессии PIN генов.....	28
1.3.3.2. Регуляция локализации белков PIN на мембране.....	29
1.3.3.3. Подавление экспрессии PIN белков.....	30
1.3.4. Компенсаторные изменения экспрессии PIN генов в случае мутаций одного из них.....	30
1.4. Компьютерный анализ изображений с конфокального микроскопа.....	31
1.4.1. Программы для анализа изображений.....	32
1.5. Математическое моделирование пространственного распределения морфогенов.....	34

1.5.1. Математическое моделирование динамики распределения ауксина PIN транспортерами.....	37
1.6. Заключение по обзору литературы.....	40
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ ЭКСПРЕССИИ PIN ТРАНСПОРТЕРОВ В КОРНЕ.....	42
2.1. Растительный материал и условия выращивания.....	42
2.2. Микроскопический анализ.....	42
2.3. Обработка изображений.....	43
2.4. Результаты.....	44
2.4.1. Описание особенностей экспрессии PIN белков в диком типе.....	44
2.4.1.1. Детальное описание паттерна экспрессии PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 в корне растений дикого типа <i>A. thaliana</i>	45
2.4.1.2. Экспрессия PIN1 в АМК.....	51
2.4.1.3. Экспрессия PIN1 в боковых корнях.....	52
2.4.1.4. Экспрессия PIN1 в гипокотиле <i>A. thaliana</i>	55
2.4.1.5. Заключение по анализу экспрессии PIN в норме.....	56
2.4.2. Определение роли ауксина в экспрессии PIN.....	56
2.4.2.1. Карта распределения ауксина по разным данным.....	56
2.4.2.2. Формулировка гипотезы о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии PIN белков и их полярной локализации.....	58
2.4.2.3. Экспериментальный анализ влияния экзогенного ауксина на экспрессию PIN белков.....	60
2.4.2.4. Экспериментальный анализ влияния повышения эндогенного уровня ауксина на экспрессию PIN белков.....	62
2.4.2.5. Влияние ауксина на полярную локализацию PIN.....	63
2.4.2.6. Функциональная избыточность PIN1.....	63
2.4.2.7. Заключение по экспериментальному исследованию роли ауксина в экспрессии PIN.....	65

ГЛАВА 3. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ ЭКСПРЕССИИ PIN ТРАНСПОРТЕРОВ В КОРНЕ.....	67
3.1. Моделируемая область клеточного автомата.....	68
3.2. Правила работы клеточного автомата.....	69
3.3. Математическая интерпретация модели.....	71
3.4. Подбор параметров модели.....	73
3.4.1. Исследование стационарного решения на устойчивость.....	76
3.4.1.1 Устойчивость распределения ауксина к изменению начальныб данных модели.....	76
3.4.1.2 Устойчивость распределения ауксина к изменению порогов на переключение полярности.....	77
3.4.1.3. Устойчивость распределения ауксина к изменению порогов включения/выключения PIN белков.....	79
3.4.2. Устойчивость доменов экспрессии PIN белков к варьированию параметров.....	79
3.5. Сравнительный анализ локализации PIN белков в <i>in vivo</i> и <i>in silico</i> экспериментах.....	81
3.6. Математическая модель для <i>35S::PIN1</i>	83
3.7. Экспериментальная проверка предсказаний расчетов модели для <i>35S::PIN1</i>	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
ВЫВОДЫ.....	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Основы изучения гормональной регуляции роста в растениях были заложены в XIX веке Чарльзом Дарвином. В экспериментах по одностороннему освещению проростков *Phalaris* он предположил наличие некоторого стимула, перемещение которого из верхней части побега в нижнюю приводит к формированию фототропического изгиба побега. В 1935 г. Ф. Кегль определил, что этим стимулом является индол-3-уксусная кислота (ИУК) и назвал его ауксином (от греч. *áuxein* – увеличиваться, расти).

Фитогормон ауксин играет важную роль в регуляции всех ростовых процессов растения, в том числе в инициации развития новых органов, росте, делении и дифференцировке клеток [95]. Значительная часть ауксина синтезируется в апикальных меристемах надземной части растения и затем переносится к корню, обеспечивая там развитие боковых и придаточных корней, а также поддержание ниши стволовых клеток в меристеме главного корня. Многообразие физиологических эффектов ауксина объясняется дозозависимыми механизмами действия ауксина и его неравномерным распределением в ткани [17]. Межклеточное перемещение ауксина осуществляется за счет активного транспорта и пассивной диффузии. Гены семейства *PIN-FORMED* (*PIN*) кодируют трансмембранные белки-транспортеры, которые осуществляют отток ауксина из клетки [78], [100]. В силу неравномерного (полярного) расположения PIN транспортеров на мембране клетки, в ткани формируются направленные потоки ауксина. Например, в результате объединения и взаимодействия потоков ауксина на уровне отдельных клеток в кончике корня формируется распределение ауксина с максимумом в клетках покоящегося центра (ПЦ), определяющего поддержание ниши стволовых клеток в корне [35].

Распределение ауксина обеспечивает формирование позиционной информации для морфогенетических процессов [17], а изменение этого

распределения является ключевым при адаптации растения к окружающей среде [88]. Пластичность распределения ауксина в большой степени реализуется через молекулярно-генетическую регуляцию экспрессии PIN белков [4]. Поэтому понимание механизмов регуляции экспрессии PIN белков является ключевым в исследовании многих морфогенетических процессов.

Известно, что ауксин регулирует экспрессию своих транспортеров на разных уровнях, включая транскрипцию, стабильность белка, их локализацию на мембране [41], [44], [83], [96], [97]. Исследование эффекта положительных и отрицательных обратных связей в генной сети регуляции транспорта ауксина на формирование распределения ауксина требует применения комбинированных экспериментально-компьютерных методов.

Биоинформатические и системно-биологические методы становятся неотъемлемой частью всех этапов биологического исследования морфогенеза, заметно расширяя возможности исследователя. В экспериментальной части важным этапом является получение микроскопических изображений, компьютерный анализ молекулярно-генетических маркеров и сигналов необходим для выявления тенденций и статистически-достоверных закономерностей. Методы математического моделирования позволяют изучать роль выявленных закономерностей на процессы развития, Результаты расчетов моделей не только описывают экспериментально-наблюдаемые процессы, но также предоставляют предсказания, которые могут быть проверены экспериментально. Как результат, методы математического моделирования давно и успешно применяются в исследованиях распределения ауксина в корне растения [12], [48], [69].

Цели и задачи

Целью данной работы является определение роли ауксина в формировании паттернов экспрессии семейства PIN-транспортёров в меристеме корня *A. thaliana*. Для этого было поставлено 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 микроскопа 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

Исследование опосредованных ауксином морфогенетических процессов обычно сопровождается анализом экспрессии PIN транспортёров ауксина. Как результат, различные данные о паттернах экспрессии PIN рассредоточены по сотням публикаций, но их не всегда можно сопоставить и часто информация не полностью соответствуют друг другу. Целью данного исследования являлся систематический анализ данных по экспрессии генов семейства *PIN* в корне растения. Впервые дано исчерпывающее описание особенностей экспрессии PIN1-PIN4, PIN7 в меристеме корня *Arabidopsis thaliana* и определена вариабельность их доменов в растениях дикого типа. На основе сопоставления паттернов экспрессии PIN и распределения ауксина предложена гипотеза о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии PIN белков и их полярной локализации. В растениях с изменённым уровнем ауксина выявлены качественные и количественные изменения в паттернах PIN, 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, ведь это потребовало бы динамического переписывания уравнений модели. В данной работе распределение ауксина исследовалось в модели типа клеточный автомат, в которой изменение полярности клеток можно описывать 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.

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.

Теоретическая и практическая ценность

Понимание механизмов действия ауксина необходимо как для улучшения агрономически важных качеств культурных растений, например, увеличения биомассы растения, так и для изучения фундаментальной биологической проблемы - морфогенеза растений.

Математическая модель, предложенная в данной диссертационной работе может быть использована для реконструкции позиционной информации в

меристеме корня в ответ на внешние стимулы. В этом случае модель будет предсказывать способы сохранения ниши стволовых клеток корня.

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

Апробация работы

Материалы работы вошли в отчеты по грантам Российского фонда фундаментальных исследований и Российского научного фонда. Основные результаты работы были представлены на научных конференциях в виде устных и стендовых докладов: Международные конференции по биоинформатике, структуре и регуляции генома (BGRS 2012, BGRS 2014, г. Новосибирск, Россия), II (X) международная ботаническая конференция молодых ученых (2012, г. Санкт-Петербург, Россия), международные конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (2012, г. Иркутск, 2015, г. Новосибирск, Россия), 4-ом международном симпозиуме «Plant signaling and behavior» (2016, г. Санкт-Петербург, Россия), конференции «Auxin» (2016, г. Санья, Китай).

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, V 16, N 1, С 1-12. #равное участие.

Структура работы

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.

Благодарности

Выражаю свою искреннюю благодарность научному руководителю диссертации к.б.н. В.В. Мироновой. Выражаю огромную благодарность Н.А. Омелянчук, за ценные замечания и предложения, сделанные в ходе конструктивного обсуждения данной работы. Благодарю Ф.В. Казанцева за консультации и оказанную им помощь в развитии математической модели. Выражаю свою благодарность Тарасу Пастернак за предоставленные экспериментальные данные. Благодарю коллег из Сектора системной биологии и морфогенеза растений ИЦиГ СО РАН, а также к.б.н. К.В. Гунбина, к.б.н. А.В. Дорошкова и д.б.н. Лихошвай В.А. за консультации и плодотворные научные дискуссии.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АМК – апикальная меристема корня

БКЧ – боковой корневой чехлик

ИУК –индолил-3-уксусная кислота (indol-3-acetic acid, IAA), наиболее распространенная активная форма ауксина

КА – клеточный автомат, дискретная динамическая система, представленная в виде совокупности клеток одинаковым образом соединённых между собой

МЗ – меристематическая зона корня, где клетки активно делятся

НУК– α -нафталилуксусная кислота (NAA) искусственный аналог ауксина

ПЦ – покоящийся центр в корневой меристеме растений, клетки которого практически не делятся в развитии растения

ЭЗ – зона элонгации, в которой клетки переходят к росту

2,4-Д – 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота, искусственный аналог ауксина

АВСВ – В подсемейство АВС белков-транспортеров, локализующийся на мембране клеток и обеспечивающий активный отток и приток ауксина в клетку

ARF – Auxin response factors, транскрипционные факторы первичного ответа на ауксин

Aux/IAA – Auxin/indole-3-acetic acid, гены первичного ответа на ауксин. Экспрессия *Aux/IAA* на уровне транскрипции регулируется ARF факторами, на посттрансляционном уровне количество *Aux/IAA* в клетке регулируется SCF-TIR1 комплексом в зависимости от концентрации ауксина.

AUX1 – Auxin resistant 1, белок-транспортер ауксина, локализующийся на мембране клеток и обеспечивающий активный приток ауксина в клетку

PII-VENUS – репортёрная ауксин-чувствительная конструкция, состоящая из нескольких последовательностей кодирующих домен II *Aux/IAA* белков сшитых с 35S промотором

DR5 – репортёрная ауксин-чувствительная конструкция, состоящая из нескольких повторяющихся мотивов, содержащих последовательность TGTCTC сшитых с 35S промотором

GH3 – IAA-amido synthase GH3, гены первичного ответа на ауксин. Экспрессия *GH3* на уровне транскрипции регулируется ARF факторами.

LRP – зачаток бокового корня

PIN – Pin-Formed, семейство белков-транспортеров ауксина, ассиметрично локализующихся на мембране клеток и обеспечивающий активный отток ауксина из клетки

PILS – PIN-LIKES, семейство белков-транспортеров ауксина, обеспечивающих его транспорт внутри клетки между цитоплазмой и ЭПР

RPS5A – промотор гена рибосомального белка S5 арабидопсиса, активный в делящихся клетках

R2D2 – репортёрная ауксин-чувствительная конструкция, состоящая из комбинации DII и mDII сшитых с промотором RPS5A

SCF – Skp1-Cullin-F-box, белковый комплекс, убиквитин лигаза

TIR1 – Transport inhibitor response 1, рецептор ауксина, входящий в состав SCF комплекса, и обеспечивающий деградацию *Aux/IAA*

YUCCA – семейство генов кодирующих ферменты основного пути биосинтеза ИУК из индол-3-пировиноградной кислоты

yus1-D – трансгенное растение со свехэкспрессией гена YUCCA1

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Корень, как объект исследования

Важным условием для выхода растений на сушу было развитие специализированных тканей и органов. Корень выполняет ряд важных функций в развитии растения, через него растения поглощают из почвы воду и минеральные вещества [6]. Другая не менее важная функция корня - закрепление растения в почве. Кроме того, в корнях осуществляется биосинтез вторичных метаболитов, алкалоидов и некоторых фитогормонов (цитокининов и гиббереллинов), необходимых для роста и развития надземной части растения. Нередко корень приобретает и другие функции, например, является местом хранения запасных питательных веществ, а также обеспечивает взаимодействие с другими организмами (корнями других растений, микроорганизмами и грибами), находящимися в почве.

С конца прошлого века корень растений (чаще всего модельного растения *Arabidopsis thaliana* L.) используется в качестве модельного объекта для изучения молекулярных механизмов развития растений ввиду простого строения, которое мало меняется по мере роста корня [14]. Выделяют три типа корней: основной (главный), боковые и придаточные. Главный корень развивается из меристемы корня зародыша растения, а боковые и придаточные развиваются постэмбрионально из клеток перцикла [62]. Двудольные и голосеменные растения, как правило, имеют стержневую корневую систему, которая состоит из главного корня и боковых корней первого и следующих порядков [34]. Например, такова структура корня *A. thaliana*. У однодольных растений зародышевый корешок отмирает на ранних этапах развития, в силу чего главный корень не развивается. Вместо него в районе корневой шейки (гипокотилия) образуются придаточные корни, которые, в свою очередь, могут давать боковые корни. Сформированная подобным образом корневая система называется мочковатой [3].

1.1.1. Анатомическое строение корня

Главные, боковые и придаточные корни *A. thaliana* имеют одинаковую достаточно простую анатомическую структуру с радиальной симметрией, в которой несколько концентрических слоев (эпидермис, кортекс, эндодермис, перицикл) окружают пучки сосудистой ткани [32].

Эпидермис, самый наружный слой клеток, служит для защиты внутренних слоев и обеспечивает активное всасывание растением содержащихся в почве воды и минеральных солей. Эпидермис состоит из двух типов клеток: трихобластов, которые могут образовывать корневые волоски (длиной до 2 мм) и атрихобластов, соответственно не образующие их [6], [27]. Благодаря корневым волоскам, поглощающая поверхность корня увеличивается в десятки раз, а само растение прочно закрепляется в почве. Через эпидермис в почву выделяются вещества, облегчающие избирательное поглощение ионов, а также происходит взаимодействие растения с бактериями, грибами и другими организмами, населяющими ризосферу – слой почвы, примыкающий к корню.

Непосредственно под эпидермисом располагается кортекс, у *Arabidopsis* он содержит один слой клеток. В некоторых других видах этого семейства, таких как *Brassica napus* и *Sinapis alba*, есть два концентрических кольца клеток кортекса [26]. Далее непосредственно под кортексом располагается эндодермис и представляет собой ряд плотно сомкнутых клеток (без межклетников). Отличительной особенностью этой ткани является видоизменения радиальной клеточной стенки, так называемые пояски Каспари, которые блокируют пассивный поток веществ, например, воды и растворенных в ней веществ в центральный цилиндр [32].

Центральный или осевой цилиндр (стела) состоит из проводящих тканей, окруженных перициклом. Перицикл представляет собой образовательную ткань, так как его клетки, прилежащие к протоксилемному пучку, способны дать начало боковому корню [62], [77]. Для проводящих тканей *A. thaliana* характерна билатеральная симметрия с двумя полюсами флоэмы и двумя полюсами ксилемы, расположенными перпендикулярно друг к другу [32] (Рис

1Б). По ксилеме движутся, в основном, вода и минеральные соли в восходящем направлении — от корней к другим частям растения, а по флоэме в обратном направлении — органические вещества, поступающие из листьев. Остальное пространство центрального цилиндра занимают клетки паренхимы и прокамбия, которые дифференцируются в камбий.

Вдоль корня можно выделить четыре зоны (корневой чехлик, апикальная меристема, зона растяжения, зона дифференцировки), выполняющих разные функции [6] (рис. 1А). На самом кончике корня находится корневой чехлик, который защищает апикальную меристему корня (АМК) от механических повреждений при углублении корня в почву. В АМК содержатся стволовые клетки, которые дают начало всем остальным тканям корня и обеспечивают его рост за счет постоянного деления клеток. Проксимальнее по отношению к этой зоне находится зона растяжения. В ней клетки растут вдоль оси корня, благодаря чему корень удлиняется. Далее располагается зона дифференцировки, в которой удлиненные ранее клетки различных типов окончательно созревают, здесь в большом количестве расположены корневые волоски, которые поглощают воду и питательные вещества [3].

1.1.2. Строение АМК

Апикальная меристема главного корня формируется в эмбриогенезе [6]. У проростка арабидопсиса АМК имеет длину около 250 мкм и содержит стволовые клетки (Рис. 1В). Поддержание пула стволовых клеток в меристеме корня обеспечивается благодаря покоящемуся центру (ПЦ), клеткам, период деления которых очень велик, более 200 часов [51], [94]. Вокруг клеток ПЦ расположены плюрипотентные клетки (инициали), которые дают всем начало тканям корня. Нижний слой инициалей состоит из клеток двух типов: одни дают начало колумелле, другие эпидермису и боковому корневому чехлику (БКЧ) [32]. Центральный слой содержит ПЦ, у *A. thaliana* он состоит из 4 клеток, по обе стороны от ПЦ расположены инициали первичной коры (эндодермиса и кортекса). Верхний слой – это инициали стели.

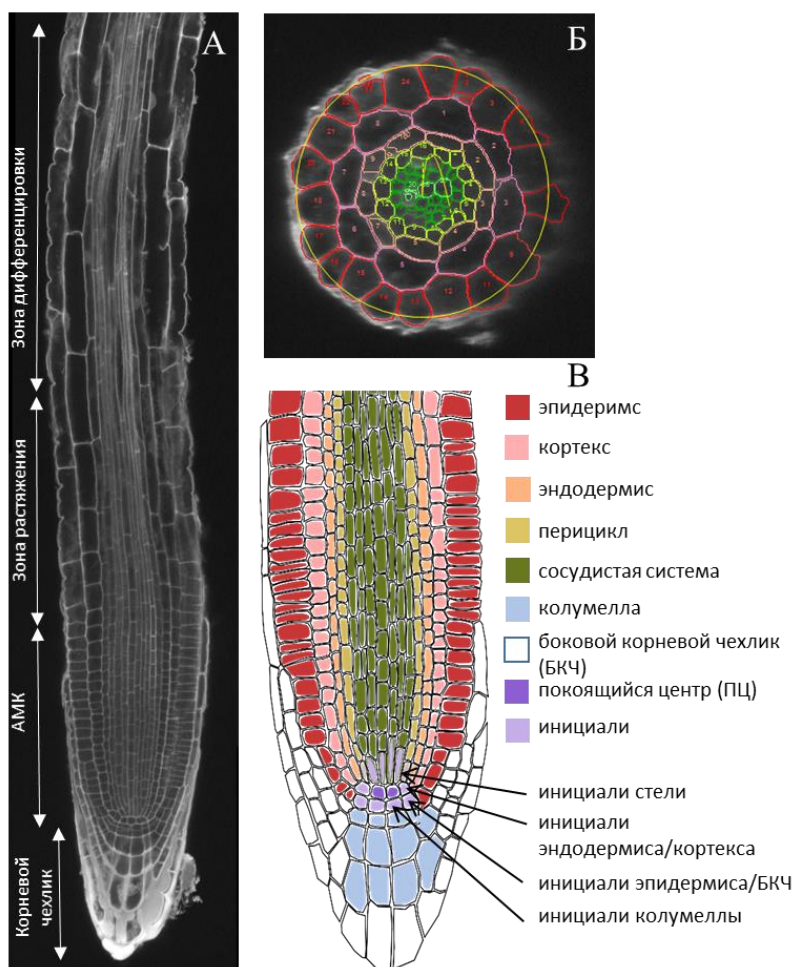


Рисунок 1. Строение кончика корня *Arabidopsis thaliana*. А, продольный срез кончика корня с указанием всех функциональных зон; Б, поперечный срез отражающий радиальное строение; В, строение апикальной меристемы корня

Процессы развития и функционирования АМК контролируются фитогормонами, одним из ключевых считается ауксин.

1.2. Ауксин

Одним из основных регуляторов процессов роста и развития является фитогормон ауксин [95]. В корне он определяет дифференцировку сосудистой ткани, инициацию боковых корней, поддержание ниши стволовых клеток в меристеме, обеспечивает ответ на факторы окружающей среды, например, гравитропизм.

1.2.1. Механизмы действия ауксина

Существование многочисленных физиологических эффектов ауксина объясняется, с одной стороны, его неравномерным распределением в тканях, и с другой стороны, дозозависимыми механизмами его действия [58], [96]. В зависимости от концентрации, ауксин по-разному действует на скорость деления и удлинения клеток: кривая дозовой зависимости имеет форму колокола, типичную для множества других клеточных ответов на ауксин [24]. В экспериментах по отсеканию кончика корня было показано, что через несколько часов может вновь сформироваться распределения ауксина с максимумом, отстоящим от нового кончика корня на определенном расстоянии [48], [68]. При этом регенерация меристемы и нормальное функционирования корня происходит только после восстановления паттерна распределения ауксина [104].

Основной механизм регуляции ауксином экспрессии генов происходит через ARF-Aux/IAA-зависимый сигнальный путь [92]. Сразу в двух лабораториях в 2005 году был открыт ядерный рецептор ауксина TIR1, который вместе с другими белками формирует убиквитин-лигазный комплекс SCF^{TIR1} [29], [52]. В отсутствие ауксина транскрипционные факторы ARF, обеспечивающие ответ на ауксин, образуют неактивные гетеродимеры с корепрессорами Aux/IAA. В присутствии ауксина F-бок домен белка TIR1 связывается с белками Aux/IAA, что регулирует их деградацию в 26S протеосоме [23], [50], а транскрипционные факторы ARF начинают активировать транскрипцию генов. В геноме *A. thaliana* найдено 29 генов *AUX/IAA* и 23 *ARF*; их экспрессия в разных типах клеток отличается, создавая достаточную молекулярную сложность для обеспечения множества различных ответов на ауксин [81], [89].

Стоит отметить, что, как и гормоны животных, все фитогормоны, в том числе и ауксин, действуют при очень низких концентрациях (10^{-6} – 10^{-12} М), поэтому контроль его оптимального количества происходит в клетках как на уровне регуляции метаболизма, так и скорости полярного транспорта [6].

1.2.2. Метаболизм ауксина

Наиболее активный природный ауксин – индол-3-уксусная кислота, синтезируется у всех растений, начиная с водорослей [9]. Ауксиновый метаболизм представляет собой сложную сеть, включающую процессы синтеза ИУК, ее инактивацию и катаболизм, что обеспечивает надежность системы регуляции концентрации этого фитогормона в клетках и тканях растения. В проростках ауксин синтезируется в апексе побега, в примордиях листьев и молодых листьях, во взрослом растении дополнительно может происходить синтез в других частях, в том числе и в корне [59].

Основной путь биосинтеза ауксина, в том числе и в АМК, происходит из L-триптофана, через индолил-3-пировиноградную кислоту, которая затем с помощью ферментов, кодируемых семейством *YUCCA* (*YUC*) превращается в ИУК [61]. Другие триптофан-зависимые пути синтеза осуществляются через индол-3-ацетамид, триптамин или индол-3-ацетальдоксин. Интересно, что превращение триптамина в ИУК также происходит под действием ферментов *YUC*. У *A. thaliana* семейство генов *YUCCA* кодирует 11 ферментов. В трансгенных растениях *yuc1-D*, сверхэкспрессирующих ген *YUC1*, уровень ауксина повышен в 1.5 раза. Эти растения характеризуется более коротким корнем и большим количеством боковых и придаточных корней [107]. Сверхэкспрессия других членов семейства *YUCCA* приводит к аналогичным фенотипам.

Из-за своей высокой активности, значительная часть ИУК (около 90%) находится в виде неактивных соединений (конъюгатов) с аминокислотами и сахарами [101]. Неактивные формы служат для поддержания гормонального гомеостаза ИУК, детоксикации ее излишков или ее запасания, либо являются транспортной формой ауксина [8], [9].

Кроме образования неактивных конъюгатов, инактивация ИУК может происходить за счет ее деградации, специфической (с помощью ИУК-оксидазы), либо неспецифической (полифенолоксидазой) [75]. В результате окисления ИУК образуются оксииндол-3-уксусная кислота, 7-гидрокси-

оксиндол-3-уксусная кислота, или индол-3-ацетил-аспарат, которые также могут образовывать необратимые конъюгаты, благодаря чему полностью инактивируются [72].

1.2.3. Другие вещества с ауксиновой активностью

Кроме ИУК, описано множество как природных, так и синтетических веществ, проявляющих ауксиновую активность. Эти вещества активно применяются в качестве удобрений, поскольку они обладают большей устойчивостью к разрушению и связыванию в тканях растений по сравнению с ИУК. Примерами других природных ауксинов являются индол-бутановая кислота (ИБК), индолил-3-пропионовая (ИПК) и индолил-3-масляная (ИМК) кислоты [9]. Среди синтетических аналогов ИУК выделяют две группы: хлорзамещенные феноксипроизводные (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т) и др.) и производные нафтилалкилкарбоновых кислот (1-нафтилуксусная кислота (1-НУК), ее калиевая соль (КАНУ), 2-нафтоксиуксусная кислота (2-НОУК)).

1.2.4. Методы измерения концентрации ауксина

При изучении механизма действия ауксина в развитии растений возникает необходимость оценки локальных концентраций гормона в ткани. В настоящее время существуют методики как прямого, так и косвенного измерения концентрации ауксина в тканях растения. Прямым методом определения концентрации ауксина является масс-спектрометрия. К сожалению, для проведения этого метода необходимо иметь значительные объемы исследуемого вещества, много превышающие объем отдельно взятой клетки. Поэтому этот метод позволяет оценить лишь среднее значение концентрации вещества на единицу массы ткани, например, в исследованиях [60] авторам удалось показать, что наибольший уровень ауксина наблюдается в участке корня, соответствующем меристеме.

Более детально изучение распределения ауксина в тканях корня проводилось в работе [79] с привлечением методов масс-спектрометрии, потоковой цитофотометрии и репортерных генов. Авторы использовали линии растений с репортерными генами, экспрессирующимися в определенных типах клеток (покоящийся центр, корневой чехлик, перицикл и т.д.). Выделив клетки заданного типа методом цитофотометрии, авторам удалось набрать достаточное количество материала для проверки уровня ауксина в этих клеточных типах масс-спектрометрией. В результате авторы создали карту распределения ауксина в различных тканях кончика корня *A. thaliana* по данным количественного определения концентрации ИУК в 14 различных репортерных линиях (Рис. 2А). Несмотря на высокое разрешение такого метода, в нем используются отдельные типы клеток и метод не может быть применен для оценки концентрации ауксина в отдельно взятой клетке или различий в соседних клетках.

Во многих исследованиях, посвященных изучению роли ауксина в корне, используются косвенные методы его детекции – репортерные ауксин-чувствительные конструкции, которые можно разделить на две группы. К первой группе относятся конструкции под управлением ауксин-чувствительного промотора DR5 [92], в которых в ответ на ауксин происходит синтез репортерного белка (β -глюкоронидазы, флуоресцентного белка или люциферазы). Синтетический промотор DR5 был получен путем сайт-направленного мутагенеза в природном ауксин-чувствительном сайте (AuxRE) промотора GH3 гена сои и состоит из тандема семи прямых повторов TGTCTC, сшитого с 35S минимальным промотором и геном, кодирующим репортерный белок (GFP или GUS). Недавно была создана улучшенная версия этой конструкции, названная DR5v2. Новая конструкция содержит девять повторов последовательности TGTCGG, которая имеет большую афинность к транскрипционным факторам ARF [21]. Механизм работы данных конструкций заключается в том, что в ответ на накопление ауксина происходит активация промотора, за которой следует синтез репортерного белка (GFP/GUS) в соответствующих клетках. Обе конструкции реагируют на ауксин в широком

диапазоне концентраций (10-1000 нМ ИУК), но показывают несколько отличные паттерны распределения ауксина в меристеме корня [58]. Кроме того, особенности данного типа конструкций не позволяют исследовать быстрое изменение распределения ауксина, так как ответ наблюдается только через 2 часа после обработки ауксином [98].

Вторая группа ауксин-чувствительных репортерных конструкций содержит ауксин-зависимый дегрон DII-VENUS, что приводит к противоположному эффекту на накопление ауксина в клетке – деградации репортерного белка [22], [58]. DII-VENUS представляет собой несколько последовательностей кодирующих домен II Aux/IAA белков, деградация которых регулируется ауксином, слитых с быстро созревающим белком YFP (VENUS). Репортерные конструкции DII-VENUS и mDII-VENUS экспрессируются под управлением 35S промотора во всех клетках растения и отражают изменения в уровне ауксина в клетках уже через несколько минут [98]. Для исследования меристемы корня хорошо подходит промотор гена рибосомального белка S5 арабидопсиса (RPS5A), поскольку он активен в делящихся клетках [100]. Недавно созданная версия DII (R2D2), содержит в одном трансгенном растении комбинацию конструкций DII и mDII, каждая из них находится под промотором RPS5A [58]. DII считана с тремя повторами последовательности репортерного белка VENUS – желтый сигнал, а mDII – красный сигнал. Накопление ауксина в клетке эта конструкция визуализирует как уменьшение желтого сигнала относительно красного.

1.2.5. Распределение ауксина в АМК

С помощью масс-спектрометрии [60], [79] и репортерных ауксин-чувствительных конструкций DR5 [92], DII-VENUS [22], R2D2 [58] были получены доказательства наличия градиентов концентрации ауксина в кончике корня *Arabidopsis thaliana* (Рис. 2).

Количественно было показано, что концентрация ИУК в кортексе, эндодермисе и стеле в меристематической зоне в 2 раза, а в ПЦ в 5 раз выше, чем в остальных тканях корня (Рис. 2А) [79].

С помощью DR5v2 в корне зарегистрирован максимум ауксина в инициалах колумеллы с некоторым падением уровня в покоем центре и самой колумелле и низким уровнем в перицикле и БКЧ [92]. DR5, напротив, подтверждает наибольший уровень ауксина в ПЦ (Рис. 2 Б) [82].

Более детально распределение ауксина в меристеме описывает DII-VENUS [22]. Наибольший уровень ауксина DII-VENUS регистрирует в покоем центре, инициалах и двух рядах клеток колумеллы, инициалах стели и их ранних потомках и в дифференцирующихся клетках ксилемы (Рис. 2 В). Другие клетки в проксимальной меристеме имеют более низкий уровень с минимумом в эпидермисе и кортексе. В дистальной части меристематической зоны (по другому называемой базальной меристемой или транзитной зоной) уровень ауксина значительно возрастает в наружных слоях [12].

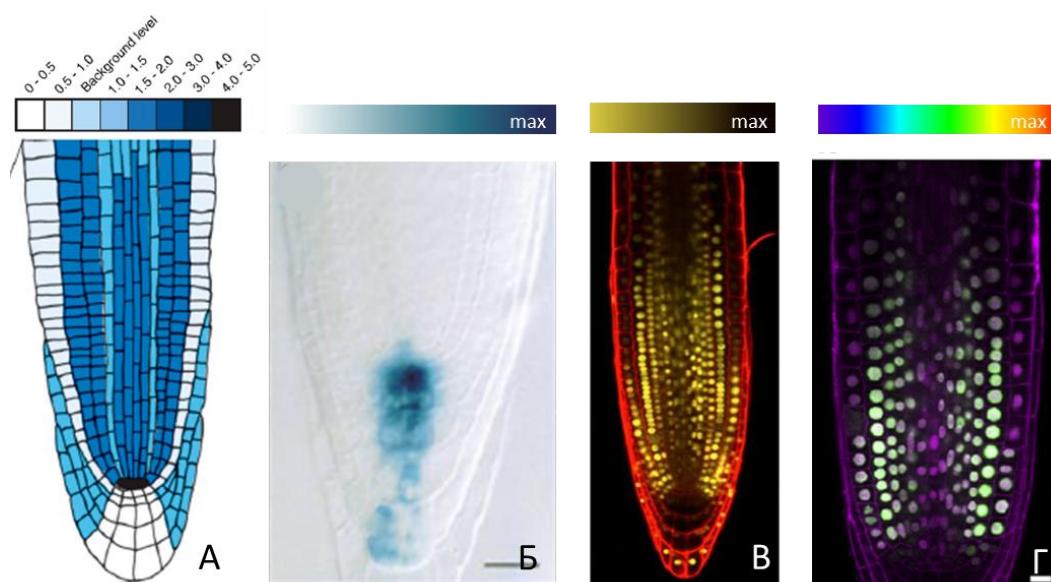


Рисунок 2. Распределение ауксина в АМК, выявленное с помощью методов: А, масс-спектрометрии [79]; Б – Г, репортерных ауксин-чувствительных конструкций DR5 [92], DII-VENUS [22], R2D2 [58].

Также как большинство описанных выше методов, R2D2 отмечает максимум ауксина в ПЦ и резкое снижение уровня ауксина после 6-7 рядов

клеток во всех клеточных линиях, кроме эпидермиса и ксилемы в которых изначально наблюдался более низкий уровень (Рис. 2 Г) [58].

В связи со сложным методом прямой детекции ауксина и погрешностью непрямых методов, исследование распределения ауксина в ткани все еще является проблематичным. Развитие математических моделей транспорта ауксина в меристеме позволяют уточнять это распределение [12], [48].

1.2.6. Транспорт ауксина

Отличительной особенностью ауксина, в сравнении с другими фитогормонами, является его система транспорта в растении: помимо транспорта по сосудам флоэмы, у него имеется активный полярный межклеточный транспорт. По флоэме перемещаются активные и конъюгированные формы ИУК, со скоростью 5-20 см/ч, что обеспечивает поддержание баланса связанных и свободных форм ауксина в органах и тканях [87]. Хемиосматическая гипотеза П. Рабери и П. Шелдрейка предложенная в 1973 году предполагала механизм транспорта ауксина через мембрану клетки, основываясь на химических свойствах ИУК (слабокислая кислота с pK 4,75). В слабокислой среде клеточных стенок и апопласта половина ИУК диссоциирует и, следовательно, не может проникнуть через липофильную мембрану. Оставшаяся недиссоциированная часть молекул ауксина проходит через мембрану по градиенту концентрации в клетку. Слабощелочная среда цитоплазмы приводит к диссоциации ИУК на H^+ и IUK^- . При этом протоны выводятся из клетки H^+ -АТФазой, а анион IUK^- нерастворим в мембранных липидах и постепенно накапливается. Такие электрохимические особенности ауксина позволили предположить, что регуляция концентрации ауксина в клетке осуществляется с помощью его мембранных белков-транспортеров [47]. Эта гипотеза вскоре подтвердилась.

1.2.7. Полярный транспорт ауксина

Неравномерному распределению ИУК в тканях способствует межклеточное перемещение за счет активного транспорта, который осуществляется тремя семействами белков [106]. AUXIN-INSENSITIVE1/LIKE AUX1 (AUX/LAX) обеспечивают приток ауксина в клетку [18]. PIN-FORMED семейство (PIN) и подсемейство ABC транспортеров (ABCB) осуществляют отток ауксина [20], [40], [46]. Кроме того, недавно было открыто новое семейство белков PIN-LIKES (PILS), которые осуществляют транспорт ИУК между цитоплазмой и ЭПР [13].

Другие природные и синтетические аналоги ИУК также транспортируются между клетками полярно [88]. Однако ИУК является хорошим субстратом для оттока из клеток, 2,4-Д, наоборот, лучше транспортируется в клетку, чем из нее.

В меристеме корня паттерн распределения ауксина регулируется в большей степени белками PIN, которые формируют полярные потоки в разных направлениях, благодаря различной мембранной локализации [4], [78], [101]. Мутанты по генам *PIN* в большей степени, чем мутанты по генам других транспортеров, воспроизводят фенотипы растений дикого типа, обработанных ингибиторами активного транспорта ауксина [88].

1.3. Семейство PIN белков

Семейство генов *PIN*, которое у *A. thaliana* кодирует 8 трансмембранных белков-транспортеров ауксина (PIN1-PIN8), впервые было описано именно на этом модельном объекте [55]. У мутантных растений с потерей функции гена *PIN1* цветки не развивались, а образовывались подобные булавке соцветия, что дало название семейству PIN [43], [73]. Представители данного семейства были найдены только в геномах наземных растений, начиная со мхов и плаунов, более точное эволюционное происхождение этих транспортеров не известно [70].

Структура всех PIN белков аналогична и ее можно описать как две трансмембранные гидрофобные области, отделённые центральной гидрофильной петлей. Структура гидрофобных областей консервативна у разных представителей PIN. Гидрофильная область, напротив, является более изменчивой, так как отвечает за локализацию белка и его активность [30].

На основе структурных отличий в размере гидрофильной петли все PIN *A. thaliana* разделены на два подсемейства [55]. К первому принадлежат белки PIN1 – PIN4 и PIN7, локализующиеся в плазматической мембране (ПМ) и характеризующиеся наличием ярко выраженной гидрофильной петли, которая возможно создает пору для переноса ауксина из клетки [30]. Кроме того, несмотря на значительно редуцированную гидрофильную петлю, PIN6 также относят к этому подсемейству на основе высокой гомологии трансмембранных участков его последовательности. В тоже время PIN6 возможно локализуется в ЭПР и вместе с представителями второго подсемейства, к которому относятся PIN5 и PIN8, обеспечивает внутриклеточное разделение ауксина между цитоплазмой и ЭПР (PIN5), между цитоплазмой и вакуолями (PIN8), а также гомеостаз ауксина в клетке [70].

1.3.1. Роль экспрессии PIN генов для поддержания функционирования АМК

Паттерны экспрессии белков PIN1 - PIN4 и PIN7 в меристеме корня частично перекрываются и способствуют формированию направленных потоков ауксина (рис. 3А), необходимых для формирования градиента концентрации этого гормона с максимумом в ПЦ [35].

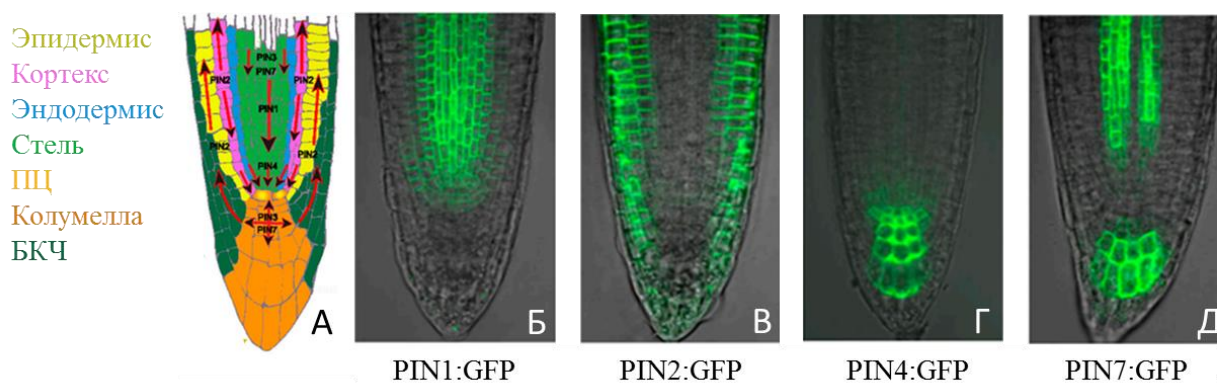


Рисунок 3. Паттерны экспрессии PIN в меристеме корня. А, направленные потоки ауксина, формируемые PIN белками; Б-Д, паттерны экспрессии PIN1, PIN2, PIN4, PIN7 детектированные соответствующими PIN:GFP репортерными линиями (адаптировано из [35]).

В растущем корне PIN1 в основном локализуется на нижней стороне клеток стели меристематической зоны (рис. 3Б), и формирует поток ауксина в направлении к ПЦ [37], [74], [96]. Также некоторые авторы отмечают дополнительную экспрессию PIN1 на нижней стороне клеток эндодермиса и кортекса и в покоем центре на всех сторонах клеток, но значительно слабее, чем в клетках сосудистой системы.

Белки PIN3, PIN4, PIN7 имеют схожий паттерн экспрессии, который состоит из двух отдельных частей: в сосудистой системе и колумелле. PIN3 экспрессируется без выраженной полярности в двух или трех рядах клеток колумеллы, на нижней стороне клеток сосудов и боковой стороне клеток перицикла в зоне элонгации [39]. PIN4 локализуется на всех сторонах вокруг клеток покоем центра, а также на нижней стороне в инициалах сосудистых клеток (рис. 3Г) и в сосудистых клетках в зоне элонгации. PIN7 находится на боковых и нижней сторонах сосудистых клеток в меристематической и зоне элонгации, тогда как в клетках колумеллы он совпадает с областью PIN3 (рис. 3Д) [20]. Таким образом, экспрессия белков PIN3, PIN4 и PIN7 в сосудистой системе способствуют усилению потока ауксина из побега, а в колумелле они обеспечивают перераспределение гормона.

Поток ауксина в направлении к побегу в наружных слоях корня создает белок PIN2. Он расположен на верхней стороне клеток эпидермиса и боковых

клетках корневого чехлика (рис. 3B) [40], [96]. В кортексе PIN2 локализуется сначала на нижней, а затем на верхней стороне клеток в меристематической зоне и зоне элонгации, соответственно.

Кроме того, белки PIN семейства локализованы на латеральной стороне мембраны в перicycle и эндодермисе, что опосредует латеральное перераспределение ауксина из нисходящего потока к ПЦ обратно в побег, формируя так называемую структуру «обратного фонтана» [20], [40], [48].

Аналогичная локализация PIN белков обнаружена в формирующихся боковых корнях [16]. Это способствует формированию локальных максимумов ауксина *de novo* и их поддержанию во всех придаточных и боковых корнях.

1.3.2. Локализация PIN белков в клетке

Асимметричное расположение PIN-транспортеров на плазматической мембране имеет ключевое значение в транспорте ауксина. Существует две гипотезы, объясняющие данный механизм: первая основана на рециркуляции PIN белков между мембраной и цитоплазмой, вторая на их деградации.

Синтезированные PIN белки путем экзоцитоза равномерно встраиваются во внешнюю мембрану клетки. Затем, согласно первой гипотезе, при помощи клатрин-зависимого эндоцитоза и вторичного экзоцитоза [44] происходит их внутриклеточная рециркуляция [53]. После интернализации везикул, содержащих белки PIN, происходит включение их в эндомембраны, согласно различиям в гидрофильной петле, которые обуславливают различия в клеточной локализации PIN белков. Механизм вторичного экзоцитоза обеспечивает рециркуляцию белков PIN в конкретные участки ПМ (например, PIN1 – на нижнюю сторону клетки, PIN2 – на верхнюю сторону). Кроме того, часть PIN-белков транспортируются везикулярным путем на деградацию.

Вторая гипотеза предполагает, что после эндоцитоза везикулы с PIN белками деградируют, а рециркуляция белков вносит очень маленький вклад в их полярную локализацию [90].

1.3.3. Регуляция экспрессии генов PIN ауксином

Экспериментально показано, что существует сложная сеть регуляции ауксином экспрессии своих белков-транспортеров семейства PIN, которая включает положительные и отрицательные обратные связи. Известно, что ауксин влияет на экспрессию PIN на транскрипционном, посттранскрипционном уровнях, а также через механизмы полярной локализации PIN – тем самым ауксин контролирует скорость своего оттока из клетки [41], [44], [83], [96], [97]. Механизмы регуляции экспрессии PIN белков различаются по их скорости, так, например, стабилизация PIN белков на ПМ – это быстрый и легко изменяемый процесс, в то время как ауксин-зависимая деградация осуществляется медленно [10].

1.3.3.1. Транскрипционная регуляция экспрессии PIN генов

В работе Виетен и соавторов (2005) экспериментально было показано, что обработка 6-дневных проростков растений дикого типа *A. thaliana* экзогенным ауксином (10 мкМ НУК) приводит к увеличению транскрипции генов всех PIN (*PIN1-PIN4*, *PIN6*, *PIN7*) в корне [96]. Также авторы определили, что у разных генов PIN разная скорость ответа на изменение уровня ауксина. Так, при добавлении 1 мкМ 2,4-Д значительное повышение уровня мРНК *PIN1*, *PIN3*, *PIN7* наблюдалось с 15 минут до 6 часов, *PIN2* через 1 час, а *PIN4* через 2 часа после применения ауксина. Кроме различий по скорости ответа для разных PIN, в данной работе было определено, что наибольшее изменение их экспрессии наблюдается при разных концентрациях ауксина. Оптимальная концентрация, индуцирующая экспрессию *PIN1*, *PIN7* – 1 мкМ 2,4-Д, а для *PIN2*, *PIN3* и *PIN4* – 10 мкМ 2,4-Д.

В экспериментах по обработке ауксином растений мутантных по генам *IAA14 (slr-1)* и *IAA17 (axr3-1)* не обнаружено значимого увеличения экспрессии генов PIN, по причине большей стабильности комплекса Аук/IAA с ARF.

1.3.3.2. Регуляция локализации белков PIN на мембране

Различия в полярной локализации PIN-белков контролируются обратимым фосфорилированием консервативных остатков Ser в гидрофильной петле этих белков. Фосфорилирование осуществляется киназами PID, WAG1 и WAG2 [30], [31]. Кроме того, экспрессия гена PID повышается ауксином. Дефосфорилирование PIN белков производят протеинфосфатазы PP2A и PP6 [11], [28], [67].

Ауксин, опосредованно через BIG, ингибирует эндоцитоз, что приводит к увеличению числа PIN белков в ПМ и тем самым усилению его вывода из клетки [44], [49]. На направление экзоцитоза PIN белков влияет фактор ARF-GEF, кодируемый геном *GNOM*, а его антагонисты, факторы ARF-GAP VAN3 направляют PIN белки на деградацию [45]. Мутация *gnom* является летальной, так как зародыши не могут сформировать оси полярности. Кроме того, показано, что киназа PID и фосфатаза PP2A, регулирующие полярность PIN, действуют антагонистически на скорость GNOM-зависимой рециркуляции PIN.

Длительное сохранение полярности PIN белков обеспечивается их способностью образовывать кластеры друг с другом и другими транспортерами ауксина. Например, ABCB19 стабилизирует белок PIN1 в полярных мембранных кластерах, снижая рециркуляцию PIN1 [105]. Недавно было показано, что на транспортную активность PIN-ABCB1 комплекса также влияет PID фосфорилирование [99]. Подсемейство белков MAB4 также специфично удерживают белки PIN поляризованным образом на мембране [42].

Присутствие целлюлозы имеет важное значение для поддержания полярного распределения белков в мембране [36]. Она обеспечивает механическую связь между полярными областями на мембране и внеклеточным матриксом. Наличие такой связи ограничивает боковую диффузию полярных белков PIN и тем самым способствует их локализации в полярных областях. Генетические и химические модификации целлюлозы или механическое воздействие на стенки клетки нарушают эти связи, и приводят к увеличению боковой диффузии и потере полярного распределения PIN.

Показано, что процесс полярной локализации регулируется через ARF-AUX/IAA сигнальный путь, упомянутый выше (глава 1.2.1.). При увеличении уровня экзогенного ауксина, в работе Sauer et al. (2006) наблюдалась релокализация белков PIN1 и PIN2 в перицикле, эндодермисе и кортексе [83]. Этот эффект уменьшался при мутациях *iaa17*, *arf7 arf19*, *arf7 arf16 arf19*.

1.3.3.3. Подавление экспрессии PIN белков

Помимо активации транскрипции, обнаружено, что высокие концентрации экзогенного ауксина активируют также и деградацию белков PIN семейства. Так повышенная деградация белков PIN1 и PIN7 наблюдается при применении концентраций выше 10 мкМ 2,4-Д и 100 нМ 2,4-Д, соответственно [96]. Эта регуляция осуществляется через протеасом-зависимый механизм, схожий с механизмом ауксин-зависимой деградации белков AUX/IAA [86].

1.3.4. Компенсаторные изменения экспрессии PIN генов в случае мутаций одного из них

В *pin* мутантах потеря белка мутантного гена компенсируется экспрессией в его домене оставшихся PIN, что способствует сохранению распределения ауксина, близкого к нормальному [40], [20]. Например, в мутанте *pin1*, PIN2 начинает экспрессироваться в инициалах сосудистых клеток, частично компенсируя функцию недостающего белка. В тройном мутанте *pin3 pin4 pin7* экспрессия белка PIN1 была обнаружена на латерально-базальной стороне клеток эндодермиса, в то время как белок PIN2 был обнаружен на базальной стороне инициалей сосудистых клеток, в которых обычно экспрессируются PIN3 и PIN7. В корне фенотипические дефекты были выявлены только у одного одиночного мутанта - *pin2*, корень которого не реагирует на силу тяжести (агравитропический фенотип) [93]. Этот дефект может быть объяснен отсутствием компенсации функции PIN2 другими белками PIN. Также фенотипические аномалии в корне были обнаружены у множественных мутантов, например, тройной мутант *pin1 pin3 pin4* имеет очень

короткий корень, а у четвертных мутантов *pin1 pin3 pin4 pin7* аномалии фенотипа варьируют от леталей с ярко выраженными нарушениями полюса корня до проростков с нефункционирующим корнем [40].

1.4. Компьютерный анализ изображений с конфокального микроскопа

Определение паттерна экспрессии генов и количественная оценка экспрессии являются важным этапом исследования механизмов функционирования генных сетей [5]. Недостатком таких методов как ПЦР и различных полногеномных технологий, позволяющих получить количественные данные, является использование гомогенатов клеток вследствие чего утрачивается информация об экспрессии генов в пространстве. В настоящее время разработан ряд методов для детекции пространственно-распределенной экспрессии генов как на уровне мРНК (репортерные генетические конструкции), так и на уровне белка (репортерные генетические конструкции, иммунолокализация) [98]. Методы флуоресцентной окраски позволяют изучать изменения молекулярно-генетических маркеров под флуоресцентным или конфокальным микроскопом с очень большим разрешением. Конфокальный микроскоп позволяет исследовать нативные препараты в 3D за счет применения метода оптических срезов.

От проблемы получения качественных изображений с высоким разрешением современная биология перешла к проблеме анализа цифровых изображений и получения из них информации. В результате такого анализа мы можем получить два типа данных: первый – это информация о пространственном расположении продуктов экспрессии генов; второй – интенсивность свечения флуоресцентного агента, которая может быть использована для определения относительного локального уровня исследуемого вещества [80].

В результате анализа конфокальных изображений в первом случае мы можем измерить длины доменов, устанавливая порог на интенсивность свечения при котором считаем, что экспрессия присутствует. Во втором случае

можно измерять среднюю или максимальную интенсивность свечения. После чего результаты измерений обрабатываются статистически для обоих случаев. Однако не смотря на эти успехи существуют технические ограничения при получении изображений с конфокального микроскопа, например, рассеивание сигнала внутри объемов разной плотности, которые не всегда позволяют сравнивать урони экспрессии в отдельно взятых клетках между разными образцами.

1.4.1. Программы для анализа конфокальных изображений

Для получения данных и их количественной оценки используются программы анализа изображений, например, ZEN, ImageJ [25].

Программа ZEN разработана для обработки и анализа цифровых изображения полученных на микроскопах ZEISS. Базовый функционал данной программы дает возможность оценить при каких параметрах и настройках микроскопа было получено изображения, что является первым и наиболее важным этапом при анализе изображений и позволяет исключить некоторые ошибки. Например, при сравнении интенсивности свечения белков для разных образцов необходимо, чтобы значение параметра сканирования Master gain для них было одинаковым. Также в программе ZEN есть возможность вручную измерять интенсивность серого цвета, расстояния.

Программа ImageJ имеет открытый исходный код, распространяется без лицензионных ограничений, и позволяет анализировать изображений как вручную, так и автоматически [84]. Данная программа имеет очень богатый функционал, что позволяет решить множество задач, поставленных перед исследователем начиная от оценки максимальных и средних интенсивностей сигнала и заканчивая сегментацией изображений [34]. Все это стало решающим фактором ее активного использования в научном мире. Частный пример использования ImageJ для количественной оценки плотности окрашивания DR5::GUS был описан в работе Пожванова и Медведева (2008). Для этого авторы использовали изображения в красном канале и вычисляли следующие

характеристики: пропускание света (T) и плотность окрашивания (D). Пропускание света T характеризуется отношением минимального значения яркости исследуемой области (X) к среднему значению яркости фона (X_0), $T=X/X_0$. Плотность окрашивания D препарата вычислялась по формуле $D = 1 - \lg T$. Описанная методика является универсальной для всех конструкций с GUS репортером [7]. Например ее можно использовать для анализа активности генов *PIN* в репортерных конструкциях *PIN::GUS*.

В настоящее время активно развиваются методы автоматического получения количественных данных или препроцессинга данных. Автоматический анализ изображений включает в себя следующие этапы:

1. Сегментация изображений, с целью выделения геометрии отдельных клеток;
2. Определение шума;
3. Измерение интенсивности флуоресценции в каждой клетке;
4. Комбинация информации о интенсивности свечения с геометрией, полученной после сегментации изображений.

В тоже время стоит отметить, что далеко не для всех задач имеются решения по автоматизации процесса, в виде готовых плагинов. Это связано с рядом сложностей, связанных с типом исследуемого объекта и поставленной задачей. Наибольшая сложность заключается в автоматической сегментации изображений, поскольку для каждого исследуемого объекта необходим отдельный алгоритм. Например, для анализа изображений кончиков корней была создана программа CellSeT [80].

В работе Поунда с соавторами (2012) проводился автоматический анализ распределения ауксина и полярной локализации *PIN2* в кончике корня *A. thaliana* с использованием программы CellSeT. Данная программа позволяет проводить автоматическую сегментацию изображений корней, с целью выделения геометрии отдельных клеток, после чего им могут присваиваться термины из библиотеки. В тех областях изображения, где клетки плохо сфокусированы возможна ручная корректировка. Дальнейший автоматический

анализ интенсивности флуоресценции в клеточных стенках или ядрах проводился с использованием соответствующих плагинов. Для построения карты распределения ауксина в кончике корня использовались экспериментальные изображения DII-Venus. Поскольку интенсивность свечения ядер сильно варьируется между клетками, в данном плагине используются локальные пороги определения ядра для каждой отдельной клетки.

Автоматическая реконструкция 3-х мерной модели структуры апикальной меристемы корня *A. thaliana* возможна в программе iRoCS [85]. Для этого вручную требуется отметить покоящийся центр, после чего автоматически определяются координаты ядер или клеток в необработанных изображениях кончиков корней, и им присваиваются типы тканей. С помощью данной программы можно получать детальные 3D реконструкции АМК *A. thaliana* не только дикого типа, но и разных мутантов. Например, у мутантных растений *shr* отсутствует эндодермис, и этот слой не был аннотирован в iRoCS.

Для автоматизации количественного анализа изображений также используется MATLAB Image Processing Toolbox [56].

Имеющиеся на данный момент программы для анализа изображений не позволяют количественно оценивать концентрацию белков на мембране клетки. Однако, существующие экспериментально-теоретические подходы позволяют полуколичественно оценить относительный уровень ауксина в клетках и общие тенденции в изменении активности репортерных конструкций в ткани корня.

1.5. Математическое моделирование пространственного распределения морфогенов

Морфоген – это сигнальная молекула, которая распространяется в ткани и определяет судьбу клеток в зависимости от концентрации. В 1969 году Вольперт сформулировал гипотезу о позиционной информации, суть которой заключается в том, что формирование градиента морфогена обеспечивает задание системы координат, в которых клетки в зависимости от положения

реализуют специфическую генетическую программу [102]. Тот факт, что эффекты ауксина определяются его неравномерным распределением в тканях и дозозависимыми механизмами действия, позволяет называть его морфогеном растений.

Считается, что предложенная в 1952 году Тьюрингом модель для каталитических реакций (относящаяся к моделям типа «реакция-диффузия») является первой математической моделью, согласующейся с представлением о позиционной информации и объясняющей механизм формирования из изначально однородной среды паттерна пространственных различий. Применительно к биологии модель типа «реакция-диффузия» говорит о том, что в живой ткани пространственный паттерн формируется в градиентах двух диффундирующих морфогенов: активатора, регулирующего эффективность синтеза обоих морфогенов, и ингибитора, подавляющего синтез морфогена-активатора [66]. Одним из традиционных методов описания гетерогенности и исследования образования паттернов в системе являются уравнения в частных производных. В таком случае модель «реакция-диффузия» записывается следующим образом:

$$\frac{\partial a}{\partial t} = \rho \cdot \frac{a^2}{h} - \mu \cdot a + D_a \frac{\partial^2 a}{\partial x^2}$$

$$\frac{\partial h}{\partial t} = \rho' \cdot a^2 - \nu \cdot h + D_h \frac{\partial^2 h}{\partial x^2}$$

где, a – активатор синтеза обоих морфогенов; h – ингибитор синтеза активатора; ρ , ρ' – константы синтеза морфогенов a и h , соответственно; μ , ν – константы деградации морфогенов a и h , соответственно; D_a , D_h – коэффициенты диффузии морфогенов a и h , соответственно.

В последнее время широкое применение для моделирования систем типа «реакция-диффузия» получили модели, использующие концепцию клеточных автоматов (КА). Идея клеточных автоматов независимо друг от друга была сформулирована Контрадом Цусе и Джоном фон Нейманом в конце сороковых годов XX века [71], [108] и заключается в следующем. КА – дискретная

динамическая система, представленная в виде совокупности клеток (решётки клеточного автомата) соединённых между собой одинаковым образом [91], [5]. Решетки могут различаться как по форме клеток, так и по размерности решетки. При этом каждая клетка является конечным автоматом, и ее состояние определяется состояниями соседних клеток и, возможно, ее собственным [1]. Состояния клеток изменяются по одним и тем же правилам (правилам переходов), заданным в модели. Множество состояний клетки конечно. Изменение состояния всех клеток происходит одновременно или в любом порядке. Решетка однородна и невозможно отличить никакие два места по ландшафту.

Все живые многоклеточные организмы характеризуются клеточным строением и их функционирование определяется наличием молекулярных связей друг с другом. Кроме того, дискретный характер правил переходов, описанных нелинейными, разрывными или вероятностными функциями, позволяет выражать нелинейность процессов самым непосредственным образом [2]. Дискретность КА позволяет отображать в модели динамику перемещения и трансформации исследуемых веществ. КА допускают моделирование не синхронных процессов (асинхронные КА), что соответствует естественному течению биологических событий [1]. Поэтому применение КА является наиболее естественным подходом к моделированию функционирования живых систем. Например, с использованием этой концепции была создана модель ауксин-зависимого радиального роста у растений [54].

В ИЦиГ Акбердиным и соавторами была разработана модель морфогенеза зародыша *A. thaliana* в терминах клеточного автомата [5]. В модели было задано три типа клеток, которые различались по типу синтезируемого ими сигнала (базальный, стволовой и сигнал дифференцировки) и скорости делений. Сигналы перемещались по ткани диффузией, образуя градиенты концентрации, регулирующие дифференцировку клеток. Клетки автомата взаимодействовали

друг с другом, воспринимая сигналы, и дифференцируясь в зависимости от дозы сигналов.

1.5.1. Математическое моделирование динамики распределения ауксина PIN транспортерами

Транспорт ауксина является динамическим процессом, поэтому использование математического моделирования позволяет более детально понять механизмы формирования градиента концентрации ауксина во времени и проверить роль PIN белков в этом процессе.

Из множества математических моделей, исследующих процесс формирования распределения ауксина, наиболее близкими к теме моей работы были модели предложенные в статьях Банд с соавторами (2014) и Гринайсен с соавторами (2007) [12], [48].

Впервые гипотеза о достаточности PIN белков для формирования максимума концентрации ауксина в меристеме корня была исследована в математической модели, названной моделью «обратного фонтана» [48]. В своей модели авторы представили кончик корня в виде 2-х мерного клеточного ансамбля с прямоугольными клетками, которые, в зависимости от их положения в меристематической зоне или зоне элонгации, различались по размеру (рис. 4А). Функции белков PIN1, PIN2, PIN3, PIN7 были обобщены в виде одного PIN белка. Полярная локализация этого обобщённого белка задавалась в модели в соответствии с экспериментальными данными по локализации в клетках корня всех четырех PIN белков (рис. 4Б). А именно, в центральной области клеточного ансамбля, имитирующей сосудистую ткань, PIN располагался на нижней стороне; в периферийных регионах, соответствующих эпидермису, PIN занимал позицию преимущественно на верхней стороне. Между этими тканями были расположены «пограничные» клетки, в которых PIN локализовался на нижней и боковой стороне. В клетках, соответствующих колумелле, PIN белки были размещены на всех сторонах. Получившийся паттерн локализации PIN, является основой для распределения ауксина согласно механизму «обратного

фонтана», который предполагает наличие двух противоположно идущих потоков ауксина. Координация этих потоков осуществляется боковым перераспределением ауксина. В результате, модель «обратного фонтана» формирует и сохраняет в развитии максимум концентрации непосредственно над клетками колумеллы, что соответствует экспериментально наблюдаемому максимуму в клетках покоящегося центра (рис. 4В).

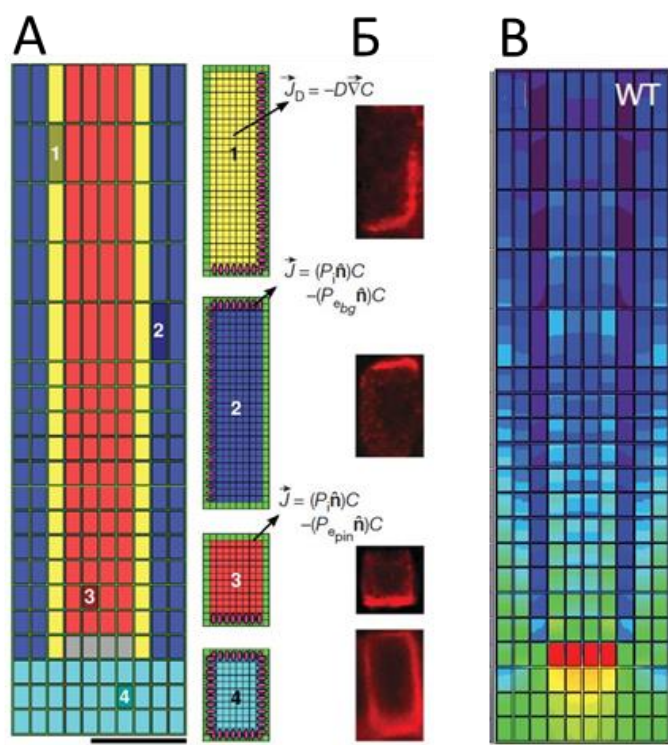


Рисунок 4. Математическая модель «обратного фонтана». А, прямоугольный 2-х мерный клеточный ансамбль, клетки которого различаются по размеру в зависимости от положения в массиве. Полярная локализация обобщённого PIN белка задается в соответствии с экспериментальными данными (Б) по локализации в клетках корня белков PIN1 – PIN3, PIN7. В, распределение ауксина, генерируемое в модели «обратного фонтана». Адаптировано из [48].

Более детальный анализ формирования распределения ауксина в клеточном ансамбле с фиксированным паттерном экспрессии PIN белков был проведен в работе Банд с соавторами (2014) [12]. В этой работе данные о распределении ауксина были получены с помощью более чувствительного, чем DR5, сенсора DII-VENUS (рис. 2.В). Клеточный ансамбль, имитировал реальную клеточную структуру продольного среза кончика корня, полученную из конфокальных изображений корня растений *A. thaliana*. Так же как в модели «обратного фонтана» [48], в этой работе, распределение PIN белков в процессе

расчета было фиксированным во всех тканях корня. Это распределение также генерировало градиент концентрации ауксина в соответствии с экспериментальными данными для проксимальной части меристематической зоны корня. Однако в нем отсутствовало выявляемое сенсором DII-VENUS повышение уровня ауксина в наружных слоях дистальной части меристематической зоны, которое авторы объясняют функционированием AUX1/LAX транспортеров.

Описанные выше модели исследуют, как паттерн экспрессии PIN белков генерирует градиент ауксина. Совершенно другой подход используется в модели «отраженной волны» [57], [68], [69], ключевой задачей которой является исследование того, как ауксин через регуляцию экспрессии своих транспортеров (PIN белков) сам формирует свое распределение. В моделях учитывались экспериментальные данные о ауксин-зависимой регуляции экспрессии генов *PIN* [96]. В двухмерной модели (Mironova et al., 2010) одного белка PIN было достаточно для формирования максимума ауксина в кончике корня, однако в расчетах модели отсутствовал градиент в меристематической зоне [68]. Далее, в другой модели (Mironova et al., 2012) учитывалась ауксин-зависимая экспрессия уже трех PIN белков: PIN1 функционировал в клетках при промежуточной концентрации ауксина, PIN2 – при низкой концентрации, PIN3 – при высокой [69]. В этой модели паттерн распределения ауксина самоорганизовывался одновременно с паттерном распределения PIN белков. В результате модель генерировала максимум ауксина в клетках, соответствующих ПЦ и градиент в меристематической зоне.

Таким образом, существующие в настоящее время математические модели, описывающие формирование распределения ауксина через PIN-опосредованный транспорт, либо изначально задают паттерн их распределения [12], [48], либо фиксируют полярную локализацию присущую какому-либо PIN [57], [68], [69].

1.6. Заключение по обзору литературы

Одной из фундаментальных задач современной биологии развития растений является изучение механизмов формирования неравномерного распределения ауксина в тканях, определяющего морфогенез. Согласно литературным данным, семейство генов *PIN* играет ключевую роль в создании распределения ауксина в корне, которое в свою очередь регулирует поддержание ниши стволовых клеток в АМК, дифференцировку различных клеточных типов, а также инициацию боковых корней [4]. Объединённые в одно подсемейство белки *PIN1-PIN4*, *PIN7* асимметрично локализируются в плазматической мембране и выполняют общую функцию – транспорт ауксина из клетки [55]. Динамичность в паттернах экспрессии этих транспортеров делает их ключевыми регуляторами морфогенеза растений.

Известно, что ауксин влияет на экспрессию своих транспортеров как на транскрипционном уровне, так и на уровне стабильности белка и регуляции их полярной локализации. Ранее в экспериментах по обработке экзогенным ауксином (2,4-Д) было показано наличие дозозависимой регуляции ауксином экспрессии генов *PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN4* и *PIN7* [96]. Для количественной оценки авторы использовали метод количественного ПЦР в реальном времени, что позволяет оценить изменения только на транскрипционном уровне. В той же работе авторы установили различия в транскрипционной и посттранскрипционной регуляциях, однако они не провели систематический анализ этого явления.

Таким образом, дозозависимая регуляция ауксином своих *PIN*-транспортеров и наличие обратных связей в этом регуляторном комплексе делают достаточно сложным и практически невозможным экспериментальное исследование всех аспектов работы данной генной сети. Системно-биологический подход показал свою успешность для решения подобных задач и был уже использован для изучения этой проблемы. Тем не менее, существующие в настоящее время математические модели *PIN*-опосредованного формирования распределения ауксина, не включают

динамику образования паттерна PIN белков. Например, все описанные ранее модели либо изначально задают паттерн их распределения [12], [48], либо фиксируют полярную локализацию присущую какому-либо PIN [57], [68], [69].

В данной работе используется системный подход для выявления особенностей экспрессии генов семейства PIN в корне *A. thaliana* и определения роли ауксина в этом процессе. Дифференциальная экспрессия PIN-транспортеров показана во многих публикациях, но единого паттерна их экспрессии во всех тканях корня как правило не приводится, кроме того встречаются противоречивые данные. В соответствии с этим на первом этапе (глава 2.4.1.) в моей работе было необходимо дать полную карту экспрессии PIN белков в корне дикого типа *A. thaliana*. Второй задачей является исследование роли ауксина в регуляции экспрессии PIN белков и их полярной локализации. Для этого мы провели исследование влияния разных концентраций ауксина на экспрессию PIN белков. Компьютерный анализ экспериментальных изображений позволил качественно и количественно оценить изменения паттернов экспрессии PIN при изменении распределения ауксина.

На третьем этапе мы разрабатываем и анализируем математическую модель формирования позиционной информации для генерации потоков ауксина в меристеме корня. На заключительном этапе проводим независимую проверку модели на трансгенной линии *35S::PIN1* и сравнение расчетов математических моделей с экспериментальными данными.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ ЭКСПРЕССИИ PIN ТРАНСПОРТЕРОВ В КОРНЕ

2.1. Растительный материал и условия выращивания

Экспериментальную работу по предложенным нами схемам проводил Тарас Пастернак в университете Фрайбурга (Германия) и предоставил нам итоговые изображения для анализа.

В экспериментах использовались растения дикого типа *A. thaliana* (экотип Col-0), трансгенных линий *35S::PIN1*, *PIN1::PIN1-GFP*, *PIN2::PIN2-GFP*, *PIN3::PIN3-GFP*, *PIN4::PIN4-GFP* и *PIN7::PIN7-GFP* [96], и трансгенные растения с повышенной экспрессией гена биосинтеза ауксина – *uic1-D* [107], одиночные *pin* мутанты (*pin1*, *pin2*, *pin3*, *pin4*, *pin7*).

Исследуемые растения выращивались при стандартных условиях (16/8 часовом световом цикле, при 22°C на твердой питательной среде ½ MS). Для определения дозозависимых эффектов ауксина трехдневные растения Col-0 и *PIN::PIN-GFP* обрабатывали в жидкой среде разными концентрациями НУК (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 μM) в течении 24 часов. Экспрессия белков *PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN4*, *PIN7* изучалась с помощью специфических антител и репортерных конструкций растений трансгенных линий *PIN::PIN-GFP*. Применялся улучшенный метод иммулокализации [76]. Также проводилась иммулокализация *PIN* белков в четырехдневных проростках Col-0, *uic-1D* и *35S::PIN1*. Визуализацию осуществляли с помощью одновременного мечения двух *PIN* белков в различных комбинациях (*PIN1-PIN2*, *PIN1-PIN3*, *PIN1-PIN4*, *PIN2-PIN4*, *PIN2-PIN7*, *PIN4-PIN7*).

2.2. Микроскопический анализ

Изображения корней растений репортерных линий *PIN::PIN-GFP* и корней растений с иммулокализацией *PIN* белков были получены с помощью конфокального микроскопа Zeiss Stemi SV11 APO в центре биосистематического анализа (ZBSA), BIOS, центре биологического исследования передачи сигналов Университета Фрайбурга.

Для получения изображений с высоким разрешением растения, содержащие флуоресцентные маркеры, фиксировали и обрабатывали реагентом для окраски ядер (DAPI), после этого изображения корней получали при помощи конфокального микроскопа Zeiss LSM 5 DUO.

2.3. Обработка изображений

Двухмерные (2D) и трехмерные изображения (3D) кончиков корней с визуализацией PIN белков, полученные в ходе экспериментов и любезно предоставленные нам Тарасом Пастернаком, были проанализированы соответственно в программах ZEN и iRoCs Toolbox [85].

При анализе 2D изображений учитывались параметры сканирования. Особое внимание уделялось параметру Master gain, который отражает степень усиления сигнала. Его необходимо учитывать при сравнении интенсивности сигнала, так как в случае значительного понижения уровня сигнала исследуемого белка используются завышенные значения Master gain, чтобы визуализировать домен. Для качественной оценки уровня экспрессии PIN белков сигнал отображался псевдоцветом rainbow. Минимальному уровню экспрессии соответствует синий цвет, а максимуму – красный. На основе полученных данных было составлено подробное описание особенностей экспрессии и полярной локализации PIN белков как в диком типе, так и после обработки экзогенным ауксином, а также в трансгенных растениях *uyc1-D*; *35S::PIN1* и одиночных мутантах по генам *pin*.

Для количественной оценки изображения экспортировались из программы ZEN, с включённым каналом исследуемого белка. Затем, с помощью программы ImageJ [84] проводился количественный анализ изображений, измерялись следующие характеристики: средняя и максимальная интенсивности свечения белков. Для того чтобы определить максимальную интенсивность свечения белков проводим линию от кончика корня до конца домена экспрессии исследуемого PIN, толщина линии соответствует ширине домена экспрессии исследуемого белка, и выбираем функцию Analyze/measure/max. Для

определения средней интенсивности свечения белков использовались только изображения одного размера, после чего выделяем все поле изображения и выбираем функцию Analyze/measure/mean.

Статистическая достоверность различий значений обработанных ауксином образцов от контроля определялась по U-тесту Манна-Уитни.

2.4. Результаты экспериментальной части

В настоящее время накоплены данные о паттернах экспрессии PIN белков в корне, полученные в большинстве своем при анализе репортерных линий PIN::PIN-GFP (см. обзор литературы). В своей работе мы исследовали данные полученные не только с помощью репортерных линий, но также после иммуногистохимической окраски специфическими антителами к PIN белкам. Кроме того, техника одновременного мечения нескольких PIN белков, позволила оценить перекрывание паттернов исследуемых белков.

Для выявления особенностей экспрессии PIN транспортеров в корне *A. thaliana* анализ экспериментальных данных был разделен на два этапа:

1. Описание особенностей экспрессии PIN белков в диком типе;
2. Определение роли ауксина в экспрессии PIN.

2.4.1. Описание особенностей экспрессии PIN белков в диком типе

В первую очередь мы детально исследовали паттерны экспрессии PIN белков в меристеме корня *A. thaliana*. В результате были разработаны карты паттернов экспрессии, которые в дальнейшем использовались в качестве контроля при анализе изменений в экспрессии PIN под влиянием ауксина, а также при тестировании математической модели.

Отдельное внимание было уделено изучению различных аспектов экспрессии транспортера PIN1. Такой выбор обусловлен тем, что белок PIN1 является одним из наиболее важных представителей семейства, именно фенотип мутанта по этому гену дал название семейству [73].

2.4.1.1. Детальное описание паттернов экспрессии PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 в корне растений *A. thaliana Col-0*.

Как описано в главе 1.3.1, имеющиеся в литературе данные о паттернах экспрессии PIN качественно описывают только общую картину для отдельно взятого белка. В то время как для поставленной нами цели была необходима детальная карта экспрессии PIN транспортеров с точными границами их доменов и областями перекрывания этих доменов.

Для составления такой карты был проведен анализ 2D изображений корней *A. thaliana*, полученных с помощью конфокального микроскопа, в которых экспрессия исследуемых PIN белков была визуализирована с помощью одновременного мечения двух PIN белков в различных комбинациях и в трансгенных линиях PIN::PIN-GFP (см. главу 2.1, 2.2.). Для каждого PIN исследовались изображения главного корня в среднем 20 растений *A. thaliana*. Относительный уровень экспрессии PIN белков в клетках меристемы и их полярная локализация оценивались качественно. Количественные данные были получены для длин доменов экспрессии PIN транспортеров в меристеме, которая вычислялась как число клеток экспрессирующих PIN белок с определенной полярной локализацией. В результате для каждого PIN белка был описан характер экспрессии в различных тканях и составлена общая таблица (таблица 1).

Таблица 1. Вариабельность экспрессии PIN белков в тканях кончиков корней растений дикого типа *A. thaliana*. ПЦ –покоящийся центр, БКЧ – боковой корневой чехлик, ЭЗ – зона элонгации. Стрелки указывают полярную локализацию PIN белков в клетке.

Белок \ Ткань	PIN1	PIN2	PIN3	PIN4	PIN7
Эпидермис	с 1 по 2-6, ↓	с 1 по 2-6, ↓ с 3-7 по ЭЗ, ↑		с 1 по 3-5, ↓	
Кортекс	с 1 по 10-16, ↓	с 2-6 по 16-23, ↓ с 17-24 по 30-ЭЗ, ↑		с 1 по 3-8, ↓	
Эндодермис	с 1 по 25-33, ↓			с 1 по 4-7, ↓	
Стель	с 1 по 17-30, ↓		с 15-19 по ЭЗ, ↓	с 1 по 3-5, ↓ с 12-18 по ЭЗ, ↓	с 4-6 по ЭЗ, ↓
ПЦ	Есть, ⇕			Есть, ⇕	
Инициали колумеллы	Есть, ⇕		Есть, ⇕	Есть, ⇕	Есть, ⇕
Колумелла			1-3 ряда, ⇕	1-4 ряда, ⇕	1-3 ряда, ⇕
БКЧ		Есть, ↑			

Подученные данные о паттернах экспрессии PIN и длинах их доменов были суммированы в виде схем для каждого белка (рис. 5).

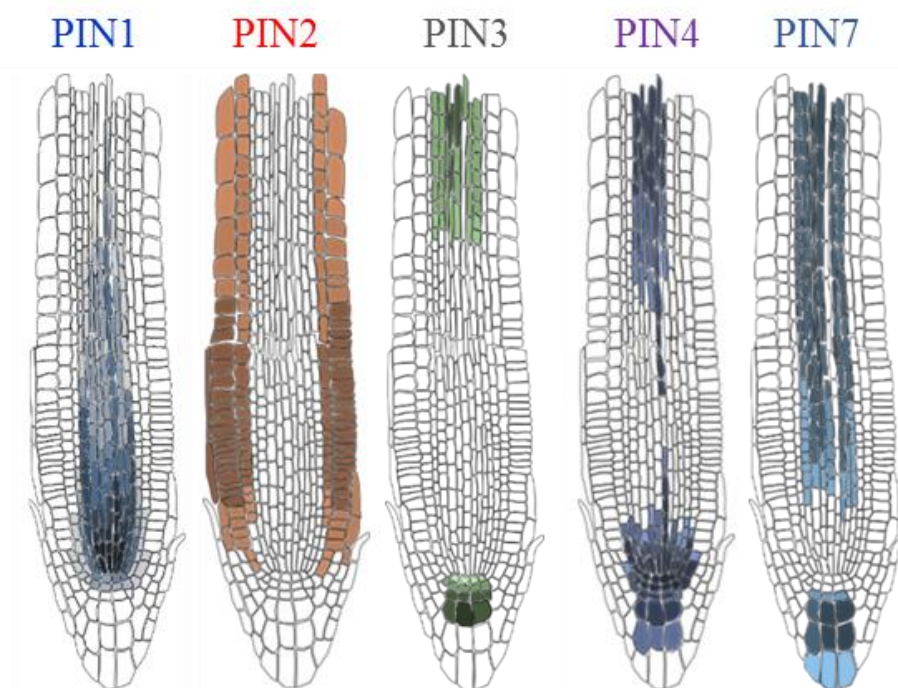


Рисунок 5. Схемы паттернов экспрессии белков PIN1-PIN4 и PIN7. Созданы в результате анализа микрофотографий корней с иммулокализацией PIN белков и репортерных линий PIN::PIN-GFP. Градиент цвета в схемах *in vivo* отражает интенсивность экспрессии белка. Схемы расположения доменов для разных PIN белков выровнены относительно друг друга.

Домен экспрессии PIN1 в кончике корня имеет самый значительный паттерн из всех PIN белков (Рис. 5), и его экспрессия отмечалась во всех тканях, кроме клеток бокового корневого чехлика. Максимальный уровень экспрессии отмечался в 5-16 рядах стели от ПЦ, в остальных тканях он соответствовал среднему уровню. В меристематической зоне PIN1 всегда локализуется на нижней стороне клеток стели, эндодермиса и кортекса, а также 2-6 рядах клеток эпидермиса. В инициалах стели и 2-4 рядах их дифференцировавшихся потомков дополнительно наблюдалась локализация PIN1 на боковых сторонах клеток. Иногда аналогичная локализация на боковых и нижней сторонах присутствовала в первой дифференцировавшейся клетке эпидермиса, кортекса и эндодермиса. В ПЦ и инициалах колумеллы, эндодермиса/кортекса и эпидермиса/БКЧ PIN1 обычно локализуется на всех сторонах клетки, но иногда встречаются различные варианты преобладания локализации на нижней стороне. По мере прохождения клетками меристематической зоны уровень экспрессии PIN1 постепенно снижался и в разных тканях корня он заканчивался

на разном расстоянии от ПЦ. Раньше всего экспрессия PIN1 заканчивается в эпидермисе и кортексе, во 2-6 и 10-16 рядах от ПЦ, соответственно. В эндодермисе уровень экспрессии слабеет к началу транзитной зоны, домен полностью заканчивается к концу МЗ. Самый продолжительный домен экспрессии PIN1 наблюдался стели. Более подробно детали его экспрессии в клеточных линиях этой ткани исследовались на 3D изображениях (см. раздел 2.1.4.2.).

Реже (в 20% изображений) мы обнаруживали экспрессию PIN1 на низком уровне в 1-3 рядах колумеллы, где он располагался на всех сторонах (рис. 6А). Возможно это отражает недостаточную специфичность используемого антитела, так как в *pin1* мутанте слабый сигнал антитела к PIN1 иногда детектировался в колумелле (рис. 6Б).

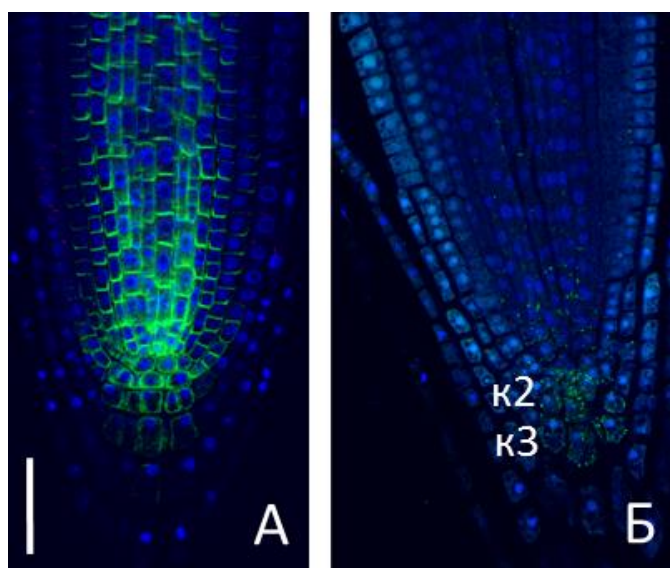


Рисунок 6. Паттерн экспрессии PIN1 в кончике корня в диком типе (А) и в *pin1* мутанте (Б). Слабый сигнал антитела к PIN1 наблюдался во втором и третьем ряду колумеллы. Анти-PIN1 сигнал (зеленый сигнал), ядра клеток (синий канал). Шкала = 50 мкм.

Белки PIN3, PIN4 и PIN7 имеют схожие паттерны экспрессии в корне и локализуются в сосудистой системе, где совместно с PIN1 формируют поток ауксина вниз к ПЦ, и в колумелле, где обеспечивают перераспределение этого гормона (Рис. 5). А именно, PIN4 локализуется на всех сторонах в 1-4 слоях колумеллы, инициалах кортекса/эндодермиса, инициалах эпидермиса/БКЧ и ПЦ. В нижней части меристематической зоны (до 3-6 ряда от ПЦ) PIN4

располагается на нижней стороне во всех тканях от эпидермиса до сосудистой ткани. PIN4, также как PIN1, дополнительно локализуется на боковых сторонах первых дифференцировавшихся клеток эпидермиса, кортекса и эндодермиса. В клетках стели он меньше, чем PIN1, локализуется на боковой стороне. В описанном выше домене PIN4 уровень его экспрессии всегда максимальный. Затем уровень экспрессии снижается и домен PIN4 постепенно сужается, в средней части меристематической зоны остается только в протоксилеме. Далее в верхней части меристематической зоны (с 15-18 ряда от ПЦ) домен экспрессии расширяется на всю сосудистую ткань с аналогичной полярностью, но уровень экспрессии обычно значительно слабее чем в нижней части меристематической зоны. В меньшем количестве изображений (28%) уровень экспрессии PIN4 сохранялся максимальным и в верхней части меристематической зоны. Иногда мы наблюдали помимо локализации на нижней стороне еще и внутреннюю (латеральную) локализацию в крайних клетках сосудистой системы (в 30% изображений). В зоне элонгации паттерн экспрессии PIN4 сохраняется аналогично верхней части меристематической зоны.

Максимальный уровень экспрессии PIN3 и PIN7 наблюдался в колумелле, где они локализируются на всех сторонах в 1-3 слоях. В инициалах колумеллы они экспрессируются значительно слабее, чем PIN4. При этом PIN3 чаще экспрессируется в инициалах колумеллы, чем PIN7 (75% и 55% изображений, соответственно). В ПЦ мы никогда не отмечали экспрессию PIN3 или PIN7, в отличие от PIN1 и PIN4 (рис. 7Б-Г). В стеле PIN3 и PIN7 локализируются на нижней стороне, также как PIN1 и PIN4, но начинают экспрессироваться на разном расстоянии от ПЦ. В стеле домен экспрессии PIN7 начинается с 6-8 ряда от ПЦ и выше уходит далеко в зону элонгации. Редко наблюдается слабая экспрессия дополнительно в нижней части меристематической зоны (в 25% изображений). В то время, как PIN3 начинает экспрессироваться только в зоне элонгации. Интересно, что экспрессии PIN1 и PIN3 пересекается исключительно в протоксилеме (рис. 7Д-Ж), в остальных тканях эти два белка имеют взаимоисключающий паттерн экспрессии.

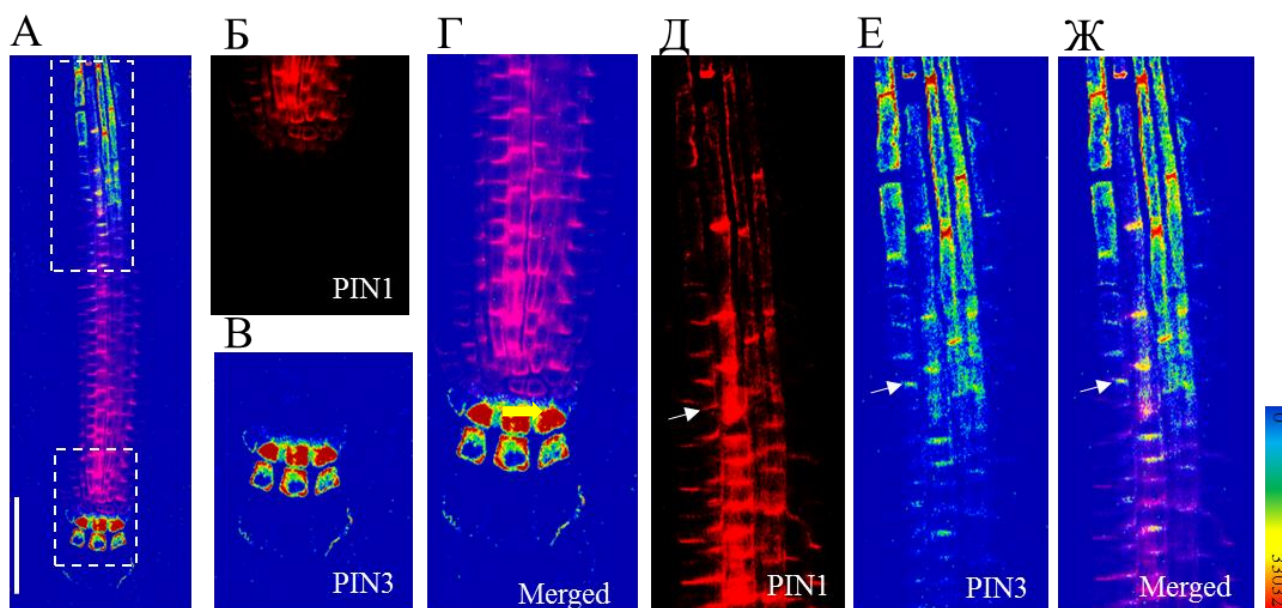


Рисунок 7. Конфокальное изображение меристемы корня с одновременным мечением белка PIN1 и репортера PIN3. Анти-PIN1 (красный сигнал), анти-PIN3 (rainbow). Б-Г, увеличенная нижняя часть изображения А. Д-Ж, увеличенная верхняя часть изображения А. Желтая стрелка указывает на ПЦ. Белые стрелки указывают область перекрывания доменов экспрессии PIN1 и PIN3. Шкала = 50мкм.

PIN2 экспрессируется исключительно в эпидермисе, кортексе и БКЧ, следовательно менее всего пересекается с доменами других PIN (Рис. 8). В БКЧ он преимущественно локализуется в наружных слоях на верхней стороне клеток с максимальным уровнем экспрессии. В 1-6 рядах эпидермиса от ПЦ PIN2 локализуется на нижней стороне клетки и уровень его экспрессии соответствует среднему (Рис. 8В). Выше PIN2 переходит на верхнюю сторону и до середины зоны элонгации экспрессируется на максимальном уровне, а затем снижается. В кортексе PIN2 обычно экспрессируется на среднем уровне (71% изображений) и начинает экспрессироваться с 4-8 рядов от ПЦ, где локализуется на нижней стороне клеток, а затем, когда клетки кортекса начинают удлиняться, локализация белка переходит на верхнюю сторону. Стоит отметить, что в тех клетках где PIN2 локализуется на нижней стороне обычно наблюдается экспрессия PIN1 с аналогичной полярной локализацией (рис. 8Б).

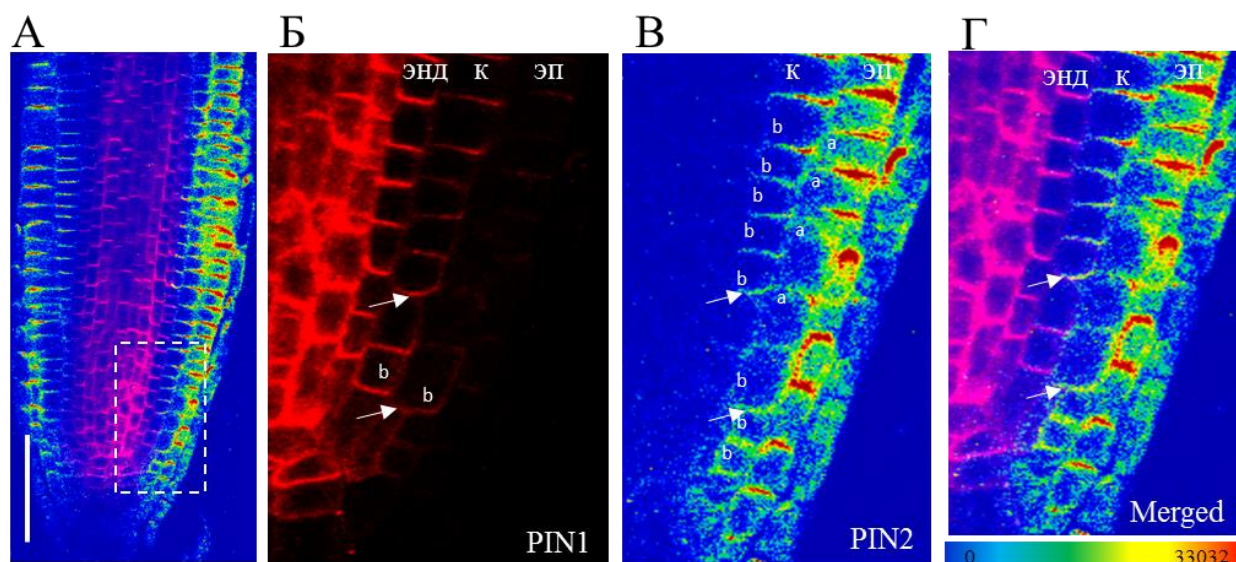


Рисунок 8. Конфокальное изображение меристемы корня с одновременным мечением белков PIN1 и PIN2. Анти-PIN1 (красный сигнал), анти-PIN2 (rainbow). Б-Г, увеличенная нижняя часть изображения А. Белые стрелки указывают область перекрывания доменов экспрессии PIN1 и PIN2. Энд – эндодермис, к – кортекс, эп – эпидермис. Шкала = 50мкм.

2.4.1.2. Экспрессия PIN1 в АМК

Сосудистая система корня *A. thaliana* имеет билатеральную симметрию с двумя полюсами флоэмы и двумя полюсами ксилемы, расположенными перпендикулярно друг к другу [32]. Ранее было показано, что PIN1 ассиметрично расположен в проводящих клетках (протоксилеме, протофлоэме) [19]. В данной части работы мы решили более детально исследовать этот вопрос и использованием программы iRoCs, которая позволяет анализировать 3D изображения.

В результате анализа 3D изображений с иммулокализацией PIN1 мы наблюдали различную протяженность его домена экспрессии в клеточных линиях стелы (протофлоэме, протоксилеме, прокамбии) (Рис. 9). Клетки протофлоэмы и перицикла на флоэмном полюсе утрачивают PIN1 сигнал в первую очередь, это происходит в транзитном домене меристемы (Рис. 9, сечение 3). В прокамбии и клетках ксилемного полюса перицикла экспрессия PIN1 заканчивается чуть позже, в конце меристематической зоны (Рис. 9, сечение 4). Самый продолжительный домен экспрессии PIN1 наблюдался в

протоксилеме, где он уходил далеко в зону элонгации (Рис. 9, сечение 5). В остальных тканях АМК экспрессия и полярная локализация PIN1 не отличались от описанного в предыдущей главе домена этого белка.

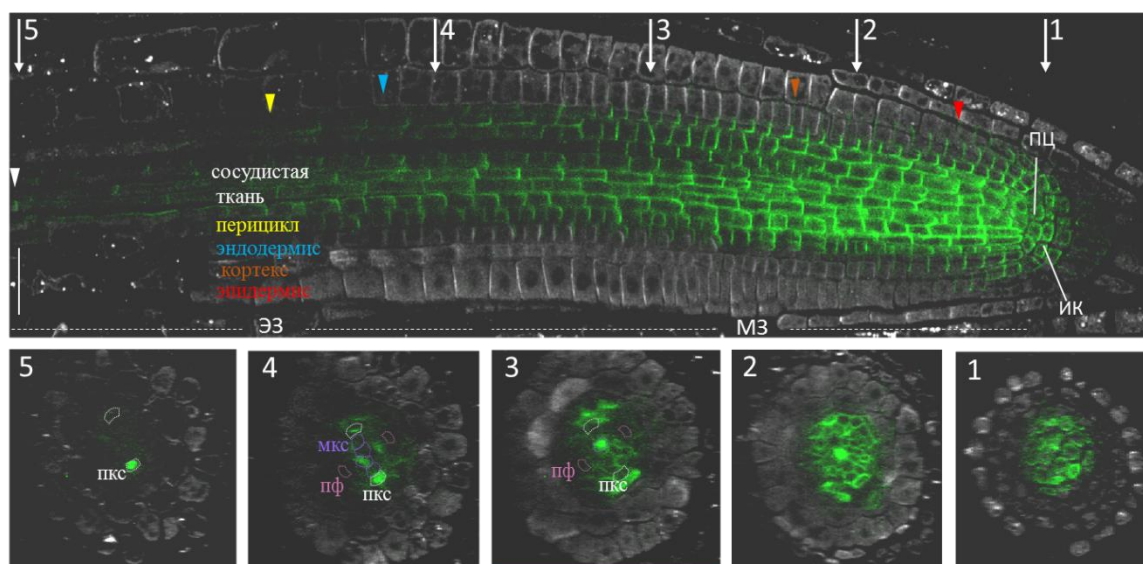


Рисунок 9. Трехмерное изображение кончика корня *A. thaliana* с иммулокализацией PIN1, полученные в программе IROCS. Продольное сечение (верхнее) и пять поперечных сечений (1-5). анти-PIN1 сигнал (зеленый канал) и анти-PIN2 сигнал (белый канал). ПЦ – покоящийся центр, ИК – инициали колумеллы, пкс – протоксилема, мкс – метаксилема, пф – протофлоэма, МЗ – меристематическая зона, ЭЗ – зона элонгации. Цветные треугольники указывают на конец домена экспрессии в соответствующем слое. Шкала = 50 мкм.

Полученное в результате анализа 2D и 3D изображений подробное описание характера экспрессии исследуемых PIN в тканях корня указало на то, что количество клеток экспрессирующих PIN варьируется в индивидуальных корнях в определенных пределах. При этом границы доменов PIN относительно границ экспрессии его паралога, как правило, не нарушаются (Рис. 5).

2.4.1.3. Экспрессия PIN1 в боковых корнях

В предыдущих исследованиях экспрессия PIN1 изучалась в линиях PIN1-GUS и PIN1-GFP, отмечалось что он начинает экспрессироваться с ранних стадий развития бокового корня, но детальное описание локализации PIN1 по всем стадиям отсутствовало [16]. Исследование PIN1 с помощью иммулокализации, позволило нам не только подтвердить известные факты,

но также составить более подробное описание паттерна экспрессии PIN1 по каждой стадии и проследить его релокализацию (Рис. 10).

Реактивация экспрессии PIN1 в перицикле дифференцировавшейся части корня отмечается уже на первой стадии развития примордия бокового корня LRP-I (Рис. 10А). PIN1 локализуется полярно на прилегающих друг к другу плазматических мембранах двух клеток перицикла, образовавшихся после первого деления. После серии антиклинальных делений клетки примордия делятся периклинально и формируют двухслойный LRP-II (Рис. 10Б). В результате на первой (LRP-I) и второй (LRP-II) стадиях мы наблюдали PIN1 во всех клетках развивающегося бокового корня только на вновь образовавшихся клеточных мембранах. Такое расположение PIN1 приводит к формированию направленного потока ауксина из клеток, находящихся на периферии примордия к его центру. Далее происходят периклинальные деления внешнего, а затем внутреннего слоев, что соответствует третьей (LRP-III) и четвертой (LRP-IV) стадиям развития бокового корня. На этих стадиях PIN1 также локализуется на мембранах дочерних клеток, но с преобладанием полярности в сторону кончика примордия (Рис. 10В, Г). В то же время клетки на границе примордия начинают дифференцироваться, что приводит на LRP-III к снижению экспрессии PIN1 в этих областях. Полностью экспрессия PIN1 исчезает из этих клеток на стадии LRP-IV. Эти события обеспечивают формирование еще более направленного потока ауксина к кончику примордия. Начиная с пятой стадии (LRP-V) интенсивность экспрессии PIN1 в наружных слоях постепенно снижается. На этой стадии начинают специализироваться клетки ПЦ, на что указывает экспрессия его маркера WOX5. PIN1 в этих клетках экспрессируется без определенной полярности (Рис. 10Д).

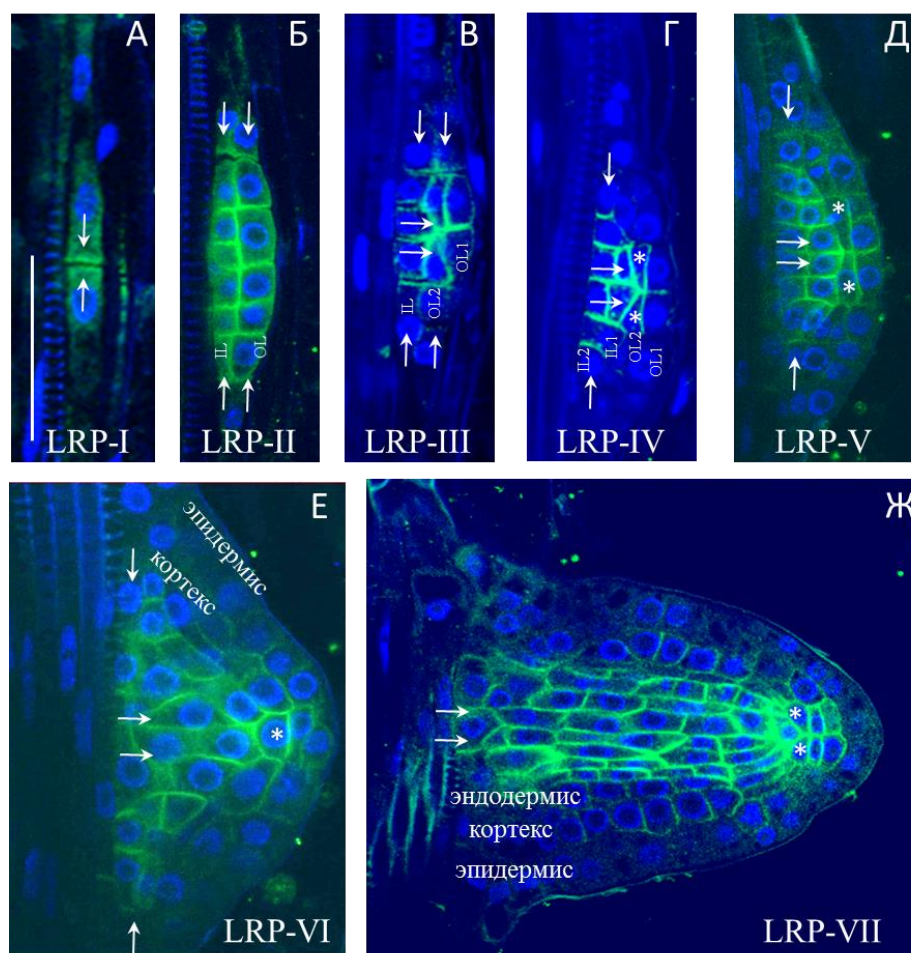


Рисунок 10. Изменения экспрессии PIN1 во время развития бокового корня. А-Ж, семь стадий развития примордия бокового корня показаны римскими цифрами (LRP-I – LRP-VII). IL (IL1, IL2) – внутренние слои, OL (OL1, OL2) – внешние слои. Специализирующиеся клетки ПЦ отмечены звездочками. Анти-PIN1 (зеленый канал), ядра клеток (синий канал). Шкала = 50 мкм.

На последующих стадиях происходит дальнейшее разделение слоев и дифференцировка клеток бокового корня. Эти стадии характеризуются высоким уровнем экспрессии PIN1 в предшественниках сосудистой системы и перицикла, и значительно более низким во всех остальных тканях (исключение - наружный слой, в котором PIN1 отсутствует), а также преобладанием полярной локализации PIN1 в направлении кончика примордия (Рис. 10Е, Ж). Таким образом, формирующийся паттерн экспрессии PIN1 перенаправляет поток ауксина и способствует его накоплению в области нового ПЦ бокового корня, необходимого для развития бокового корня.

2.4.1.4. Экспрессия PIN1 в гипокотиле *A. thaliana*

PIN1 экспрессируется не только в развивающейся сосудистой системе, его экспрессия также детектируется в сосудистой системе в гипокотиле. В клетках прокамбия следующих вдоль сосудистых пучков всего гипокотилия PIN1 локализуется на нижней стороне (Рис. 11А-В).

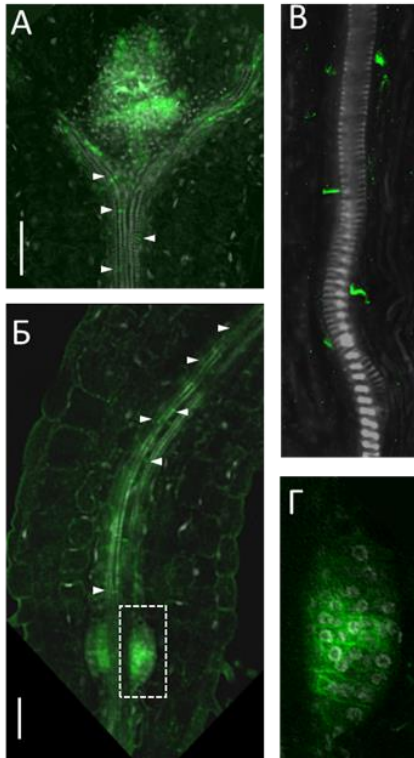


Рисунок 11. Экспрессия PIN1 в гипокотиле (А–Г). А, Б, экспрессия PIN1 в сосудистых элементах рядом со зрелыми сосудами ксилемы гипокотилия. Анти-PIN1 – зеленый канал. Белые стрелки указывают на PIN1. В, сигнал PIN1 на нижней стороне клеток прокамбия. Г, увеличенный вид прямоугольной области из рисунка Б. Шкала = 50мкм.

В большей части проростков в течение нескольких дней после прорастания существует еще один домен экспрессии PIN1 – на верхней границе корня в одном или двух симметричных примордиях (Рис. 11Б, Г). Паттерн экспрессии PIN1 в этих органах похож на 5 или 6 стадии развития бокового корня, мы предполагаем, что это могут быть примордии придаточных корней. Тем не менее, во многих случаях со временем сигнал PIN1 в этих органах исчезал. Возможно растение использует зачатки подобных органов, в случае, если первичный корень был утрачен или слишком слаб, чтобы принять весь ауксин, синтезируемый в побеге.

2.4.1.5. Заключение по анализу экспрессии PIN в норме

Эксперименты по визуализации PIN с применением методов репортерных генов и иммуногистохимической окраски со специфическими антителами не только подтвердили описанные ранее паттерны экспрессии каждого отдельного PIN белка [20], [37], [39], но и позволили заметить некоторые неизвестные ранее закономерности перекрывания их паттернов. Например, анализ изображений с одновременным мечением PIN1 и PIN2 показал, что домены экспрессии этих белков перекрываются в кортексе и нескольких рядах эпидермиса.

Кроме того, в результате проведенного анализа была выявлена вариабельность экспрессии PIN белков в индивидуальных корнях. Так как ауксин регулирует экспрессию своих транспортеров, можно предположить, что вариабельность доменов экспрессии PIN связана с различиями в распределении ауксина в этих корнях. В следующей части этой главы мы проводим исследование роли ауксина в регуляции экспрессии PIN.

2.4.2. Определение роли ауксина в экспрессии PIN

В этой части мы исследовали роль ауксина в экспрессии PIN белков. Для этого в первую очередь необходимо было составить карту распределения ауксина на основе имеющихся литературных данных.

Затем в экспериментах мы проверили как увеличение экзогенного или эндогенного уровней ауксина в корне влияло на экспрессию PIN белков.

Так как при нокауте одного из генов *PIN* происходят изменения в распределении ауксина, мы также исследовали паттерн экспрессии PIN1 в одиночных мутантах *pin2*, *pin3*, *pin4*, *pin7*.

2.4.2.1. Карта распределения ауксина по разным данным

Для проверки предположения о том, что различия в распределении ауксина могут обуславливать вариабельность паттернов PIN в корнях дикого типа, было необходимо составить карту распределения ауксина в АМК. В данной работе я использовала описанные в литературе данные о распределении

ауксина в кончике корня *A. thaliana* полученные с помощью ауксин-чувствительных репортерных конструкций и данных масс-спектрометрии (см. Главу 1.2.5.). Несмотря на то, что все эти методы описывают схожее распределение с максимумом концентрации ауксина чаще всего в ПЦ, данные для остальных тканей отличаются. Следовательно, на первом этапе моей работы было необходимо обобщить все имеющиеся данные. Для этого была составлена сводная таблица, в которую занесены данные об относительном уровне ауксина во всех тканях кончика корня (Таблица 2). Наблюдаемый уровень ауксина был разделен на пять условных уровней: очень высокий, высокий, средний, низкий, очень низкий.

В результате анализа данных (Таблица 2) было определено консенсусное распределение концентрации ауксина в различных тканях АМК. Используя эти данные и результаты экспериментов (Рис. 2), которые свидетельствуют о плавных переходах в уровне ауксина по ткани, мы предложили консенсусное распределение ауксина в меристеме корня (Рис. 12Б). Наибольший уровень ауксина отмечается в покоящемся центре, инициалах колумеллы, инициалах стели, затем он уменьшается вдоль оси корня в обоих направлениях. Относительно высокие концентрации ауксина сохраняются выше от ПЦ в ранних потомках стели и в дифференцирующихся клетках протоксилемы, ниже от ПЦ – в колумелле. Другие клетки в проксимальной меристеме и боковом корневом чехлике имеют более низкий уровень с минимумом в эпидермисе и кортексе.

Таблица 2. Сравнительный анализ распределения ауксина в кончике корня *A. thaliana* полученного различными методами. Консенсус распределения ауксина был составлен по данным полученные с помощью репортерных ауксин-чувствительных конструкций DR5v2 [92], DII-VENUS [22], R2D2 [58] и масс-спектрометрии [60]; [79]. ПЦ – покоящийся центр, БКЧ – боковой корневой чехлик.

Метод детекции \ Ткань	Масс-спектрометрия	DR5v2	DII-VENUS	R2D2	Консенсус
Эпидермис	Очень низкий		Очень низкий - средний	Очень низкий - средний	Очень низкий - низкий
Кортекс	Средний		Низкий	Низкий	Средний – низкий
Эндодермис	Средний		Низкий	Низкий	Низкий
Перицикл	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий	Низкий
Сосудистая система	Средний	Средний	Средний	Средний	Средний
ПЦ	Очень высокий	Высокий	Очень высокий	Очень высокий	Очень высокий
Инициали колумеллы	Очень низкий	Очень высокий	Очень высокий		Высокий
Колумелла (2-3 ряд от ПЦ)	Очень низкий	Высокий	Высокий		Средний
Колумелла (4-5 ряд от ПЦ)	Очень низкий	Средний	Средний		Средний
БКЧ	Низкий	Низкий	Низкий		Низкий

2.4.2.2. Формулировка гипотезы о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии PIN белков и их полярной локализации

Ранее было показано, ауксин регулирует экспрессию PIN генов дозозависимо [96], но в этой работе не было проведено сравнение эффективных концентраций этого гормона для разных PIN. Мы сопоставили схемы экспрессии PIN полученные в главе 2.4.1.1 (Рис. 12А) с консенсусным распределением ауксина (Рис. 12Б). Нам показалось интересным, что разные PIN белки предпочитают экспрессироваться в областях с определенными

концентрациями ауксина. 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, следующим образом: снижение концентрации от промежуточной до низкой последовательно активирует гены PIN7, PIN4, PIN3, а повышение от промежуточной до наибольшей концентрации приводит также последовательно к экспрессии PIN7, PIN3, PIN4. Это позволило предположить гипотезу, что разные дозы ауксина напрямую или опосредованно определяют экспрессию определенных PIN белков (Рис. 12В).

Кроме того, можно заметить, что клетки с разной внутриклеточной концентрацией ауксина имеют разную полярную локализацию PIN (Рис. 12Г). Действительно, в колумелле и ПЦ, где наблюдается высокий уровень ауксина, все PIN белки локализуются не полярно. В сосудистой системе в клетках с промежуточным уровнем ауксина все экспрессирующиеся белки локализуются на нижней стороне. Во внешних слоях PIN2 может локализоваться как на нижней, так и на верхней стороне. В эпидермисе, где наблюдаются самые низкие концентрации, PIN2 локализуется строго на верхней стороне. В кортексе PIN2 переходит на верхнюю сторону примерно с середины меристематической зоны, что также может быть объяснено падением концентрации ауксина в этой области. Именно специфичность полярной локализации PIN белков является решающим фактором в формировании распределения ауксина. Дальнейшее исследование предложенной в данной работе гипотезы проводилось в экспериментах и методом математического моделирования.

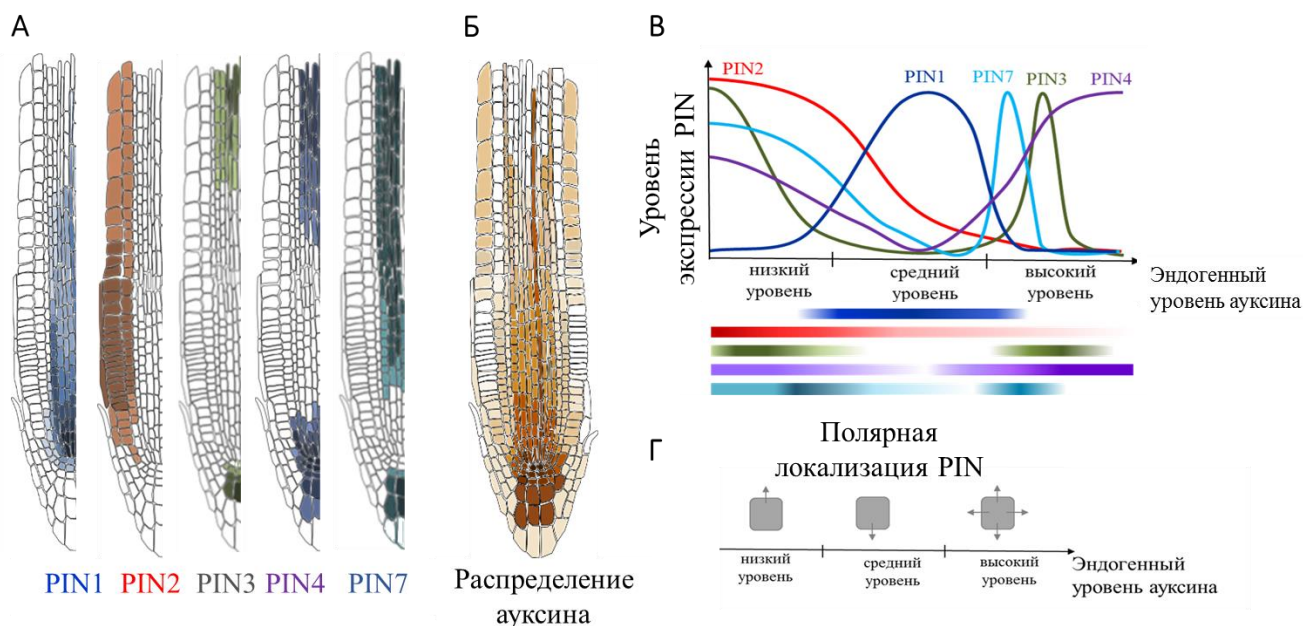


Рисунок 12. Гипотеза о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии PIN белков. А, карты паттернов экспрессии PIN, полученные в главе 2.4.1.1. Б, карта распределения ауксина, полученная на основе экспериментальных данных по ауксин-чувствительным репортерным конструкциям DR5, DII::VENUS, R2D2 и данным масс-спектрометрии (Таблица 2). В,Г, гипотеза о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии и полярной локализации PIN белков.

2.4.2.3. Экспериментальный анализ влияния экзогенного ауксина на экспрессию PIN белков

Для проверки гипотезы о роли ауксина в формировании паттерна PIN (Рис. 12В-Г) был проведен анализ изменений экспрессии PIN белков после обработки разными концентрациями НУК.

Для количественной оценки эффекта ауксина на экспрессию PIN мы проанализировали изображения корней после обработки проростков дикого типа и PIN::PIN-GFP разными дозами экзогенного ауксина (НУК 0.01 – 1 μM , 24 ч). В ответ на экзогенный ауксин каждый из PIN белков увеличивал домен и интенсивность своей экспрессии, но максимальный эффект для каждого PIN наблюдался при разных дозах ауксина (Рис. 13А).

Чтобы дать количественную оценку изменениям экспрессии PIN, мы сравнили среднюю и максимальную интенсивности свечения флуоресцентных сигналов при разных обработках в сравнении с контролем. В результате, статистически значимые отличия для всех PIN были получены только для

данных максимальной интенсивности свечения сигналов. Статистический анализ этих данных показал, что наибольшее значимое изменение (p -value<0.05, U-критерий) уровня экспрессии PIN1 по сравнению с контролем наблюдались при концентрации 0,1 μ M НУК, когда максимальная интенсивность его свечения увеличилась в 2,13 раз по сравнению с контролем (Рис. 13 Б). PIN2 значимо повысил интенсивность свечения в 1,43 раза при 0,01 и 0,1 μ M, PIN3 в 1,49 и 1,21 раз при 0,01 и 0,5 μ M, соответственно. PIN4 в 1,93 и 2,15 раз при 0,1 и 0,5 μ M, PIN7 в 2,03 и 1,37 раз при 0,05 и 0,5 μ M. При обработке высокой концентрацией ауксина (1 μ M НУК) наблюдались морфологические изменения в корне, что приводило к укорочению доменов экспрессии всех исследуемых белков по сравнению с контролем, однако значимое снижение максимальной интенсивности было получено только для PIN1 (на 34% ниже, чем в контроле) и PIN4 (на 38 % ниже, чем в контроле). Результаты полученные при иммунолокализации PIN белков и на репортерных линиях совпадали для всех PIN белков, кроме PIN4. Так как экспрессия в нескольких PIN4::PIN4-GFP линиях отличалась от известного паттерна PIN4, в итоговый результат принимались лишь данные, полученные при иммуногистохимической окраске специфическим антителом к PIN4.

Результаты количественного анализа интенсивности экспрессии PIN белков в ответ на экзогенный ауксин подтвердили предположение о том, что разные PIN белки чувствительны к разным дозам ауксина. На рисунке 13В представлено выравнивание профилей экспрессии разных PIN в зависимости от дозы ауксина, выявленные в эксперименте и предложенные в гипотезе. Видно, что данные эксперимента хорошо согласуются с исходной гипотезой для всех PIN белков, кроме PIN4, для которого значимые изменения были выявлены только при добавлении высоких концентраций НУК (0,5 μ M).

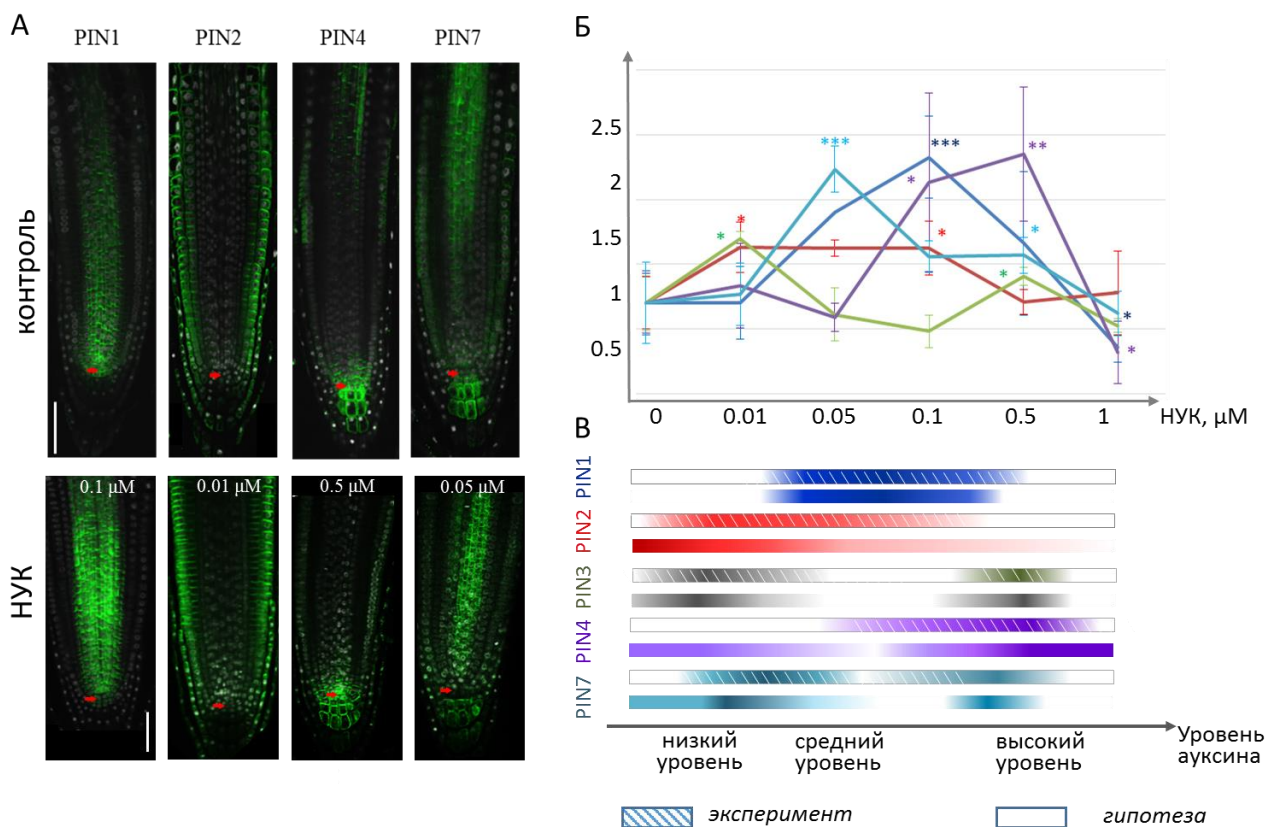


Рисунок 13. Изменения паттерна экспрессии PIN после обработки разными концентрациями НУК. А, микрофотографии кончиков корней с иммулокализацией PIN растений *A. thaliana* дикого типа и после 24 часовой обработки разными концентрациями НУК. Б, графики изменения максимальной интенсивности свечения PIN при разных концентрациях НУК. * p -value<0.05; **<0.01; ***<0.001. В, профили экспрессии PIN в зависимости от уровня ауксина полученные в эксперименте (рис. 13Б) в сравнении с предложенной гипотезой (рис. 12В)

2.4.2.4. Экспериментальный анализ влияния повышения эндогенного уровня ауксина на экспрессию PIN белков

Эксперименты с экзогенным ауксином могут не совсем корректно моделировать события происходящих при повышении концентрации ауксина в естественных условиях. Обработка экзогенным ауксином не означает, что его концентрация в каждой клетке равномерно повысится на определенное значение. Поэтому мы дополнительно провели анализ экспрессии белков PIN1, PIN2, PIN4 и PIN7 методом иммулокализации в мутанте *ucl1-D*, который характеризуется повышенным уровнем эндогенного ауксина [64].

В результате в *ucl1-D* были выявлены значительные изменения уровня экспрессии только для PIN2. Для того, чтобы количественно оценить насколько

снижился уровень экспрессии этого белка, изображения с одинаковым значением Master gain в контроле и *usc1-D* были экспортированы из ZEN и далее анализировались в программе ImageJ. В результате, значение максимальной интенсивности свечения PIN2 в *usc1-D* было снижено в среднем на 47% по сравнению с контролем ($p\text{-value} < 0.05$, U-критерий). Для остальных PIN белков значимые изменения в уровне экспрессии не наблюдались.

2.4.2.5. Влияние ауксина на полярную локализацию PIN

Кроме ауксин-зависимой регуляции уровня экспрессии PIN, мы также предполагаем схожий принцип регуляции полярной локализации этих белков (Рис. 12Г). Поэтому при анализе экспериментальных изображений после обработки ауксином отдельное внимание было уделено изменению полярной локализации PIN белков. Так как структура меристемы при увеличении эндогенного или экзогенного ауксина не претерпевала значительных изменений, то и полярная локализация PIN белков в ее функциональных доменах как правило не менялась. Поэтому дальнейшая проверка гипотезы о влиянии ауксина на полярную локализацию PIN на непротиворечивость проводилась в математической модели (глава 3).

2.4.2.6. Функциональная избыточность PIN1

Известно, что совместное функционирование генов PIN в корне определяет паттерн распределения ауксина [55]. При этом большинство одиночных мутантов *pin* не проявляют фенотипических аномалий в корне, что вероятно объясняется функциональной избыточностью этих генов [96]. Функциональная избыточность PIN1 в корне показана только в *pin2* мутанте, где PIN1 эктопически экспрессируется в эпидермисе и кортексе. Есть большое количество данных с описанием паттернов экспрессии PIN1 в множественных мутантах *pin*, однако они не позволяют проследить насколько PIN1 может замещать функции каждого другого PIN. Здесь мы более детально исследовали роль функциональной избыточности *PIN1* относительно других генов

семейства *PIN*. А именно, мы изучили изменения паттерна экспрессии PIN1 в меристеме корня во всех одиночных мутантах по другим генам *PIN*, экспрессируемым в корне (*pin2*, *pin3*, *pin4* и *pin7*), с помощью антитела к PIN1.

Анализ изображений корней мутантных растений выявил некоторые изменения в распределении PIN1 по сравнению с диким типом. Все выявленные изменения представлены в таблице 3.

Таблица 3. Изменения домена экспрессии PIN1 в корнях одиночных мутантов *pin*. Стрелки указывают полярную локализацию белка в клетке. Для каждой ткани в скобках указан процент изображений в которых наблюдалось данное изменение экспрессии PIN1. ПЦ – покоящийся центр.

	эпидермис	кортекс	стель	колумелла
<i>pin2</i>	Эктопическая экспрессия в 6-16 клетках от ПЦ (75%), ↑	Расширенный домен до 24 клетки от ПЦ (100%), ↓		Эктопическая экспрессия во втором ряду (85%), ↕
<i>pin3</i>			Расширенный домен до 24 слоя от ПЦ (75%), ↓	Эктопическая экспрессия во 2-4 рядах (75%), ↕
<i>pin4</i>			Расширенный домен до 30 слоя от ПЦ (70%), ↓	
<i>pin7</i>			Расширенный домен до 25 слоя от ПЦ (60%), ↓	Эктопическая экспрессия во втором ряду (80%), ↕

Так, в мутанте *pin2* часто наблюдалась эктопическая экспрессия PIN1 в эпидермисе, примерно с 6 по 16 ряд от ПЦ (75% изображений корней). При этом PIN1 локализовался на верхней стороне клеток. Также в кортексе область экспрессии PIN1 всегда была значительно увеличена, высокий уровень экспрессии обнаруживался до 18 ряда клеток, далее до 24 ряда уровень экспрессии снижался, но локализация всегда оставалась на нижней стороне. В стеле, эндодермисе и нише стеловых клеток домен экспрессии PIN1 не изменился. Удивительно, что в *pin2* мутанте он дополнительно эктопически

экспрессировался в колумелле (85% изображений корней), но уровень экспрессии был намного слабее, чем в стеле. В мутантах *pin3*, *pin4*, *pin7* домен экспрессии PIN1 в сосудистой системе удлинился, он уходил далеко в зону элонгации в 75%, 70% и 60% случаев, соответственно. В колумелле PIN1 обнаруживался и имел не полярную локализацию только в *pin3* и *pin7* мутантах (72% и 80% изображений, соответственно). При этом в *pin3* он экспрессировался в 3 рядах от ПЦ, а в *pin7* только в первом ряду. В остальных тканях в *pin3*, *pin4* и *pin7* мутантах изменений в доменах экспрессии PIN1 не обнаружено, по сравнению с диким типом.

Результаты проведенного анализа показали, что PIN1 действительно изменил паттерн своей экспрессии в некоторых тканях в одиночных мутантах *pin*. Можно предположить, что механизмом, определяющим функциональную избыточность PIN1, также является ауксин-зависимая регуляция его экспрессии.

2.4.2.7. Заключение по экспериментальному исследованию роли ауксина в экспрессии PIN

На основе сопоставления паттернов экспрессии PIN с распределением ауксина была сформулирована гипотеза о дозозависимой регуляции ауксином экспрессии своих белков-транспортеров семейства PIN и их полярной локализации.

Экспериментальная проверка гипотезы, включающая анализ изменений паттернов экспрессии PIN после обработки проростков *A. thaliana* разными концентрациями экзогенного ауксина, показала, что обратная связь в регулировании экспрессии PIN транспортеров ауксином является дозозависимой, причем разные PIN экспрессируются в разных диапазонах концентрации этого гормона. Так, для PIN1 оптимальной концентрацией является - 0,1 μM , для PIN2 - 0,01 и 0,1 μM , для PIN3 - 0,01 и 0,5 μM , PIN4 - 0,1 и 0,5 μM и PIN7 - 0,05 и 0,5 μM НУК. При этом максимальное повышение уровня

экспрессии в ответ на повышение концентрации экзогенного ауксина было в следующей последовательности: PIN3, PIN2<PIN7<PIN1<PIN4.

Повышенный эндогенный уровень ауксина в мутантах *usc1-D* вызывал значительное снижение уровень экспрессии PIN2, для остальных PIN не были выявлены изменения в этом мутанте.

ГЛАВА 3. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ ЭКСПРЕССИИ PIN ТРАНСПОРТЕРОВ В КОРНЕ

Данная глава посвящена изучению процессов самоорганизации паттернов распределения ауксина и его PIN-транспортеров в меристеме корня *A. thaliana* методами математического моделирования.

Ранее с помощью математического моделирования было показано, что определенное экспериментально расположение PIN белков в АМК достаточно для формирования максимума концентрации ауксина в клетках, соответствующих ПЦ [12], [48]. В ИЦиГ также были проведены серии теоретических исследований по этому вопросу [57], [68], [69]. В модели Мироновой и соавторов (2012) было показано, что ауксин-зависимая экспрессия трех PIN белков способна генерировать паттерн распределения ауксина с максимумом в клетках, соответствующих ПЦ, и градиентами концентрации в обоих направлениях вдоль вертикальной оси корня.

Известно, что в АМК экспрессируются пять членов семейства PIN (PIN1-PIN4, PIN7), ассиметричное расположение которых на плазматической мембране клеток, формирует направленные потоки ауксина. В математических моделях, описанных в главе 1.5.1., полярная локализация PIN белков задавалась в начальных условиях и различалась для каждого рассматриваемого белка. Согласно проведенному в данной диссертационной работе анализу экспериментальных данных, мы наблюдали, что все PIN белки экспрессирующиеся в одной клетке локализуются одинаково (либо на нижней стороне клетки, либо на верхней, либо на всех сторонах). В соответствии с этим, мы предположили, что определение полярной локализации PIN белков в клетке может обеспечиваться на основе позиционной информации, а не являться функцией PIN белка. Такую позиционную информацию может давать распределение ауксина. С учетом этого наблюдения и экспериментальных данных, полученных в главе 2, мы выдвинули гипотезу о том, что паттерны экспрессии PIN белков и их полярная локализация могут детерминироваться в

клетках кончика корня на основе позиционной информации, задаваемой распределением ауксина (Рис. 12).

Для проверки данной гипотезы на непротиворечивость необходимо было применить методы математического моделирования. Для этого мы использовали модель типа «клеточный автомат», созданную Казанцевым Федором (ИЦиГ СО РАН), которая описывает перераспределение морфогена по прямоугольному массиву клеток. Выбор модели был связан с необходимостью моделирования дозозависимой смены полярной локализации PIN (смены направления потока ауксина), что потребовало бы динамического переписывания системы уравнений. Поэтому мы адаптировали модель КА, таким образом, что в качестве морфогена рассматривается ауксин, который перемещается по ткани диффузией и активным транспортом в меристеме корня. В зависимости от концентрации ауксина в клетке определяется набор экспрессирующихся PIN и их полярная локализация.

При развитии модели мы использовали принцип ауксин-зависимой экспрессии PIN, предложенный в модели Мироновой и соавторов (2012) [69], экстраполировав его на все PIN белки с учетом экспериментальных данных (глава 2.4.2.3.). В отличие от других типов математических моделей, применение метода клеточных автоматов позволило придать каждой клетке возможность «дифференцироваться» в процессе расчета, через изменение полярности и набора экспрессирующихся PIN транспортеров.

3.1. Моделируемая область клеточного автомата

Моделируемая область корня представлена в виде прямоугольного массива фиксированного размера 25*14 клеток. Линейные размеры клеток (ширина и длина) были определены на реальных корнях *A. thaliana* с помощью программы ImageJ. С целью минимизации сложности модели, ширина клеток, расположенных в разных слоях (эпидермисе, кортексе, эндодермисе, перицикле, сосудистых тканях), соответствовала ширине соответствующего слоя на расстоянии 20 клеток от ПЦ (250 мкм); изменение длины клеток вдоль

продольной оси корня было задано одинаковым образом для всех слоев и соответствовало экспериментально-наблюдаемому для клеток, расположенных на оси, проходящей через перицикл, ПЦ и колумеллу в реальном корне (Рис. 14А). Результирующие размеры были нормированы на размеры клеток ПЦ, которые в модели были заданы как 10×10 мкм.

Чтобы 2D ансамбль клеток имитировал дифференцировку клеток меристемы *A. thaliana*, в модели были заложены ограничения на синтез белков-транспортеров PIN в зависимости от положения клеток в том или ином слое (Рис. 14Б). Во внутренних слоях, соответствующих эндодермису, перициклу и сосудистым тканям ($i = 3 - 12$) могут экспрессироваться PIN1, PIN3, PIN4, PIN7. Во втором и 13 рядах, соответствующих кортексу, экспрессируются PIN1, PIN2, PIN4, а в крайних рядах ($i = 1; 14$) PIN2 и PIN4. Эти ограничения были определены в соответствии паттернами экспрессии PIN наблюдаемыми в эксперименте (Рис. 12А).

3.2. Правила работы клеточного автомата

В данной модели мы рассматриваем лишь динамику распространения ауксина по массиву клеток. Экспрессия PIN белков в клетке определяется в зависимости от концентрации ауксина в двух состояниях: экспрессируется или не экспрессируется. Пороги включения и выключения экспрессии PIN белков, а также переключения полярности клеток, заданы в модели относительно концентрации ауксина (см. ниже). В силу того, что клетки обладают разным объемом, обмен ауксином между клетками осуществляется в количестве молекул, а не в концентрациях, как моделировалось ранее [69].

Единственным источником ауксина в системе является поток ауксина из побега, описанный для клеток внутренних слоев на верхней границе массива ($i=25; j=3 - 12$) (Рис. 14А). Для упрощения модели мы не учитывали процессы биосинтеза ауксина в меристеме корня, поскольку известно, что в 4-х дневных проростках основную роль в поддержании распределения ауксина в АМК играет поток из побега [60].

Распределение ауксина по массиву клеток моделировалось с помощью нерегулируемой диффузии и PIN-опосредованного активного транспорта. Диффузия осуществляется равномерно во все соседние клетки, а количество ауксина, перемещаемого таким образом между клетками, зависит от площади поверхности клетки (Рис. 14В).

Скорость активного транспорта, опосредованного разными PIN белками, была задана одинаковой в силу отсутствия экспериментальных данных, утверждающих обратное или позволяющих оценить эти скорости. Включение и выключение PIN белков задано кусочно-линейной функцией от концентрации ауксина (рис. 14Г), согласно гипотезе (Рис. 12В-Г). Для упрощения модели мы не рассматриваем динамику изменения концентрации PIN белков на мембране и в клетке. PIN белки экспрессирующиеся при данной концентрации ауксина в клетке работают в единственном определенном направлении в соответствии с правилами смены полярной локализации (Рис. 14Д).

В зависимости от концентрации ауксина, клетка может находиться в одном из трех состояний:

А. PIN белки осуществляют активный транспорт ауксина по направлению к побегу (вверх),

Б. PIN белки осуществляют активный транспорт ауксина по направлению к кончику корня (вниз),

В. Активный транспорт не полярнен и осуществляется через все 4 стороны клетки.

При увеличении концентрации ауксина в клетке переключение полярности происходит именно в последовательности от А к В (от В к А при уменьшении концентрации).

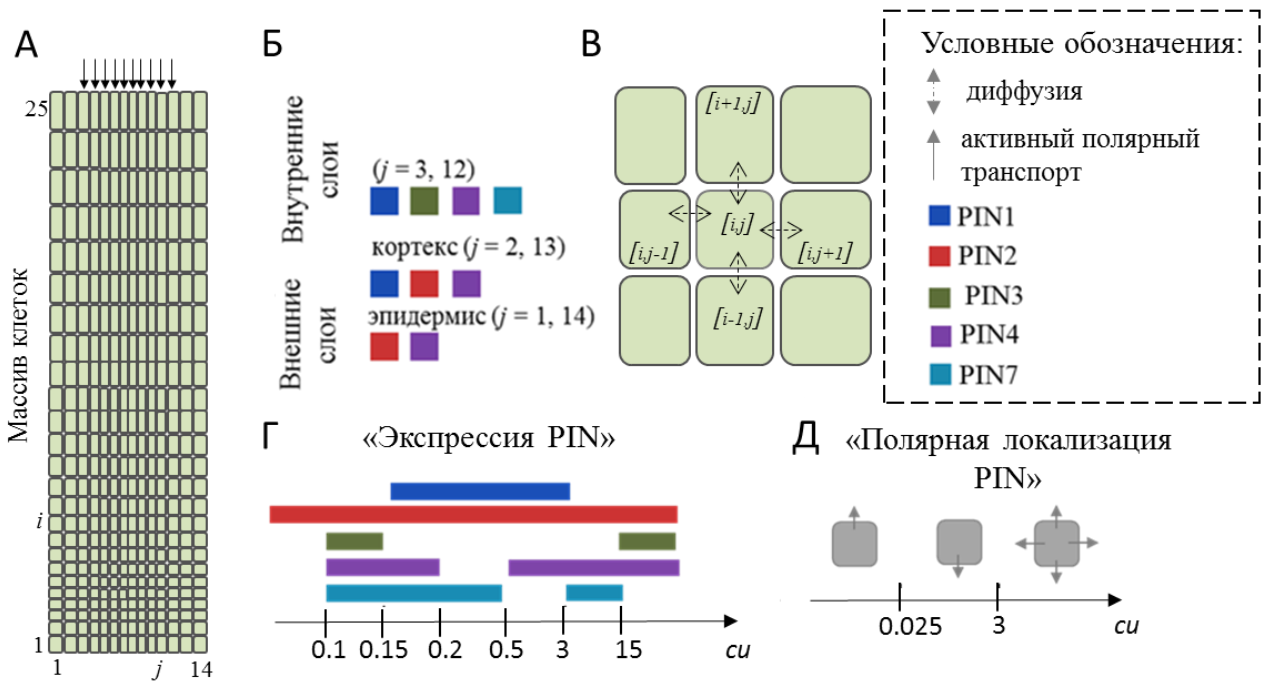


Рисунок 14. Основные принципы, заложенные в математическую модель регуляции экспрессии PIN белков в зависимости от уровня эндогенного ауксина.

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.

3.3. Математическая реализация модели

На каждой итерации расчета модели в клетке $[i;j]$ рассчитывается изменение концентрации ауксина (aux) по следующему правилу:

$$\Delta[aux]_{i,j} = J_{in} - J_{out},$$

где, скорость оттока ауксина J_{out} из клетки $[i;j]$ определяется как:

$$J_{out} = active_{i,j} + diffusion_{i,j} + degradation_{i,j}.$$

Деградация ауксина описана линейно в зависимости от концентрации ауксина и константы деградации K_d :

$$degradation_{i,j} = K_d * [aux]_{i,j}$$

Поток диффузии ауксина из клетки описан линейно от концентрации ауксина с константой скорости K_{diff} :

$$diffusion_{i,j} = K_{diff} * [aux]_{i,j}.$$

Диффузия описана равномерно через единицу длины клетки. Для расчета потока ауксина диффузией через стенку клетки рассчитывается отношение длины стенки l_{ij} к периметру клетки $P_{i,j}$.

$$P_{ij} = l_{ij}^{up} + l_{ij}^{down} + l_{ij}^{left} + l_{ij}^{right},$$

где $l_{ij} = 0$, если клеточная стенка внешняя, то есть не имеет соседей.

Активный транспорт линейно зависит от количества PIN белков экспрессируемых в клетке ($\sum PIN_{i,j}$), концентрации ауксина и константы активного транспорта K_a :

$$active_{i,j} = K_a * [aux_{i,j}] * \sum PIN_{i,j};$$

Приток ауксина J_{in} в клетку $[i,j]$ осуществляется из четырех соседних клеток и определяется по формуле:

$$J_{in} = \frac{J_{i,j-1}^{right} * V_{i,j-1} + J_{i,j+1}^{left} * V_{i,j+1} + J_{i-1,j}^{down} * V_{i-1,j} + J_{i+1,j}^{up} * V_{i+1,j}}{V_{i,j}}$$

Где V_{ij} – объем клетки $[i,j]$; а потоки в разных направлениях определяются по формулам:

$$J_{ij}^{up} = diffusion_{ij} * (l_{ij}^{up} / P_{i,j}) + active_{ij} * \begin{cases} 1, \text{ если состояние А} \\ 0, \text{ если состояние Б} \\ \frac{l_{ij}^{up}}{P_{i,j}}, \text{ если состояние В} \end{cases}$$

$$J_{ij}^{down} = diffusion_{ij} * (l_{ij}^{down} / P_{i,j}) + active_{ij} * \begin{cases} 0, \text{ если состояние А} \\ 1, \text{ если состояние Б} \\ \frac{l_{ij}^{down}}{P_{i,j}}, \text{ если состояние В} \end{cases}$$

$$J_{i,j}^{right} = diffusion_{ij} * (l_{ij}^{right} / P_{i,j}) + active_{ij} * \begin{cases} 0, \text{ если состояние А} \\ 0, \text{ если состояние Б} \\ \frac{l_{ij}^{right}}{P_{i,j}}, \text{ если состояние В} \end{cases}$$

$$J_{i,j}^{left} = diffusion_{ij} * (l_{ij}^{left} / P_{i,j}) + active_{ij} * \begin{cases} 0, \text{ если состояние А} \\ 0, \text{ если состояние Б} \\ \frac{l_{ij}^{left}}{P_{i,j}}, \text{ если состояние В} \end{cases}$$

Верхняя граница клеточного ансамбля была задана «открытой», с учетом того, что за ней находятся дифференцирующиеся клетки зоны элонгации. Связь меристемы корня с зоной элонгации осуществлялась через поток ауксина с постоянной скоростью K_{alpha} , описанного для клеток перцикла и сосудистой системы:

$$J_{i,j}^{alpha} = K_{alpha}.$$

3.4. Подбор параметров модели

Концентрация ауксина рассчитывалась в модели в концентрационных единицах (*cu*). Так как на данный момент не существует метода определения концентрации внутриклеточного ауксина (см. главу 1.2.4.), то мы задали пороги на ауксин-зависимую смену полярности клетки произвольным образом (Рис. 14Д):

Смена состояния с А на Б была задана при $aux=0.025\ cu$;

Смена состояния с Б на В была задана при $aux=3\ cu$.

Скорость $K_{alpha}\ cu/tu$ определялась таким образом, чтобы максимальная концентрация ауксина в стационарном решении модели возникла в пятом ряду клеток ($i = 5$). Такой выбор обусловлен тем, что в реальном корне максимум концентрации ауксина наблюдается в клетках ПЦ, отстающем в среднем на 5 клеток от кончика корня.

На следующем шаге мы подобрали пороги на включение/выключение экспрессии PIN опираясь на знания о полярностях PIN белков в различных клетках меристемы корня (Рис. 12А, Б). Согласно реализации гипотезы (Рис. 12 В, Г) в модели могут формироваться 14 клеточных типов (7 во внешних слоях и 7 во внутренних) различающихся по набору экспрессирующихся PIN и их полярности (Рис. 15). Пороги ауксин-регулируемой экспрессии PIN корректировались так, чтобы все 14 типов клеток (различающихся по набору экспрессирующихся PIN и их полярности) появились в полученном стационарном решении.

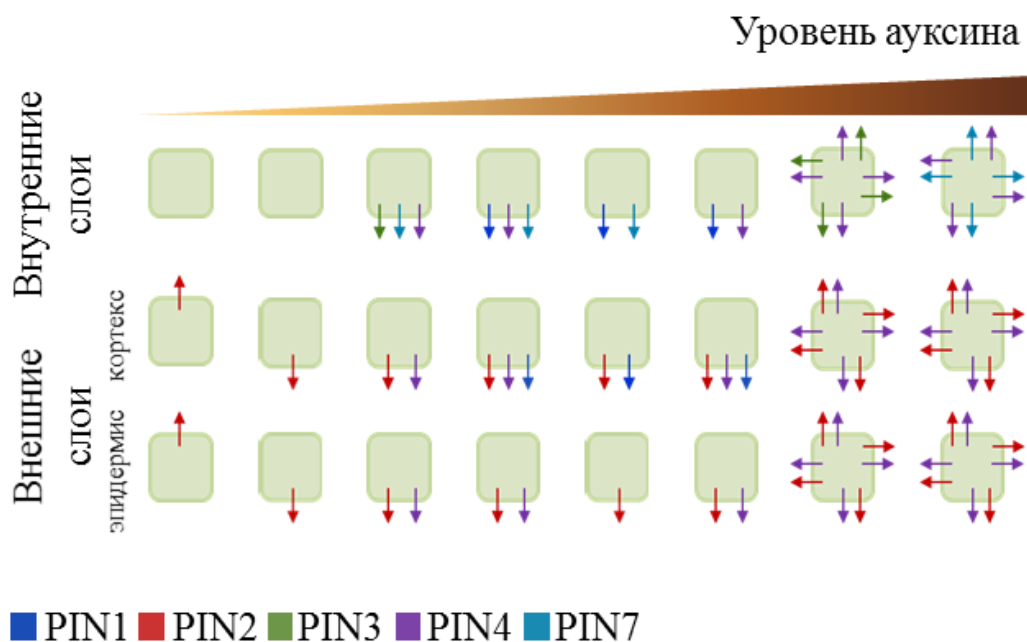


Рисунок 15. Сформированные согласно гипотезе (Рис. 12В, Г) клеточные типы, различающиеся по набору экспрессирующихся PIN и их полярной локализации.

В результате скорость потока ауксина в систему (K_{alpha}) была установлена на $0.2 \text{ } \mu\text{g}/\text{h}$. Экспрессия PIN белков происходит в следующих диапазонах концентрации ауксина: PIN1 от 0.15 до 3 μg ; PIN2 на всем диапазоне концентраций; PIN3 от 0.1 до 0.15 и от 15 μg ; PIN4 от 0.1 до 0.2 и от 0.5 μg ; PIN7 от 0.1 до 0.5 и от 3 до 15 μg (Рис. 14Г).

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. 16).

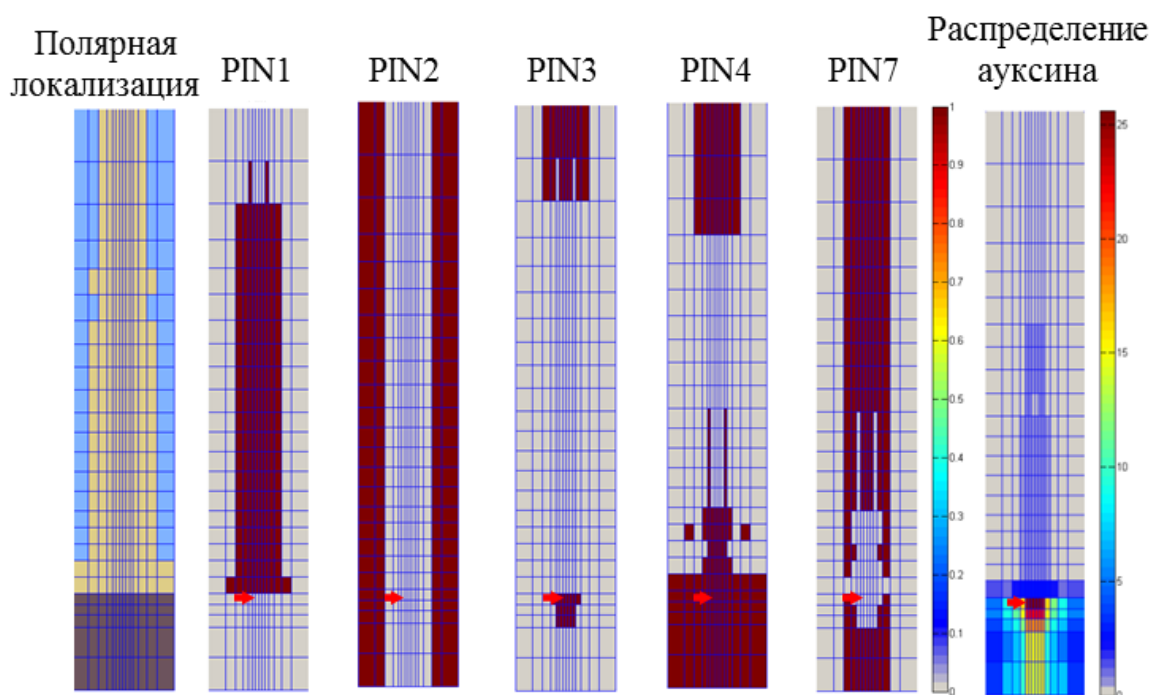


Рисунок 16. Стационарное решение математической модели. Полярная локализация обозначена цветом: голубой – локализация PIN на нижней стороне, желтый – на верхней, серо-фиолетовый – на всех сторонах клетки. Максимум концентрации ауксина – красный, минимум – серый. Красные стрелки указывают на положение ПЦ в реальном корне.

Если смотреть в динамике, то паттерн распределения ауксина самоорганизовывался одновременно с паттерном распределения PIN белков. А именно, в начальный момент времени в отсутствии ауксина все клетки модели имеют состояние «А» и в наружных слоях клеточного ансамбля экспрессируется только PIN2. С поступлением ауксина постепенно формируется его распределение по направлению к кончику корня, полученные концентрации приводят к смене состояния клеток во внутренних слоях с «А» на «Б», и одновременно начинают экспрессироваться PIN3, PIN4, PIN7. Когда домены экспрессии этих белков достигают 5 рядов клеток начинается экспрессия PIN1. Формирование домена PIN1 во внутренних слоях приводит к разделению доменов PIN3 и PIN4. Домен экспрессии PIN7 спускается к нижнему слою непрерывно. Когда домены экспрессии PIN1, PIN3, PIN4, PIN7 удлиняются больше, чем на $\frac{3}{4}$ всего клеточного ансамбля, клетки, соответствующие кортексу, постепенно меняют состояние с «А» на «Б». В результате функционирования всех PIN транспортеров поток ауксина доходит

до нижнего слоя и происходит его накопление, что приводит к смене состояния клеток данного слоя с «Б» на «В». Постепенно концентрация ауксина в этих клетках становится максимальной и максимум начинает сдвигаться до 5 клетки от кончика корня, изменяя состояние этих клеток аналогично нижнему слою. Затем формируется распределение ауксина в колумелле и в последнюю очередь генерируется градиент в сосудистой системе.

3.4.1. Исследование стационарного решения на устойчивость

Стационарное решение, описанное в главе 3.4, было исследовано на устойчивость к изменению параметров и начальных данных модели. На первом этапе были установлены интервалы варьирования параметров и начальных значений концентрации ауксина, при которых в стационарном решении сохранялся максимум концентрации ауксина в пятом ряду. Сохранение максимума концентрации ауксина в пятой клетке от кончика корня необходимо для сохранения идентичности клеток ПЦ, а значит и ниши ствольных клеток.

На втором этапе мы проанализировали расположение и размеры доменов PIN в решениях, полученных внутри установленных интервалов варьирования, с максимумом концентрации ауксина в 5 клетке.

3.4.1.1 Устойчивость распределения ауксина к изменению начальных данных модели

Распределение ауксина в модели оказалось устойчивым к локальному увеличению концентрации ауксина в отдельных клетках в пределах до 230 *ci*. Повышение концентрации ауксина во всех клетках от 0 до 1 *ci* также не приводило к изменению положения максимума концентрации ауксина в стационарных решениях (Рис. 17А-В). В то время как повышение концентрации ауксина в клетках более чем на 1.3 *ci* (или локальное повышение более чем на 230 *ci*) приводило к сдвигу максимума концентрации ауксина и увеличению области высоких концентраций в нижней части массива (Рис. 17Г). При сравнении значений максимальной концентрации ауксина в расчете, мы

обнаружили что в последнем случае (Рис. 17Г) оно ниже на 11,5 *си*, чем в контроле. Можно предположить, что такой характер изменения распределения ауксина приводил бы к морфологическим изменениям в меристеме корня, например, к увеличению размеров ПЦ.

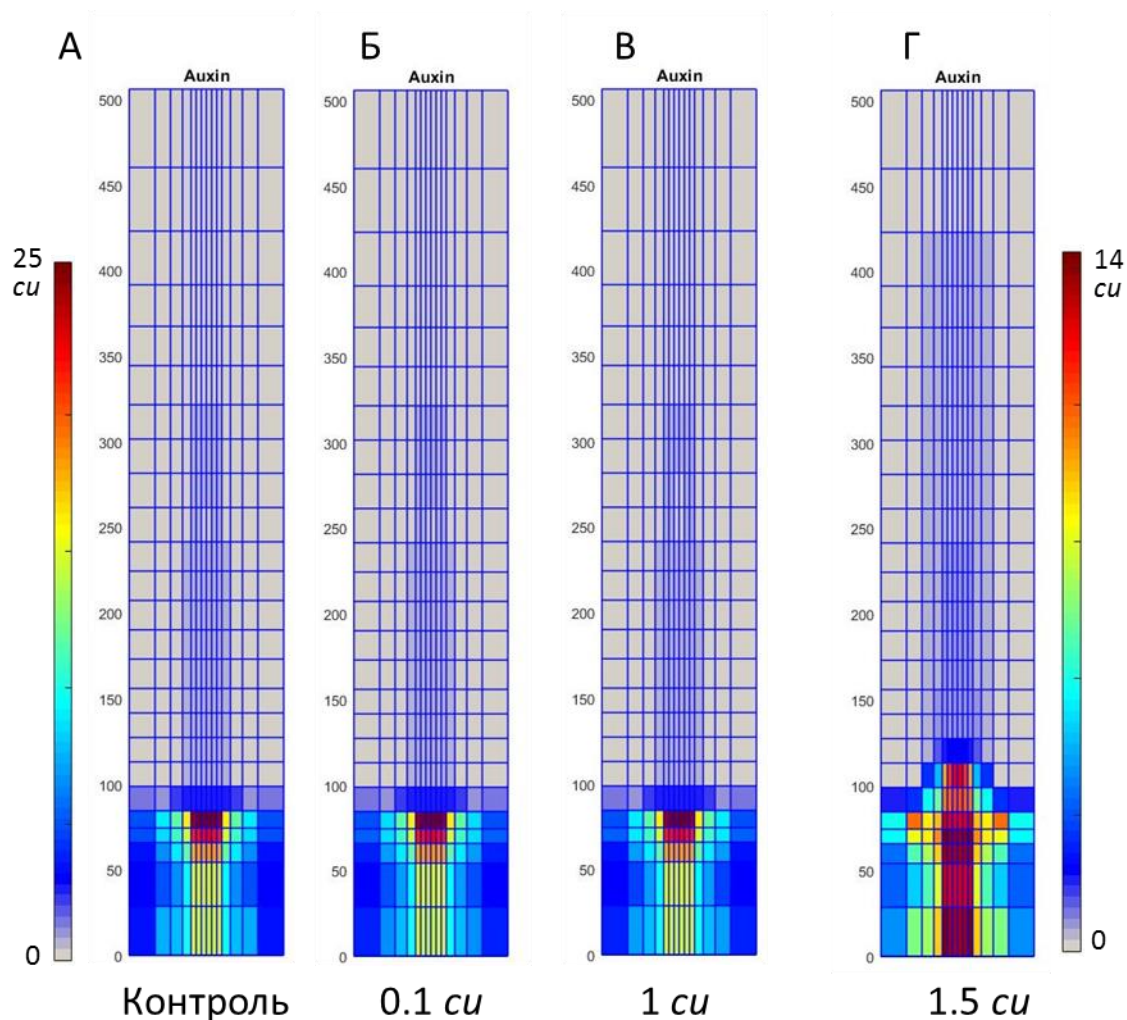


Рисунок 17. Распределения ауксина, полученные в стационарных решениях в контроле (А, при нулевых значениях ауксина в каждой клетке) и при изменении начальных условий (Б-Г, при повышении значениях ауксина в каждой клетке). Максимум концентрации ауксина – красный, минимум – серый. Первая шкала для рисунков А – В, вторая шкала для рисунка Г.

3.4.1.2 Устойчивость распределения ауксина к изменению порогов на переключение полярности

Следующим этапом было варьирование порогов смены полярной локализации PIN белков (Рис. 18). При изменении порога переключения А/Б (переход с локализации PIN на верхней стороне клетки к локализации на нижней стороне) в пределах от 0.005 *си* (Рис. 18Б) до 0.1 *си* распределение ауксина не отличалось

от контрольного стационарного решения (Рис. 18А). При повышении этого порога до $0,11 \text{ ci}$ максимум локализовался в первом ряду клеток (Рис. 18В) что свидетельствует о том, что потока ауксина из побега K_{alpha} стало недостаточно для поддержания максимума концентрации ауксина на расстоянии от кончика корня. Распределение ауксина оказалось более чувствительным к изменению второго порога переключения Б/В (переход с локализации PIN на нижней стороне клетке к локализации на всех сторонах). При снижении этого порога до 2.75 ci максимум концентрации ауксина поднимался в шестую клетку, но его значение было ниже на 7 ci , чем в контроле (Рис. 18Г). При повышении этого порога до 3.5 ci максимум сдвигался в обратную сторону, локализуясь в первом ряду клеток (Рис. 18Д), аналогично случаю с сильно завышенным первым порогом (Рис. 18В).

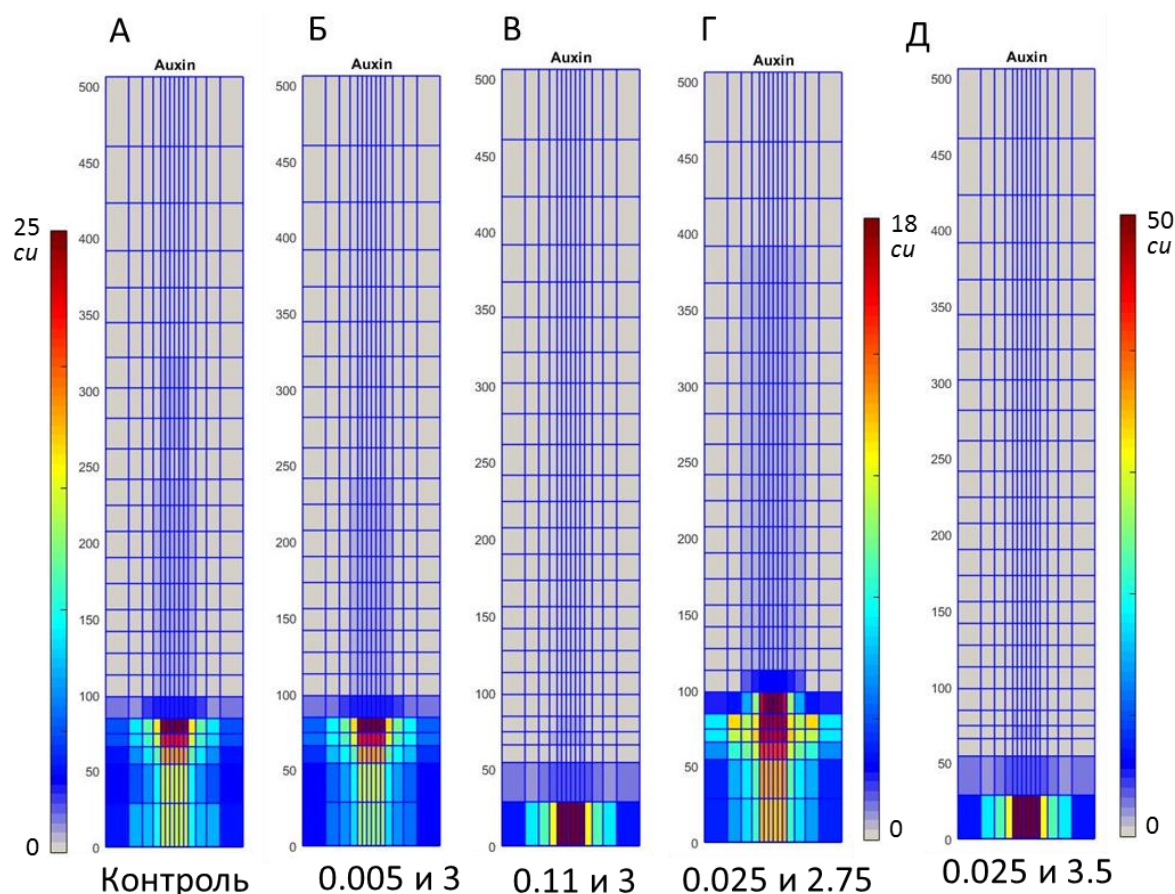


Рисунок 18. Распределения ауксина, полученные в стационарных решениях в контроле (А, при значениях порогов переключения полярности 0.025 ci и 3 ci) и при изменении порогов (Б, В, при изменении первого порога; Г, Д, при изменении второго порога). Максимум концентрации ауксина – красный, минимум – серый.

3.4.1.3. Устойчивость распределения ауксина к изменению порогов включения/выключения PIN белков

На рисунке 14Г указаны подобранные значения шести пороговых концентраций для контроля. В ходе данного исследования варьирования этих порогов происходило в следующих диапазонах:

1. От 0.05 *си* до 0.125 *си*;
2. От 0.125 *си* до 0.175 *си*;
3. От 0.225 *си* до 0.250 *си*;
4. От 0.4 *си* до 0.55 *си*;
5. От 2 *си* до 4 *си*;
6. От 12.5 *си* до 17.5 *си*.

Изменение порогов для включения/выключения экспрессии PIN не приводило к изменению в положение максимума концентрации ауксина в распределении.

Таким образом можно заключить, что математическая модель, предложенная в данной работе, показывает значительную устойчивость в формировании максимума концентрации ауксина в пятой клетке от кончика корня как при изменении начальных условий, так и при варьировании порогов экспрессии PIN и их полярной локализации. Интервалы варьирования параметров значительно превышали таковые, наблюдаемые для модели в обыкновенных дифференциальных уравнениях [69].

3.4.2. Устойчивость доменов экспрессии PIN белков к варьированию параметров

Следующим этапом моей работы, было исследование устойчивости паттернов PIN при тех вариантах параметров, когда в стационарном решении сохранялся максимум концентрации ауксина в пятой клетке.

Домены экспрессии PIN были менее стабильными к изменению начальных данных и пороговых концентраций, чем распределение ауксина. При варьировании порогов на включение/выключение экспрессии PIN, домены

экспрессии PIN белков менялись предсказуемым образом. Менее устойчивыми были паттерны белков PIN3, PIN4 и PIN7, они изменялись при варьировании четырех порогов (1, 3, 4, 6). Паттерн PIN1 был чувствительный только к уменьшению пятого порога. В этом случае он начинался на 1 ряд клеток позднее, чем в контроле.

При повышении концентрации ауксина в начальных данных до 1,3 *си* в каждой клетке, мы наблюдали увеличение домена экспрессии PIN1 и уменьшение проксимальных доменов PIN3/PIN7, а также в кортексе увеличивался домен экспрессии PIN2 поляризованного вниз (Рис. 19А-Б).

Наиболее устойчивым к варьированию порогов смены полярной локализации был паттерн белка PIN1 (Рис. 19В, Г). А наиболее чувствительными домены белков PIN3, PIN4 и PIN7 в нижней части массива клеток, который соответствует кончику корня до ПЦ. В то время, как при снижении первого порога смены полярности до 0.005 *си* отсутствовала смена полярной локализации PIN2 в кортексе, а в эпидермисе домен с локализацией этого белка на нижней стороне клетки был больше на 13 клеток (Рис. 19В).

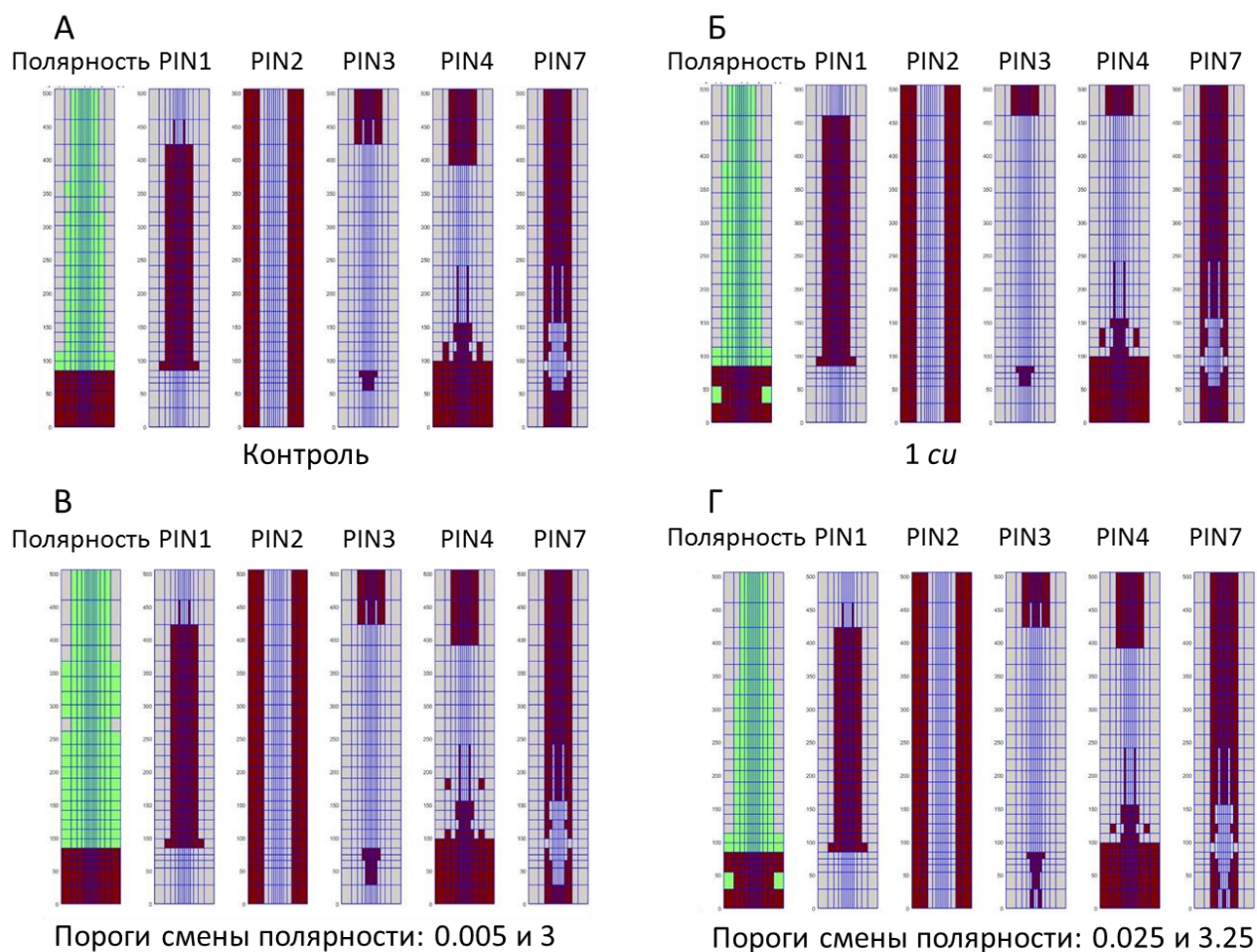


Рисунок 19. Паттерны PIN белков, полученные в стационарных решениях в контроле (А), при изменении начальных условий (Б, при повышении значения ауксина в каждой клетке), при изменении порогов полярности (В, при изменении первого порога; Г, при изменении второго порога).

3.5. Сравнительный анализ локализации PIN белков в *in vivo* и *in silico* экспериментах

Для удобства сравнения паттернов получившихся в результате расчетов модели с экспериментальными данными, изображения из прямоугольного массива были перенесены в оцифрованное изображение реального корня (Рис. 20).

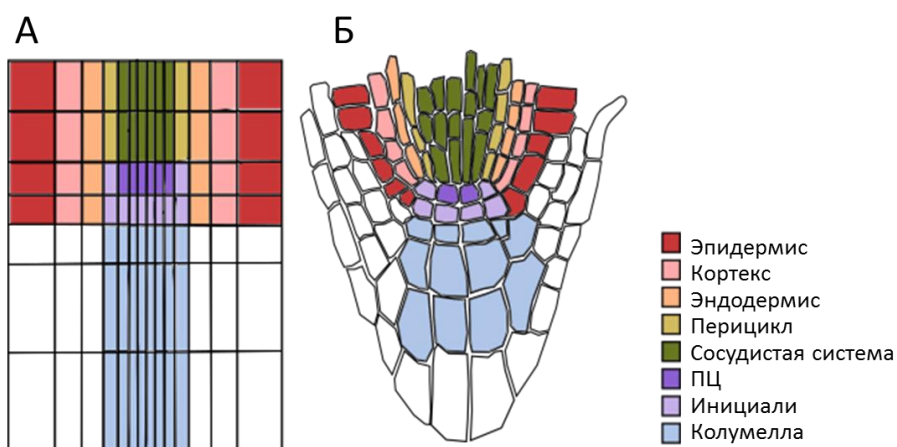


Рисунок 20. Соотношение клеток моделируемого корня (А) с оцифрованным изображением реального корня *A. thaliana* (Б).

Получившийся паттерн распределения ауксина и домены экспрессии белков транспортеров семейства PIN хорошо согласовывались с данными эксперимента полученным для дикого типа (Рис. 21). Это говорит о непротиворечивости предложенной нами гипотезы (Рис. 12В, Г), то есть экспериментально показанной регуляции ауксином экспрессии PIN-белков в корне достаточно для генерации позиционной информации, позволяющей адекватно локализовать домены PIN белков.

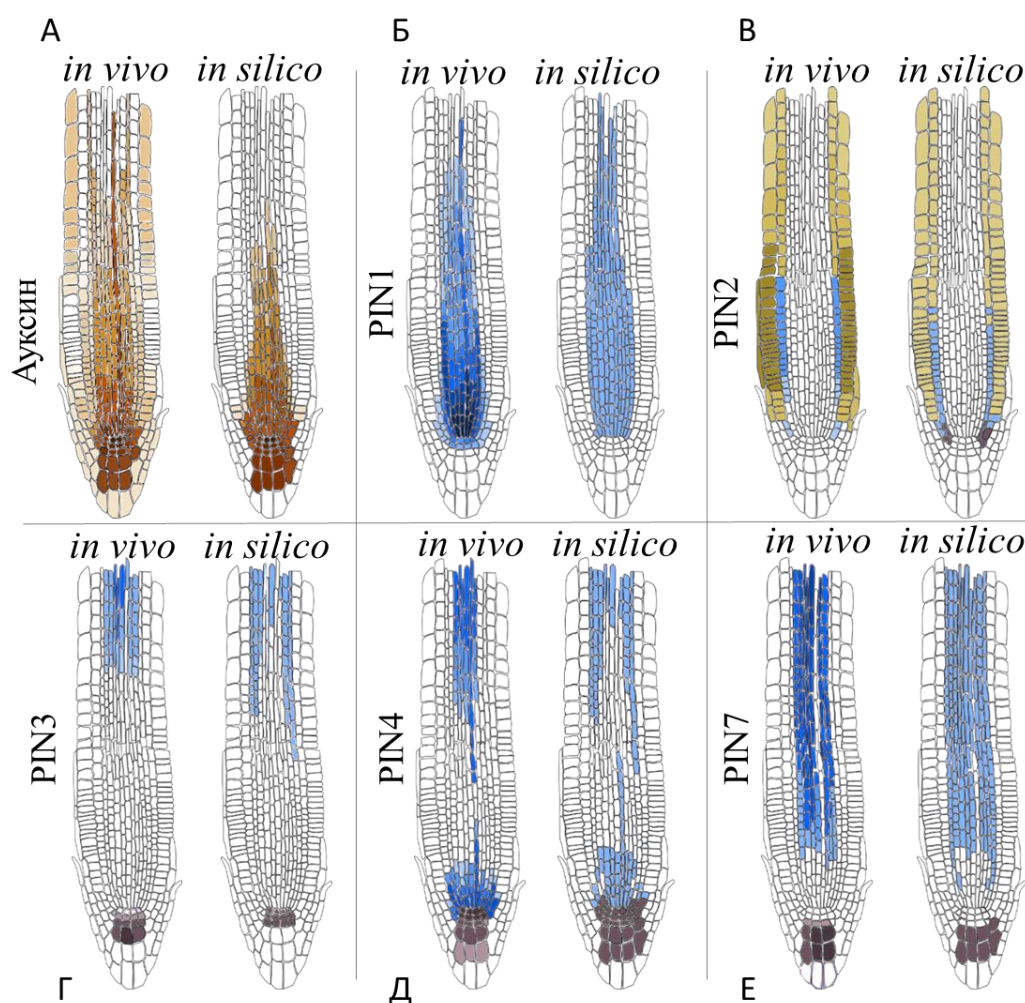


Рисунок 21. Паттерны распределения ауксина и экспрессии PIN белков на продольном срезе кончика корня дикого типа *A. thaliana* в *in vivo/in silico* экспериментах. Результаты моделирования преобразованы из прямоугольного массива в макет корня *Arabidopsis*. А, Схема *in vivo* (слева) показывает распределение ауксина, составленное на основе экспериментальных данных (глава 2.4.2.1.) Схема *in silico* (справа) показывает распределение ауксина формирующиеся в стационарном решении математической модели. 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. Шкала - 50 мкм.

3.6. Математическая модель для *35S::PIN1*

Для проверки адекватности модели, ее работа была проверена в независимом эксперименте. Учитывая наличие обратной связи в функционировании PIN транспортеров и формируемого ими распределения ауксина можно предположить, что изменения в экспрессии одного из PIN

повлияет на градиент ауксина, а значит и на распределение оставшихся PIN. В качестве независимой проверки этого предположения была выбрана трансгенная линия *35S::PIN1*. Для расчета распределения ауксина в этой линии в модели, экспрессия PIN1 была сделана независимой от концентрации ауксина, остальные условия модели остались неизменными (см. главу 3.2.). В результате численного расчета мы получили стационарное решение, в котором формировалось распределение ауксина и всех PIN, но в сравнении с контролем мы нашли целый ряд изменений.

А именно, максимум концентрации ауксина формировался также в пятой клетке от кончика корня, но его условная концентрация была на 10 единиц ниже, чем в модели для дикого типа (рис. 22А). Это изменение в распределении ауксина привело к следующим изменениям в паттернах экспрессии и полярной локализации PIN. Несмотря на то, что PIN1 экспрессировался во всех клетках, его полярная локализация различалась. В клетках, соответствующих КЧ он локализовался на всех сторонах клетки, в наружных слоях преимущественно на верхней стороне, за исключением кортекса в МЗ, во всех остальных клетках PIN1 располагался на нижней стороне (рис. 22Б). Домен экспрессии PIN2 в кортексе, где он располагается на нижней стороне сократился, по сравнению с диким типом (рис. 22В). Домен PIN3 редуцировался в клетках, соответствующих колумелле (рис. 22Г). В сосудистой системе домен PIN4 сократился в начале меристематической зоны (рис. 22Д). Напротив, домен PIN7 удлинился в сосудистой системе, и расширился в колумелле на 1 ряд (рис. 22Е).

3.7. Экспериментальная проверка предсказаний расчетов модели для *35S::PIN1*

Чтобы проверить предсказания модели, мы провели экспериментальный анализ экспрессии PIN в трансгенных растениях *35S::PIN1*, с помощью специфических антител. Фенотипически корни 3-х дневных проростков *35S::PIN1* отличались от корней дикого типа только слабым проявлением агравитропизма, что возможно связано с экспрессией PIN1 во всех тканях.

Анализ микроизображений выявил совпадения в доменах экспрессии исследуемых PIN и в их полярной локализации, а также некоторые различия, в сравнении с результатами *in silico* эксперимента (рис. 22А). Паттерны экспрессии PIN1 и PIN7 наблюдаемые *in vivo* полностью совпали с предсказаниями модели (Рис. 22Б, Е). Для белка PIN2 домены экспрессии в эпидермисе и кортексе полностью совпали с предсказаниями модели (Рис. 22В). Интересно, что предсказанное в модели сокращение домена PIN2 локализованного вниз в кортексе, также наблюдалось в эксперименте. В *in vivo* эксперименте домен экспрессии PIN4 был подтвержден для колумеллы и нижней части меристематической зоны, тогда как в верхней части меристематической зоны экспрессия этого белка не отмечалась (Рис. 22Д).

Комплексный подход позволил получить независимые доказательства того, что изменение экспрессии одного из PIN приводит к перераспределению оставшихся транспортеров, вследствие изменения в распределении ауксина. Результаты экспериментального анализа во многом совпали с результатами математического моделирования. Дополнительно, эксперимент выявил, как изменился уровень экспрессии PIN белков.

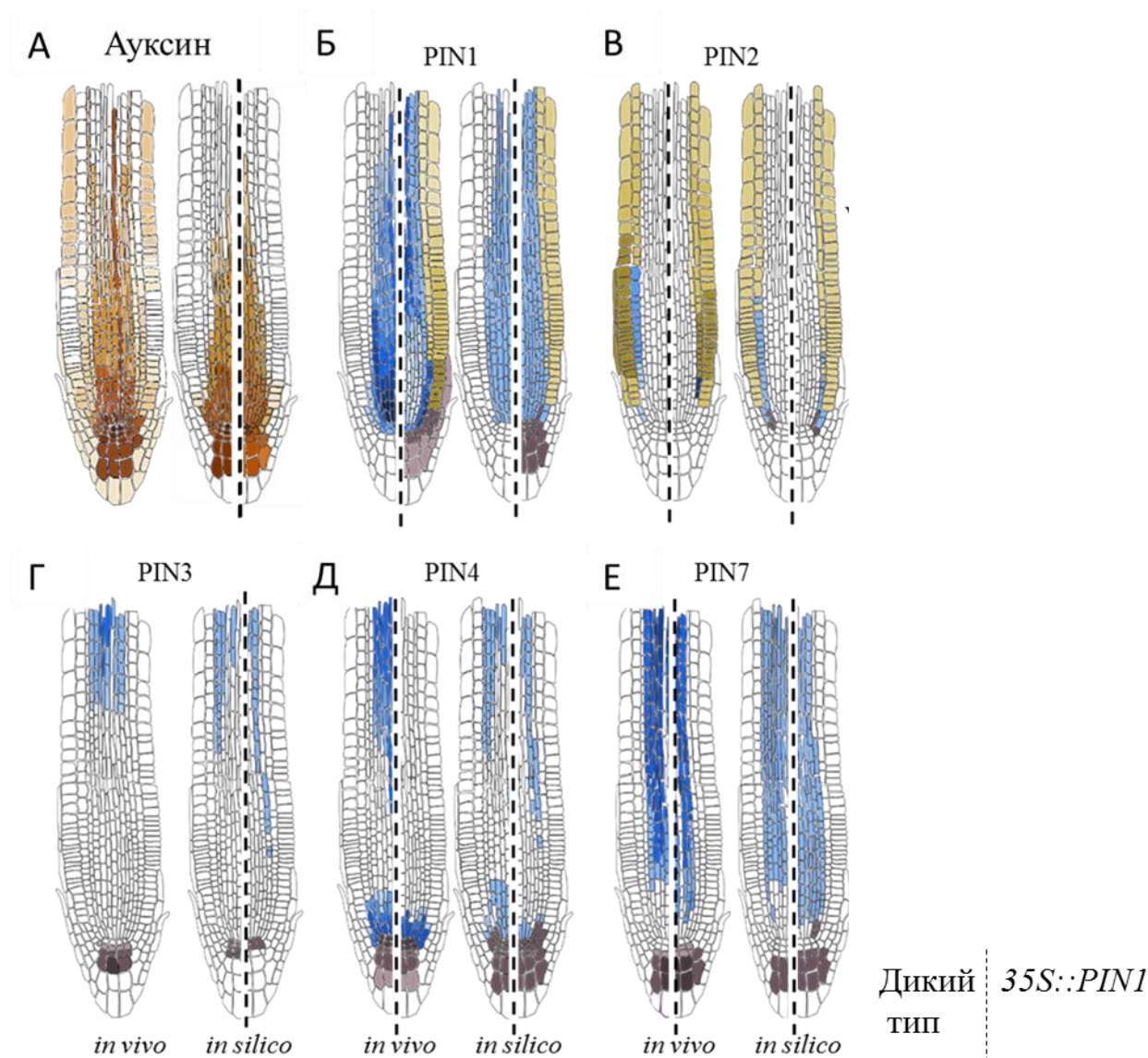


Рисунок 22. Паттерны распределения ауксина и экспрессии PIN белков на продольном срезе кончика корня дикого типа и в трансгенном растении *35S::PIN1 A. thaliana* в *in vivo/in silico* экспериментах. Результаты моделирования преобразованы из прямоугольного массива в макет корня *Arabidopsis*.

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. Шкала - 50 мкм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной диссертационной работе методами системной биологии был проведён анализ особенностей экспрессии транспортеров ауксина семейства PIN в корне *A. thaliana* и определена роль ауксина в этом процессе. Ранее, экспрессия PIN транспортеров была описана в основном с использованием репортерных линий PIN::PIN-GFP либо в экспериментах по иммунолокализации PIN [37], [96]. Однако имеющиеся данные не были достаточно детализированы и используемые методики не позволяли составить точную карту их экспрессии. Компьютерный анализ изображений по одновременному мечению сразу двух PIN белков в разных комбинациях позволил, более точно описать паттерны экспрессии PIN белков в корне и определить области перекрывания их доменов. Выявлены некоторые особенности экспрессии PIN и их полярной локализации, которые были отмечены впервые (Рис. 5 – 8). Например, определена вариабельность доменов экспрессии для каждого PIN (Таблица 1).

Экспериментальные данные о том, что ауксин дозозависимо влияет на экспрессию PIN транспортеров впервые были получены в 2005 году группой Виетен [96]. Однако количественные данные были получены только для транскрипционной регуляции, тогда как регуляция разными концентрациями ауксина активности PIN белков имела только качественное описание. Кроме того, не было проведено сравнение эффективных концентраций ауксина для разных PIN. В настоящей диссертационной работе кривые дозозависимой регуляции для белков PIN1-PIN4, PIN7 были предложены на основе сопоставления паттернов их экспрессии с распределением ауксина (Рис. 12В). Так, мы предположили, что при низких концентрациях ауксин активирует экспрессию PIN2, при промежуточных – PIN1, а экспрессию PIN3, PIN4, PIN7 как при низких, так и при высоких концентрациях. Кроме того, мы предполагаем, полярная локализация этих белков в клетке также регулируется ауксином дозозависимо (Рис. 12Г). А именно, при низких концентрациях

ауксина PIN белки локализируются на верхней стороне клеток, при промежуточных – на нижней стороне, а при высоких – PIN белки локализируются на всех сторонах клетки.

Непротиворечивость этой гипотезы была проверена двумя независимыми путями: во-первых, в экспериментах по изменению уровня ауксина, во-вторых, в математической модели, основанной на выдвинутых выше предположениях.

Для экспериментальной проверки был проведен количественный анализ изменения интенсивности свечения PIN в конфокальных изображениях кончиков корней в растениях *A. thaliana* после 24 часовой обработки разными концентрациями экзогенного ауксина и в трансгенных растениях *uic1-D*.

Проведенное исследование по обработке проростков экзогенным ауксином показало, что обратная связь в регулировании экспрессии PIN транспортеров ауксином является дозозависимой, причем максимальное повышение экспрессии разных PIN наблюдалось в разных диапазонах концентрации этого гормона. Наибольшее значимое изменение (p -value <0.05 , U-критерий) уровня экспрессии PIN1 происходило при 0,1 μ M, для PIN2 - 0,01 и 0,1 μ M, для PIN3 - 0,01 и 0,5 μ M, PIN4 - 0,1 и 0,5 μ M и PIN7 - 0,05 и 0,5 μ M НУК. Также высокие концентрации ауксина (0,5 μ M НУК) повышали экспрессию PIN3 и PIN7, но в меньшей степени чем низкие концентрации 0,01 μ M и 0,05 μ M, соответственно.

В растениях *uic1-D*, у которых повышенный эндогенный уровень ауксина, мы наблюдали значительное снижение уровня экспрессии PIN2, для остальных PIN изменения не были выявлены.

Сложность регуляции концентрации ауксина в клетках, обусловленная дозозависимой регуляцией ауксином экспрессии PIN-транспортеров и их функцией по выводу этого вещества из клетки делают достаточно сложным экспериментальное исследование всех аспектов работы данной генной сети. Системно-биологический подход показал свою успешность для решения подобных задач и был уже использован для изучения этой проблемы. Тем не менее, существующие в настоящее время математические модели PIN-

опосредованного формирования распределения ауксина, не включают динамику образования паттерна PIN белков. Например, все описанные ранее модели либо изначально задают паттерн их распределения [12], [48], либо фиксируют полярную локализацию присущую какому-либо PIN [57], [68], [69].

Нами была разработана математическая модель для описания ауксин-зависимой экспрессии PIN белков и их полярной локализации. Математическая модель, основанная на предложенной гипотезе, генерировала из изначально равномерного распределения ауксина и PIN белков, распределения аналогичные экспериментальным данным.

В разработанной математической модели исследовалось распределение ауксина в линии *35S::PIN1*. В результате расчетов модели для этой линии растений был предсказан сниженный уровень ауксина, который повлиял на все исследуемые PIN. Например, PIN2 начиная с транзитной зоны эктопически экспрессировался в эндодермисе. Напротив, домен экспрессии PIN4 значительно редуцировался в сосудистой системе. Эти предсказания были подтверждены экспериментально

Кроме того, мы определили, что полярная локализация PIN определяется не типом экспрессируемого белка, а возможно, изменяется в зависимости от концентрации ауксина. Хорошей иллюстрацией для этого стал белок PIN1 в *35S::PIN1*, который показывал все 3 типа полярной локализации в зависимости от концентрации ауксина в тканях. В эпидермисе он локализовался на верхней стороне, в колумелле на всех сторонах, а в остальных тканях – на нижней стороне.

Проведенное исследование позволило определить дозозависимые кривые всех PIN при разных уровнях ауксина, а также показать, что эти уровни могут независимо от типа экспрессируемого белка определять их полярную локализацию. Эти различия в чувствительности к ауксину важны для поддержания его распределения, что в свою очередь обеспечивает поддержание ниши стволовых клеток в корне. Используя данную математическую модель, мы можем предсказать как изменится распределение ауксина, а значит и

морфология корня при действии разных факторов и в мутантах по ауксиновому пути.

ВЫВОДЫ

1. На основе компьютерного анализа конфокальных изображений составлены карты паттернов экспрессии белков-транспортёров 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 математической модели.
 - В экспериментах по обработке в течении 24 часов разными концентрациями НУК растений дикого типа мы наблюдали значимое повышение экспрессии PIN1 при 0.1 μM , PIN2 при 0.01 μM и 0.1 μM , PIN3 при 0.01 μM , PIN4 при 0.1 μM и 0.5 μM , PIN7 при 0.05 μM , 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бандман О. Л. Дискретное моделирование физико-химических процессов // Прикладная дискретная математика. – 2009. – №. 3 (5). – С.33-49.
2. Бандман О. Л. Метод построения клеточно-автоматных моделей процессов формирования устойчивых структур // Прикладная дискретная математика. – 2010. – №. 4 (10) – С.91-99.
3. Васильев А. Е. и др. Ботаника. Морфология и анатомия растений. – 1988.
4. Коврижных В.В., Омелянчук Н.А., Пастернак Т.П., Миронова В.В.. Ключевая роль PIN белков в транспорте ауксина в корне *Arabidopsis thaliana* L. // Вавиловский журнал генетики и селекции растений. - 2014 - Т. 18, № 4/1
5. Колчанов Н.А., О.В. Вишневецкий, Д.П. Фурман. Введение в информационную биологию и биоинформатику // Новосибирский государственный университет. – 2012, Т. 4
6. Медведев С. С. Физиология растений. – БХВ-Петербург, 2013.
7. Пожванов Г.А., Медведев С.С. Метод количественной оценки содержания ауксина по гистохимическому окрашиванию на активность GUS под контролем ауксин-чувствительного промотора // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. – №. 5. – С. 786-792.
8. Полевой В.В, // Фитогормоны, Л., 1982, с. 81-124, 217-23.
9. Цыганкова В.Г., Галкина Л. А., Мусатенко Л. И., Сытник К. М. Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Молекулярно-генетический контроль проведения и реализации сигналов ауксинов // *Biopolymers and cell*. -2005. Т. 21. № 3. -С. 187-219.
10. Abas L. et al. Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism // *Nature cell biology*. – 2006. – Т. 8. – №. 3. – С. 249-256.
11. Ballesteros I, Domínguez T, Sauer M et al. Specialised functions of the PP2A subfamily II catalytic subunits PP2A-C3 and PP2A-C4 in the distribution of auxin fluxes and development in *Arabidopsis*.// *Plant J*. – 2012 – Т. 73- №. 5. – С. 862-72.

12. Band, L. R., Wells, D. M., Fozard, J. et al. Systems analysis of auxin transport in the *Arabidopsis* root apex // *The Plant Cell*. 2014. V. 26. N. 3. P. 862–75
13. Barbez E. et al. A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants // *Nature*. – 2012. – T. 485. – №. 7396. – C. 119-122.
14. Benfey, P. N., Schiefelbein, J. W. Getting to the root of plant development: the genetics of *Arabidopsis* root formation // *Trends in Genetics*. 1994. V. 10. N. 3. P. 84–88.
15. Benjamins R, Ampudia CS, Hooykaas PJ, Offringa R. PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins.// *Plant physiology*. – 2003. – T. 132. – №. 3. – C. 1623-30.
16. Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, et al. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*. 2003; 115(5): 591-602
17. Benkova E. et al. A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? // *Trends in plant science*. – 2009. – T. 14. – №. 4. – C. 189-193.
18. Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., et al. *Arabidopsis* AUX1 Gene: A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism // *Science*. 1996. V. 273. P. 948–950.
19. Bishopp A, Help H, El-Showk S, Weijers D, Scheres B, Friml J, et al. A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology*. 2011; 21(11): 917-26.
20. Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, et al. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*. 2005; 433(7021): 39-44.
21. Boer D. R. et al. Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors // *Cell*. – 2014. – T. 156. – №. 3. – C. 577-89.
22. Brunoud, G., Wells, D. M., Oliva, M., et al. A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution // *Nature*. 2012. V. 482. P. 103–6.

23. Calderon-Villalobos L. I. et al. Auxin perception—structural insights //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2010. – T. 2. – №. 7. – C. a005546.
24. Campanoni P and Nick P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways.// Plant Physiology. – 2005. – T. 137. – №. 3. – C. 939-948.
25. Collins T.J. ImageJ for microscopy // Biotechniques. - 2007. - Vol. 43. Suppl. 1. - P. 25-30.
26. Cormack R. G. H. A comparative study of developing epidermal cells in white mustard and tomato roots //American Journal of Botany. – 1947. – C. 310-14.
27. Cormack R. G. H. The development of root hairs in angiosperms //The Botanical Review. – 1949. – T. 15. – №. 9. – C. 583-612.
28. Dai M, Zhang C, Kania U et al. A PP6-type phosphatase holoenzyme directly regulates PIN phosphorylation and auxin efflux in Arabidopsis.// The Plant Cell Online. – 2012. – T. 24. – №. 6. – C. 2497-14.
29. Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. // Nature. - 2005. - V. 435. - N. 7041. - P. 441-45.
30. Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C. S., et al. Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling // Development. 2010. V. 137. N. 19. P. 3245–55.
31. Dhonukshe P. PIN polarity regulation by AGC-3 kinases and ARF-GEF: a recurrent theme with context dependent modifications for plant development and response.//Plant signaling & behavior. – 2011. – T. 6. – №. 9. – C. 1333-37.
32. Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., et al. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root // Development. 1993. V. 119. N. 1. P. 71–84.
33. Doussan C., Pages L., Pierret A. Soil exploration and resource acquisition by plant roots: an architectural and modelling point of view // Agronomie. - 2003. - Vol. 23. - P. 419–31.
34. Federici F. et al. Integrated genetic and computation methods for in planta cytometry // Nature methods. – 2012. – T. 9. – №. 5. – C. 483-485.

35. Feraru E., Friml J. PIN polar targeting // *Plant Physiology*. – 2008. – T. 147. – №. 4. – C. 1553-59.
36. Feraru E. et al. PIN polarity maintenance by the cell wall in *Arabidopsis* // *Current Biology*. – 2011. – T. 21. – №. 4. – C. 338-43.
37. Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis* // *Cell*. - 2002a. - Vol. 108. - N. 5. - P. 661-73.
38. Friml J., Palme K. Polar auxin transport—old questions and new concepts? // *Auxin Molecular Biology*. – Springer Netherlands, 2002b. – C. 273-84.
39. Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis* // *Nature*. – 2002c. - Vol. 415. - N. 6873. - P. 806-9.
40. Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H. et al. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis* // *Nature*. - 2003. - Vol. 426. - N. 6963. - P. 147-53.
41. Friml J., Yang X., Michniewicz M., Weijers D., Quint A. et al. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux // *Science*. - 2004. - Vol. 306. - N. 5697. - P. 862-65.
42. Furutani M, Sakamoto N, Yoshida S et al. Polar-localized NPH3-like proteins regulate polarity and endocytosis of PIN-FORMED auxin efflux carriers.// *Development*. – 2011. – T. 138. – №. 10. – C. 2069-78.
43. Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, (1998) 282, 2226–30.
44. Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., et al. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking // *Nature*. 2001. V. 413. P. 425–28.
45. Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W. et al. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth // *Cell*. - 2003. - Vol. 112. - N. 2. - P. 219-30.

46. Geisler, M., Murphy, A. S. The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development // FEBS Letters. 2006. V. 580. N. 4. P. 1094–102.
47. Goldsmith M. H. M., Goldsmith T. H., Martin M. H. Mathematical analysis of the chemosmotic polar diffusion of auxin through plant tissues //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1981. – T. 78. – №. 2. – C. 976-980.
48. Grieneisen, V. A., Xu, J., Marée, A. F. M., et al. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth // Nature. 2007. V. 449. P. 1008–13
49. Guo X, Lu W, Ma Y, Qin Q, Hou S. The BIG gene is required for auxin-mediated organ growth in Arabidopsis// Planta. – 2013. – C. 1-13.
50. Hayashi K. The interaction and integration of auxin signaling components //Plant and Cell Physiology. – 2012. – T. 53. – №. 6. – C. 965-75.
51. Jiang K., Feldman J.L. Regulation of Root Apical Meristem Development // Annu. Rev Cell Dev Biol. - 2005. - Vol. 21. - P. 485–509.
52. Kepinski S., Leyser O. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor //Nature. – 2005. – T. 435. – №. 7041. – C. 446-51.
53. Kleine-Vehn, J., Wabnik, K., Martinière, A., et al. Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane // Molecular Systems Biology. 2011. V.7. P. 540.
54. Kramer E. M. How far can a molecule of weak acid travel in the apoplast or xylem? //Plant physiology. – 2006. – T. 141. – №. 4. – C. 1233-1236.
55. Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., et al. Protein family review The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters // Genome Biol. 2009. V. 10. N. 12. P. 249.
56. Lee J. Y. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of transcription factor expression in Arabidopsis roots //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – T. 103. – №. 15. – C. 6055-60.

57. Likhoshvai, V. A., Omelyanchuk, N. A., Mironova, V. V., et al. Mathematical model of auxin distribution in the plant root // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2007. V. 38. N. 6. P. 374–82
58. Liao C. Y. et al. Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response // *Nature methods*. – 2015. – T. 12. – №. 3. – C. 207-10.
59. Ljung, K., Bhalerao, R. P., Sandberg, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth // *The Plant Journal*. 2002. V. 28. N. 4. P. 465–74.
60. Ljung K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M. et al. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots // *Plant Cell*. - 2005. - Vol. 17. - N. 4. - P. 1090-104.
61. Ljung K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development // *Development*. – 2013. – T. 140. – №. 5. – C. 943-50.
62. Malamy J E, Benfey P N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 1997; 124(1): 33-44
63. Mancuso S. et al. Noninvasive and continuous recordings of auxin fluxes in intact root apex with a carbon nanotube-modified and self-referencing microelectrode // *Analytical biochemistry*. – 2005. – T. 341. – №. 2. – C. 344-51.
64. Mashiguchi K. et al. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – T. 108. – №. 45. – C. 18512-17.
65. McLamore E. S. et al. Non-invasive quantification of endogenous root auxin transport using an integrated flux microsensor technique // *The Plant Journal*. – 2010. – T. 63. – №. 6. – C. 1004-16.
66. Meinhardt H. Models of biological pattern formation // Lond:Academic Press, 1982.
67. Michniewicz M, Zago MK, Abas L et al. Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux.// *Cell*. – 2007. – T. 130. – №. 6. – C. 1044-56.

68. Mironova, V. V, Omelyanchuk, N. A., Yosiphon, G., et al. A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root // *BMC Systems Biology*. 2010. V. 4. N. 1. P. 98.
69. Mironova, V. V, Omelyanchuk, N. A., Novoselova, et al. Combined in silico/in vivo analysis of mechanisms providing for root apical meristem self-organization and maintenance // *Annals of Botany*. 2012. V. 110. N. 2. P. 349–60.
70. Mravec, J., Skupa, P., Bailly, A., et al. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter // *Nature*. 2009. V. 459. P. 1136–40.
71. Neumann J., Burks A. W. *Theory of self-reproducing automata*. – 1966.
72. Normanly J. Auxin metabolism // *Physiologia Plantarum*. – 1997. – T. 100. – №. 3. – C. 431-42.
73. Okada K., Ueda J., Komaki M.K., Bell C.J., Shimura Y. Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation // *Plant Cell*. - 1991. - Vol. 3. - N. 7. - P. 677-84.
74. Omelyanchuk N. A. et al. A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in Arabidopsis thaliana root // *BMC plant biology*. – 2016. – T. 16. – №. 1. – C. 1.
75. Ostin A., Kowalczyk M., Bhalerao R.P., Sandberg G. Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis // *Plant Physiology*. - 1998. - Vol. 118. - P. 285–96.
76. Pasternak T.P, Tietz O, Rapp K, Begheldo M, Nitschke R, Ruperti B, et al. An improved and universal protocol for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods*. 2015;11(1):50.
77. Parizot B., Laplaze L., Ricaud L., Boucheron-Dubuisson E., Bayle V. et al. Diarch symmetry of the vascular bundle in Arabidopsis root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation // *Plant Physiol*. - 2008. - Vol. 146. - N. 1. - P. 140-48.
78. Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., et al. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux // *Science* . 2006. V. 312. P. 914–18.

79. Petersson S. V. et al. An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis // *The Plant Cell*. – 2009. – T. 21. – №. 6. – C. 1659-68.
80. Pound M. P. et al. CellSeT: novel software to extract and analyze structured networks of plant cells from confocal images // *The Plant Cell*. – 2012. – T. 24. – №. 4. – C. 1353-1361.
81. Remington D. L. et al. Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families // *Plant physiology*. – 2004. – T. 135. – №. 3. – C. 1738-52.
82. Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., et al. An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the Arabidopsis Root // *Cell*. 1999. V. 99. N. 5. P. 463–72.
83. Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wisniewska J, Reinöhl V, Friml J, Benkova E. Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes & development*. 2006; 20(20): 2902-11.
84. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012; 9(7): 676-82.
85. Schmidt T, Pasternak T, Liu K, Blein T, Aubry-Hivet D, Dovzhenko A, et al. The iRoCS Toolbox—3D analysis of the plant root apical meristem at cellular resolution. *The Plant Journal*. 2014; 77(5): 806-14.
86. Sieberer T., Seifert G.J., Hauser M.T., Grisafi P., Fink G.R., Luschnig C. Post-transcriptional control of the Arabidopsis auxin efflux carrier EIR1 requires AXR1 // *Curr Biol*. - 2000. - Vol. 10. - N. 24. - P. 1595-98.
87. Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G. et al. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex // *Genes Dev*. - 2001. - Vol. 15. - N. 20. - P. 2648-53.
88. Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P. B., Friml, J. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development // *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. 2006. V. 63. N. 23. P. 2738–2754.

89. Teale W. D., Paponov I. A., Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2006. – T. 7. – №. 11. – C. 847-59.
90. Tejos R., Sauer M., Vanneste S., et al. Bipolar Plasma Membrane Distribution of Phosphoinositides and Their Requirement for Auxin-Mediated Cell Polarity and Patterning in Arabidopsis // *The Plant Cell*. 2014. V. 26. N. 5. P. 2114–2128.
91. Toffoli T., Margolus N. Programmable matter: concepts and realization // *Physica D: Nonlinear Phenomena*. – 1991. – T. 47. – №. 1. – C. 263-272.
92. Ulmasov T. et al. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements // *The Plant Cell*. – 1997. – T. 9. – №. 11. – C. 1963-71.
93. Utsuno K. et al. AGR, an Agravitropic locus of Arabidopsis thaliana, encodes a novel membrane-protein family member // *Plant and cell physiology*. – 1998. – T. 39. – №. 10. – C. 1111-18.
94. Van den Berg C. et al. Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem // *Nature*. – 1997. – T. 390. – №. 6657. – C. 287-89.
95. Vanneste S., Friml J. Auxin: a trigger for change in plant development // *Cell*. – 2009. - Vol. 136. - N. 6. - P. 1005-16.
96. Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., et al. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression // *Development*. 2005. V. 132. N. 20. P. 4521–31.
97. Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P. B., Friml, J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development // *Trends in Plant Science*. 2007. V. 12. N. 4. P. 160–68.
98. Vob U., Larrieu A., Wells D. M. From jellyfish to biosensors: the use of fluorescent proteins in plants // *International journal of developmental biology*. – 2013. – T. 57. – №. 6. – C. 525-533.
99. Wang B, Henrichs S, Geisler M. The AGC kinase, PINOID, blocks interactive ABCB/PIN auxin transport. // *Plant signaling & behavior*. – 2012. – T. 7. – №. 12. – C. 1.

100. Weijers D. et al. An Arabidopsis Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene //Development. – 2001. – T. 128. – №. 21. – C. 4289-99.
101. Wisniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., et al. Polar PIN localization directs auxin flow in plants // Science. 2006. V. 312. P. 883.
102. Wolpert L. Positional information and pattern formation in development // Dev Genet. - 1994. - Vol. 15. - P. 485-90.
103. Woodward A. W., Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction //Annals of botany. – 2005. – T. 95. – №. 5. – C. 707-35.
104. Xu J., Hofhuis H., Heidstra R., Sauer M., Friml J. et al. A molecular framework for plant regeneration // Science. - 2006. - Vol. 311. - N. 5759. - P. 385-388.
105. Yuan HM, Xu HH, Liu WC, Lu YT. Copper regulates primary root elongation through PIN1-mediated auxin redistribution. // Plant and Cell Physiology. – 2013. . – T. 74. – №. 1. – C. 37-47.
106. Zažímalová E. et al. Auxin transporters—why so many? //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2010. – T. 2. – №. 3. – C. a001552.
107. Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, et al. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. Science. 2001; 291:306–9.
108. Zuse K. Calculating space (rechnender raum). – Tech. rep., MIT, Cambridge, Mass., technical Translation AZT-70-164-GEMIT, 1970.