

На правах рукописи

ЛАВРЕХА ВИКТОРИЯ ВАДИМОВНА

**КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ
ФОРМИРОВАНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ СТРУКТУРЫ
АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA* L.**

Математическая биология, биоинформатика

03.01.09

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в секторе системной биологии морфогенеза растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Миронова Виктория Владимировна**
к.б.н., зав. сектором системной биологии морфогенеза растений ФГБУН «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Бажан Сергей Иванович**
д.б.н., доцент, заведующий теоретическим отделом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область

Третьякова Ираида Николаевна
д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ ФИЦ КНЦ Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

Защита диссертации состоится « » _____ 2018г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в конференц-зале Института по адресу:
пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090,
тел.: (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78;
e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте института www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан « » _____ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хлебодарова Т. М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Апикальная меристема корня (АМК), находящаяся на его кончике, содержит стволовые клетки и обеспечивает за счет них длительный рост корня. В силу геометрически правильной и простой структуры, меристема корня модельного растения *Arabidopsis thaliana* L. стала удобным объектом для исследования механизмов формирования и поддержания ниши стволовых клеток. Несмотря на множество экспериментальных исследований, все еще остаются вопросы о том, как происходит координация внутриклеточных, межклеточных и тканевых процессов в меристеме в условиях интенсивного роста и деления клеток. Исследование взаимодействия нескольких процессов, меняющихся во времени и в пространстве, требует привлечения математических моделей, которые позволяют описать динамику этой системы взаимосвязей и определить её ключевые факторы.

В меристеме корня можно выделить две группы делящихся клеток, кардинально отличающихся по своему поведению: стволовые клетки, включающие покоящийся центр и окружающие его инициали, делятся медленно, но потенциально бесконечное число раз; потомки стволовых клеток, или транзитно-амплифицирующиеся клетки, делятся гораздо быстрее, но лишь несколько раз (Dolan et al., 1993; Stahl, Simon, 2009). До настоящего времени изучению механизмов поддержания стволовых клеток в меристеме корня уделялось значительно больше внимания, чем механизмам поддержания пула их потомков. В то же время, для постоянства структуры меристемы, должен существовать баланс между появлением новых транзитно-амплифицирующихся клеток за счет деления стволовых клеток и дифференцировкой первых.

Известно, что гормоны растений – ауксин и цитокинин – контролируют пролиферацию клеток в меристемах и оказывают комплексное влияние на прохождение клеточного цикла в клетке, участвуя в регуляции G1/S и G2/M переходов. Однако пока не ясно, какие именно сигнальные пути обеспечивают

выход клетки из клеточного цикла и начало её дифференцировки на границах меристемы. Выяснение роли фитогормонов в регуляции пролиферации и перехода к дифференцировке клеток в меристеме является актуальной задачей биологии развития растений.

Цели и задачи работы

Целью настоящей работы является выявление роли фитогормонов ауксина и цитокинина в регуляции баланса между процессами пролиферации и дифференцировки клеток апикальной меристемы корня.

В соответствии с целью поставлены следующие задачи.

- 1) Разработка математических моделей формирования и поддержания структуры апикальной меристемы корня *A. thaliana*:
 - Разработка модели (1) минимального регуляторного контура, лежащего в основе механизма контроля клеточного цикла ауксином и цитокинином
 - Разработка математических моделей формирования распределения концентраций ауксина (2) и цитокинина (3) в апикальной меристеме корня
 - Объединение моделей (1;2;3) для исследования механизмов формирования и поддержания структуры апикальной меристемы корня вдоль центральной оси.
- 2) Планирование и экспертное сопровождение экспериментальной проверки предсказаний модели на *A. thaliana*.
- 3) Компьютерный анализ экспериментальных данных о распределении событий митоза и репликации ДНК в корне *A. thaliana*.

Научная новизна

Впервые предложен минимальный регуляторный контур, лежащий в основе механизма контроля клеточного цикла фитогормонами ауксином и цитокинином в меристеме корня *A. thaliana*: переход G1/S в меристеме разрешен при низких концентрациях ауксина, а высокие концентрации ауксина его ингибируют; переход G2/M разрешен при низких концентрациях цитокинина, а высокие концентрации цитокинина его ингибируют.

Для проверки непротиворечивости и достаточности этого механизма впервые создана математическая модель, объединяющая механизмы (1) регуляции клеточного цикла фитогормонами; (2) распределения ауксина; (3) распределения цитокинина. Модель была использована для исследования механизмов формирования и поддержания структуры апикальной меристемы корня *A. thaliana* вдоль центральной оси. В модели наблюдалось формирование и сохранение пула делящихся потомков стволовых клеток (пролиферационного домена) между максимумом концентрации ауксина с одной стороны и максимумом концентрации цитокинина с другой.

В результате численных расчетов модели сделаны предсказания о различиях в пролиферационной активности клеток разных тканей корня. Для проверки гипотез были спланированы новые эксперименты и проведен компьютерный анализ результатов экспериментов. В результате впервые получены трехмерные карты распределения событий митоза и репликации ДНК в кончике корней в диком типе *A. thaliana* и в растениях, мутантных по генам синтеза (*ipt3ipt5ipt7*) и передаче сигнала (*arr12-1*) цитокинина.

Статистический анализ трехмерных карт распределения ключевых событий клеточного цикла в меристеме корня позволил получить новые знания о структуре меристемы корня. Впервые предложен удобный метод определения границ пролиферационного и транзитного доменов меристемы корня *A. thaliana*.

Теоретическая и практическая ценность

Ауксин и цитокинин – основные регуляторы пролиферации клеток, которые широко используются на практике в культурах тканей растений. Подбор правильных концентраций и длительности обработки этими фитогормонами – необходимый этап перевода тканей растений в клеточные культуры. Как правило, этот этап происходит эмпирически. В данной работе на основе решения обратной задачи мы выявили концентрационно-зависимые механизмы регуляции клеточного цикла ауксином и цитокинином. Помимо несомненной значимости для фундаментальной науки, эти знания могут быть полезны и на практике, для подбора условий перевода тканей растений в культуру клеток. Созданная математическая модель может быть использована далее для исследования поведения ниши стволовых клеток растений в различных условиях.

Методы исследования

В диссертационной работе применялся системный подход, который включает методы математического моделирования и экспериментальную верификацию предсказаний модели. На первом этапе была решена обратная задача – на основе анализа экспериментальных данных был предложен минимальный регуляторный контур контроля клеточного цикла фитогормонами. Достаточность и непротиворечивость этого регуляторного контура изучалась методами математического моделирования. За основу была взята математическая модель формирования градиента ауксина по механизму отраженной волны, разработанная Викторией Владимировной Мироновой под руководством В.А. Лихошвая (ИЦиГ СО РАН) в пакете Mathematica©. Модель была изменена в части синтеза и транспорта ауксина. Фактор деления, используемый для реализации делений клеток, был заменен на гормон цитокинин, и предложенный регуляторный контур интегрирован в модель.

Для проверки предсказаний модели были разработаны схемы экспериментов по исследованию пролиферационной активности в корне

(условия и последовательность действий, отбор экспериментального материала). Были использованы современные методы окрашивания ДНК и конфокальной микроскопии (Pasternak et.al., 2015). Количественный анализ трехмерных изображений (3D) кончиков корней с визуализацией ядер клеток, полученных с помощью этих методов, был проведен мною в программе iRoCs Toolbox (Schmidt et.al., 2014). Полученные данные позволили составить трехмерную карту распределения клеток в фазах митоза и репликации ДНК в корнях растений дикого типа, а также в мутантных растениях *ipt3ipt5ipt7* и *arr12-1*.

Статистическая достоверность различий значений расстояний до последних событий митоза и репликации ДНК по разным тканям корня определялась по критерию Уэлча, с поправкой на множественное сравнение по Бонферрони.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Фитогормоны ауксин и цитокинин регулируют размеры пролиферационного домена апикальной меристемы корня через концентрационно-зависимый контроль выхода из митотического цикла: G1/S переход ингибируется высокими концентрациями ауксина, а G2/M переход – высокими концентрациями цитокинина.
- 2) Клетки разных тканей меристемы корня *A. thaliana* прекращают делиться на разном расстоянии от покоящегося центра, очередность перехода к специализации разных тканей строго соблюдается. Первыми заканчивают делиться клетки протофлоэмы, а последними – клетки прокамбия.

Апробация работы

Материалы настоящей работы вошли в отчеты по грантам Российского научного фонда и Российского фонда фундаментальных исследований. Основные результаты работы были представлены на научных конференциях и

школах молодых ученых в виде устных и стендовых докладов: Международные конференции по биоинформатике, структуре и регуляции генома (BGRS\SB'2014, BGRS\SB'2016, г. Новосибирск, Россия), Международная московская конференция по компьютерной молекулярной биологии (MCCMB'15, Москва, Россия), Международная конференция по системной биологии (ICSB'16, Барселона, Испания), V международная школа для молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология» (2016, г. Санкт-Петербург, Россия), XXV международная конференция Математика Компьютер Образование (МКО'18, Дубна, Россия).

Внедрение

Материалы, изложенные в диссертации, используются в учебной работе в курсе лекций «Математические основы системной биологии: моделирование молекулярно-генетических систем» в рамках учебного плана кафедры информационной биологии факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Личный вклад автора

Основные результаты, изложенные в диссертации, получены и проанализированы автором лично. Эксперименты на *A. thaliana* проводились Тарасом Петровичем Пастернаком в университете Фрайбурга (Германия).

Структура работы

Работа состоит из введения, обзора литературы, двух глав результатов работы, заключения, выводов, списка литературы (127 наименований), а также списка используемых в работе сокращений. Материал изложен на 137 страницах, содержит 51 рисунок и 9 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Первая глава диссертации представляет собой обзор литературы. В разделе 1.1. дано определение ствольных клеток, описаны их функции и важность для развития растений. В следующем разделе описана структура апикальной меристемы корня. В разделе 1.3 дается обзор данных по регуляции клеточного цикла в растениях и экспериментальные методики изучения клеточного цикла. Более подробно рассмотрена роль ауксина и цитокинина в развитии растения и, в частности, в формировании структуры меристемы корня в разделе 1.3.3. Следующие два раздела посвящены описанию биосинтеза, транспорта и путей передачи сигнала ауксина и цитокинина – процессов, обеспечивающих формирование неравномерных распределений фитогормонов в корне. В разделе 1.6 показаны примеры взаимодействия путей передачи сигналов ауксина и цитокина, в том числе, и при формировании меристемы. Следующий раздел подчеркивает необходимость применения методов математического моделирования для исследования клеточных процессов в динамике и пространстве, с примерами моделей клеточного цикла в зависимости от концентрации сигнальных веществ. В заключении по обзору литературы формулируются задачи исследования, для решения которых используются методы математического моделирования (глава 2), с последующим планированием экспериментов по проверке предсказаний модели и компьютерным анализом данных этих экспериментов (глава 3).

Глава 2. Математическое моделирование формирования и поддержания структуры АМК

На первом этапе (раздел 2.1) была предложена логическая модель минимального контура регуляции клеточного цикла в корне. Мы рассмотрели упрощенную схему клеточного цикла, состоящего из двух фаз G1 и G2 и двух контрольных точек G1/S и G2/M (рис. 1). В качестве входных данных были взяты распределения концентраций ауксина и цитокинина в трех зонах кончика корня, соответствующих колумелле, пролиферационному и

транзитному домену. В качестве выходных данных мы использовали опубликованные данные о вероятностях переходов G1/S и G2/M в кончике корня, описанные в главе 1. Для уменьшения комбинаторной сложности в решении обратной задачи рассматривались только 2 варианта усредненных концентраций ауксина и цитокинина в трех зонах: пониженные и повышенные, и было допущено, что каждый из переходов регулируется только одним гормоном. Единственным вариантом, отвечающий всем опубликованным ранее экспериментальным данным с учетом допущений, оказался контур, в котором низкие концентрации ауксина разрешают G1/S переход, а низкие концентрации цитокинина разрешают переход G2/M (рис. 1). Для проверки достаточности и непротиворечивости этой гипотезы были использованы методы математического моделирования.

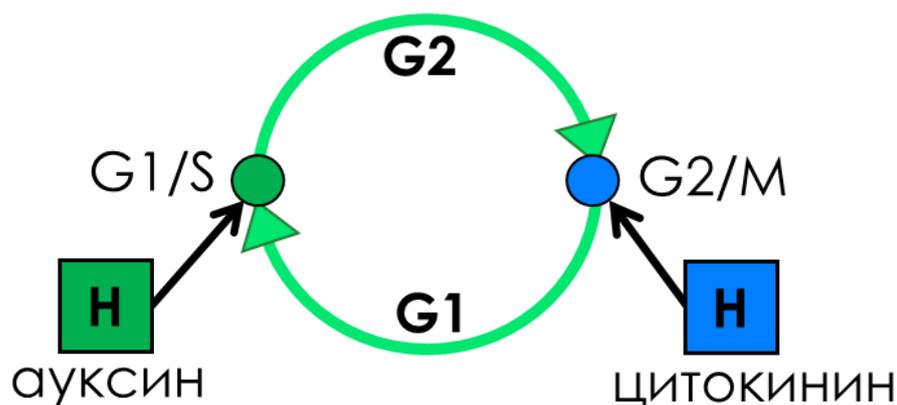


Рисунок 1. Минимальный регуляторный контур управления клеточного цикла ауксином и цитокинином в меристеме корня. G1, S, G2, M – фазы клеточного цикла. Контроль прохождения клеточного цикла осуществляется на переходах G1/S и G2/M. Н – низкие концентрации гормонов в клетке.

В разделе 2.2. описана модель самоорганизации распределения ауксина и цитокинина вдоль продольной оси корня, являющаяся дальнейшим развитием работы Mironova et al. (2010), в которой максимум концентрации ауксина формировался и поддерживался в клетке, соответствующей покоящемуся центру. Модель из работы Mironova et al. (2010) была изменена в части функции синтеза ауксина и правил экспрессии его белка транспортера PIN1, а также был введен гормон цитокинин вместо «фактора деления».

Впервые создана математическая модель формирования распределения цитокинина в корне.

В настоящей модели рассматривается ансамбль клеток вдоль центральной оси корня (рис. 2А), в котором сигнальные вещества ауксин и цитокинин и белок-транспортер ауксина PIN1 распределены неравномерно (рис. 2Б-Г). Количество клеток в ансамбле N может увеличиваться за счет деления клеток в процессе численного расчета. Клетка с номером i в качестве параметров имеет радиус клетки r_i , координаты центра x_i , фазу клеточного цикла G_i , концентрации активных веществ a_i (ауксин), $PIN1_i$ (PIN1 белок) и c_i (цитокинин).

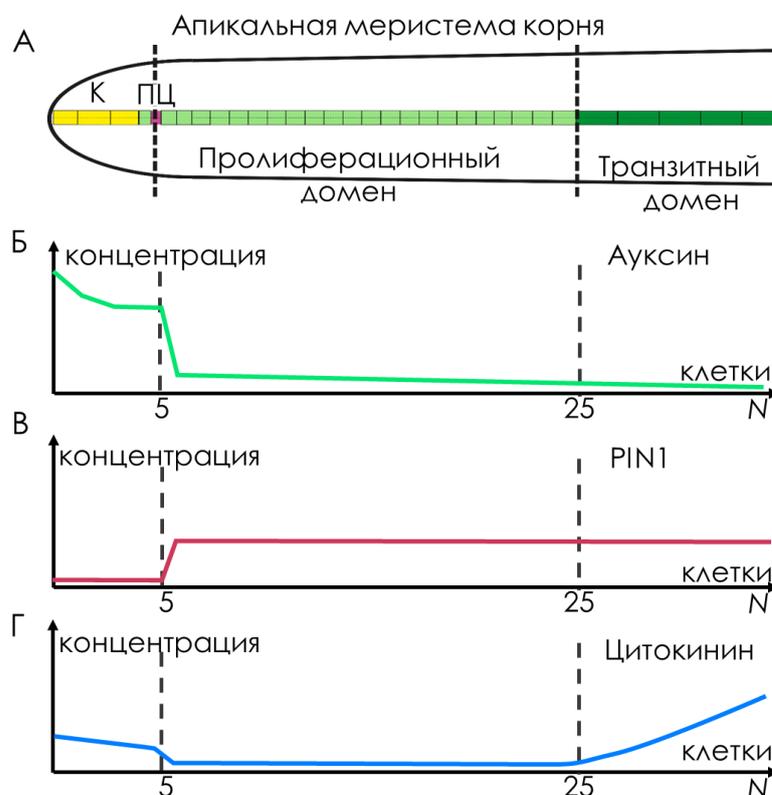


Рисунок 2. А. Клеточный ансамбль, рассмотренный в модели (на рисунке слева направо): К (колумелла), покоящийся центр (ПЦ), пролиферационный домен, и транзитный домен. Б. Профиль распределения ауксина в корне, реконструированный по активности ауксин-чувствительного репортера DR5 (Sabatini et al., 1999). В. Паттерн экспрессии PIN1 вдоль продольной оси корня в меристеме. Г. Профиль распределения цитокинина в корне, реконструированный по активности цитокинин-чувствительного репортера TCS (Zürcher et al., 2013).

Ауксин. Изменение концентрации ауксина описано процессами пассивного и активного транспорта, синтеза и деградации. Ауксин поступает

из побега через сосудистую систему корня в клетку N с интенсивностью $\alpha(t)$, которая растет линейно по времени t : $\alpha(t) = \alpha_0 + kt$, где α_0 – базальный уровень интенсивности потока ауксина, поступающего в N -ю клетку, k – константа прироста интенсивности потока ауксина по времени. Пассивный транспорт ауксина между соседними клетками описан согласно закону Фика с коэффициентом D_a . В модель введен независимый синтез ауксина σ_0 , необходимый для роста корня, что соответствует экспериментальным данным Bhalerao et al. (2002). Скорость деградации ауксина в клетке описана линейно с коэффициентом $K_{d,a}$. Ауксин активно переносится из клетки с номером i в клетку с номером $i-1$ со скоростью $f_t(PIN1_i)$, определяемой концентрацией PIN1 белка в клетке i : $f_t(PIN1_i) = K_{at,a} * PIN1_i$.

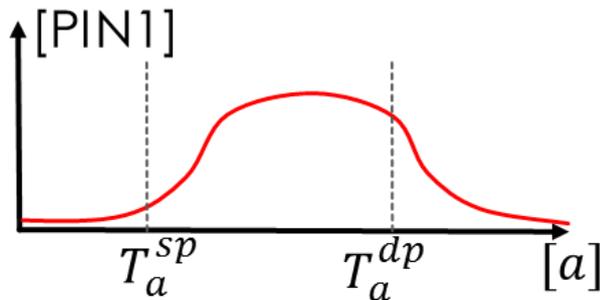


Рисунок 3. График зависимости концентрации PIN1 белка [PIN1] от концентрации ауксина [a] в клетке – функция $f_t(PIN1_i)$. T_a^{sp} , T_a^{dp} – пороговые концентрации ауксина для регуляции синтеза и деградации белка PIN1.

Цитокинин. В соответствии с экспериментальными данными в модели рассмотрено два источника цитокинина. Во-первых, его поток в клетку N с интенсивностью $\beta(t)$, который растет линейно по времени t : $\beta(t) = \beta_0 + lt$, где β_0 – базальный уровень интенсивности потока цитокинина, поступающего в N -ю клетку, l – константа прироста интенсивности потока цитокинина. Во-вторых, регулируемый синтез цитокинина определен кусочно-линейной функцией $f_{s,c}(a_i)$ с коэффициентом $K_{s,c}$: $f_{s,c}(a_i) = \begin{cases} 1, & \text{if } a_i > T_a^{sc} \\ 0.01, & \text{else} \end{cases}$, где T_a^{sc} – пороговая концентрация ауксина. Скорость деградации цитокинина в клетке описана линейно с коэффициентом $K_{d,c}$. Цитокинин перераспределяется между клетками только за счет пассивного транспорта (коэффициент D_c).

В разделе 2.3 в математических терминах описан предложенный минимальный регуляторный контур (рис. 1). В модели время нахождения клетки в фазах G1 и G2 – τ определяется в соответствии с функциями распределения вероятностей прохождения контрольных точек $P_{G1/S}(\tau)$ и $P_{G2/M}(\tau)$, которые, в свою очередь, зависят соответственно от $\rho_{g1/s}(a_i)$ и $\rho_{g2/m}(c_i)$. Функции плотности вероятности $\rho_{g1/s}(a_i)$ и $\rho_{g2/m}(c_i)$ описаны формулами:

$$\rho_{g1/s}(a_i) = \begin{cases} 1, & \text{if } a_i < T_a^{G1/S} \\ 0, & \text{else} \end{cases}, \quad \rho_{g2/m}(c_i) = \begin{cases} 1 - c_i/T_c^{G2/M}, & \text{if } c_i < T_c^{G2/M} \\ 0.0001, & \text{else} \end{cases},$$

где a_i и c_i – концентрации ауксина и цитокинина в клетке i соответственно; $T_a^{G1/S}$ – пороговое значение концентрации ауксина для перехода G1/S; $T_c^{G2/M}$ – пороговое значение концентрации цитокинина для перехода G2/M.

В разделе 2.4 представлена реализация модели в пакете Plenum для системы Mathematica® (Yosiphon, Mjolsness, 2007). Параметры модели были подобраны так, чтобы распределения концентраций гормонов соответствовали опубликованным данным. В результате численных расчетов модели формировалось распределение клеток по фазам клеточного цикла в различных зонах кончика корня, которое доказывает достаточность и непротиворечивость предложенного регуляторного контура (рис. 4).

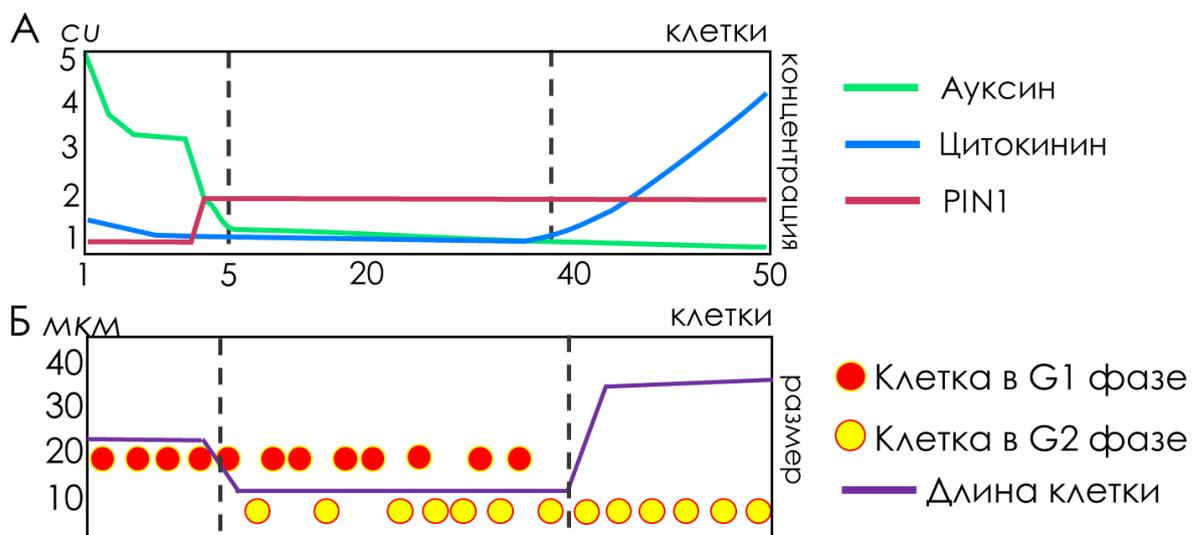


Рисунок 4. Численные результаты моделирования роста и деления клеток в одномерном ансамбле клеток. А. Распределение концентраций фитогормонов в расчете модели с динамическим числом клеток от $N=15$ до $N=50$. Б. Результат динамического распределения клеток по фазам и размерам. Пунктирными линиями обозначены границы пролиферационного домена.

В разделе 2.5 проведен анализ поведения модели при варьировании параметров потоков ауксина, цитокинина и клеточного цикла. Описаны сценарии изменения размеров пролиферационного домена, которым могут соответствовать реальные изменения пролиферационной активности в корне в различных тканях.

В последнем разделе главы на основе анализа варьирования параметров формулируются предсказания, их проверка приведена в главе 3.

Глава 3. Компьютерный анализ распределения митозов в корне

В разделах 3.1 – 3.2 диссертации приводится описание предложенной схемы экспериментов для проверки предсказаний модели и использованного в данной работе метода компьютерного анализа изображений. Верификация предсказаний модели описана в разделе 3.3. Раздел 3.4 содержит описание полученных результатов о пролиферационной активности, полученных в процессе верификации предсказаний модели.

Модель предсказывает, что увеличение потока ауксина со стороны побега должно привести к сокращению размера домена событий репликации ДНК (переход G1/S в модели регулируется низкой концентрацией ауксина рис. 1). Так как ранее было показано, что различия в концентрации ауксина наблюдаются в метаксилеме и протоксилеме по сравнению с прокамбием (Bishop et al., 2011) и сосудами флоэмы (рис. 5А), мы провели детальную аннотацию этих тканей. Было посчитано расстояние от ПЦ до последней клетки в S-фазе в каждой из тканей сосудистой системы в выборке корней (рис. 5Б).

Обнаружено, что действительно, в протофлоэме первой заканчиваются события репликации ДНК, затем они прекращаются в протоксилеме, следом в метаксилеме. Самые дальние от ПЦ события репликации ДНК наблюдаются в прокамбии. Экспериментально найденные различия в длине зон событий репликации ДНК у арабидопсиса показаны нами впервые.

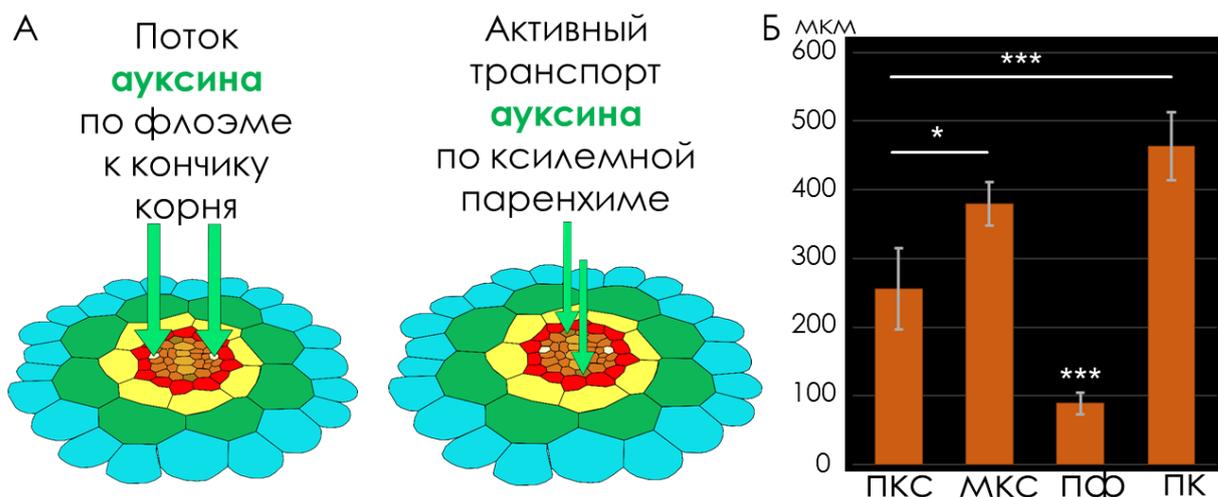


Рисунок 5. Сокращение размера домена событий репликации ДНК при увеличенном потоке ауксина из побега на примере клеток сосудистой ткани – подтверждение первого предсказания модели. А. Потоки ауксина в сосудистой ткани, согласно опубликованным ранее данным. Б. Расстояние до последнего события репликации ДНК в сосудистой ткани в мкм. По вертикали отложено расстояние от ПЦ до последнего события репликации ДНК в каждой ткани в мкм. По горизонтали: «пкс» – протоксилема; «мкс» – метаксилема; «пф» – протофлоэма; «пк» – прокамбий. На гистограмме обозначены доверительные интервалы с 95% достоверностью. $n=10$. Статистические различия определены согласно Уэлч t -тесту, * $p<0.05$, * $p<0.001$, с поправкой Бонферрони на множественные сравнения.**

Цитокинин от побега к корню течет по флоэме вместе с питательными веществами и синтезируется на протоксилемных полюсах и в метаксилеме (Bishopp et al., 2011) (рис. 6А). То есть во флоэмных и ксилемных пучках и в метаксилеме должен наблюдаться повышенный уровень цитокинина по сравнению с прокамбием, а значит, согласно нашей модели, в этих пучках зоны митозов должны быть короче, чем в прокамбии (рис. 1). Это подтвердил наш анализ экспериментальных данных, в котором мы посчитали расстояние от ПЦ до самого дальнего митоза в протофлоэме, протоксилеме, метаксилеме и прокамбии (рис. 6Б).

Мы показали, что протофлоэма заканчивает пролиферационную активность уже после нескольких делений. Протоксилема и метаксилема поддерживают свою пролиферативную активность немного дольше, но всё же меньше, чем это делают клетки эпидермиса и кортекса. В свою очередь, события митоза в прокамбии наблюдаются на самом дальнем расстоянии от

ПЦ среди всех тканей. Эти экспериментальные данные подтверждают второе предсказание модели. Экспериментально найденные различия в длине зон событий митоза у арабидопсиса показаны нами впервые.

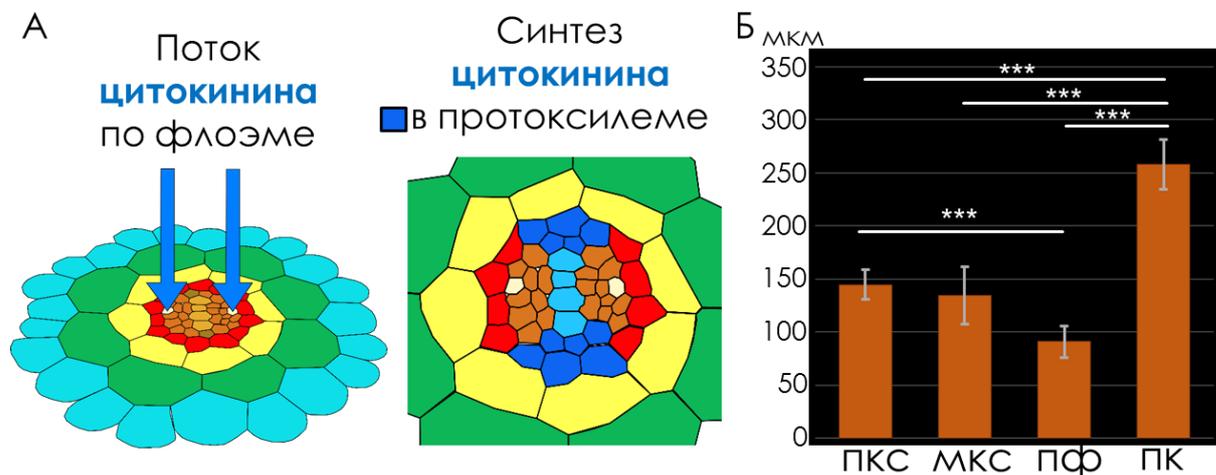


Рисунок 6. Сокращение размеров домена событий митоза при увеличенном потоке цитокинина из побега на примере сосудистой ткани – подтверждение второго предсказания модели. А. Поток цитокинина по флоэме и его синтез в сосудистой ткани, согласно опубликованным ранее данным. Б. Длины доменов митозов в сосудистой ткани. По вертикали отложено расстояние от ПЦ до последнего митоза в каждой ткани в мкм. По горизонтали: «пкс» – протоксилема; «мкс» – метаксилема; «пф» – протофлоэма; «пк» – прокамбий. На гистограмме обозначены доверительные интервалы с 95% достоверностью. $n=10$. Статистические различия определены согласно Уэлч t -тесту, $* p < 0.001$, с поправкой Бонферрони на множественные сравнения.**

Модель предсказала, что снижение концентрации цитокинина, вызванное снижением его синтеза ($K_{s,c}$), приведет к увеличению длины доменов пролиферации в сторону побега во всех тканях корня. Аналогичное увеличение длины домена пролиферации согласно нашей модели может быть вызвано понижением чувствительности клеток к цитокинину ($T_c^{G2/M}$). Результаты анализа распределения митозов в корнях мутантных растений *ipt3ipt5ipt7* и *arr12-1* по сравнению с корнями дикого типа показали значимое увеличение длины домена пролиферации в сторону побега (рис. 7), чем подтвердили третье предсказание модели.

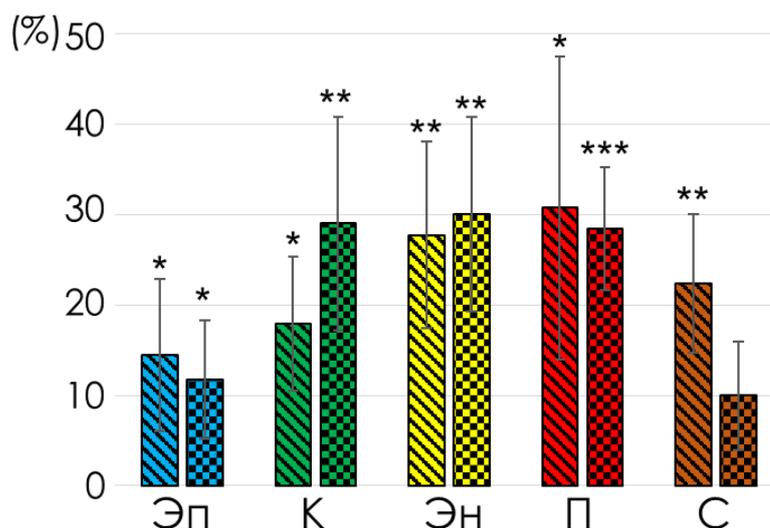


Рисунок 7. Верификация третьего предсказания модели. Увеличение расстояния до последнего митоза в разных тканях кончика корня в мутантах *ipt3ipt5ipt7* (косая штриховка) и *arr12-1* (штриховка в квадрат) относительно контроля в (%). По горизонтали представлены ткани корня: «Эп» – эпидермис; «К» – кортекс; «Эн» – эндодермис; «П» – перицикл; «С» – сосудистая ткань. Статистические различия определены согласно Уэлч *t*-тесту, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

В разделе 3.4 мы суммировали наши данные том, что ткани меристемы имеют различную симметрию пролиферационной активности. Сосудистая ткань имеет диархную симметрию, перицикл и эндодермис – билатеральную, кортекс и эпидермис – радиальную.

ВЫВОДЫ

- 1) Предложена логическая модель минимального регуляторного контура, контролирующего клеточный цикл в меристеме корня *A. thaliana*, согласно которой переход G1/S разрешен при низких концентрациях ауксина, G2/M – при низких концентрациях цитокинина, высокие концентрации ауксина и цитокинина ингибируют G1/S и G2/M переходы, соответственно.
- 2) С помощью методов математического моделирования доказана достаточность и непротиворечивость минимального регуляторного контура. В расчетах модели пролиферационный домен формировался между максимумом концентрации ауксина в покоящемся центре и максимумом концентрации цитокинина в транзитном домене меристемы; домен сохранял это расположение, несмотря на рост и деления клеток.

- 3) Создана трехмерная реконструкция распределения ядер клеток, находящихся в фазах репликации ДНК и митоза в кончиках корней пятидневных проростков *Arabidopsis thaliana* в диком типе и в мутантах *ipt3ipt5ipt7*, *arr12*.
- 4) В результате численного анализа математической модели предсказано, что неравномерное распределение ауксина на верхней границе меристемы, ранее показанное в экспериментах, должно приводить к различиям в распределении событий репликации ДНК. Предсказание подтверждено экспериментально на тканях сосудистой системы корня.
- 5) В результате численного анализа математической модели предсказано, что неравномерное распределение цитокинина на верхней границе меристемы, которое было показано в экспериментах ранее, должно приводить к различиям в распределении митозов в разных тканях корня. Предсказание было подтверждено экспериментальными фактами:
- эпидермис и кортекс заканчивают делиться гораздо раньше эндодермиса и тканей центрального цилиндра;
 - в центральном цилиндре быстрее всего теряют способность к пролиферации клетки протофлоэмы, а дольше всех сохраняют способность к делению клетки прокамбия;
 - клетки эндодермиса и перицикла кончиков корней, прилежащие к протоксилеме, сохраняют пролиферационную активность дольше клеток, прилежащих к протофлоэме.
- 6) Модель предсказала увеличение длины пролиферационного домена при снижении синтеза цитокинина или снижении чувствительности клеток к цитокинину. Предсказание подтверждено экспериментально при анализе кончиков корней мутантов по синтезу (*ipt3ipt5ipt7*) и передаче сигнала цитокинина (*arr12*) *A. thaliana*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

Статьи в журналах

1. **Лавреха В.В.**, Омелянчук Н.А., Миронова В.В. Математическая модель регуляции фитогормонами формирования меристематической зоны корня // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2014, том 18, №4/2, с. 963-972.
2. **Lavrekha V.V.**, Pasternak T., Ivanov V.B., Palme K., Mironova V.V. 3D analysis of mitosis distribution defines the longitudinal zonation and bilateral symmetry of the *Arabidopsis thaliana* root meristem // The Plant Journal, 2017, V. 92(5), P. 834–845.

Тезисы

1. **Lavrekha V.V.**, Mironova V.V., Omelyanchuk N.A. Modeling of cell dynamics in the root apical meristem with dynamical grammar // Proceedings of the Ninth International Conference of Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems biology, 2014, P. 97.
2. **Lavrekha V.V.**, Mironova V.V., Omelyanchuk N.A. Modeling of cell dynamics in the root apical meristem with dynamical grammar // Proceedings of the 6th International Young Scientists School Bioinformatics and System Biology, 2014, P. 35.
3. **Lavrekha V.V.**, Omelyanchuk N.A., Mironova V.V. Mathematical modeling of morphogenetic regulation of the meristem zone formation in the plant root// Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology, 2015, <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2015/proceedings/abstracts/14.pdf>.
4. **Lavrekha V.V.**, Pasternak T., Omelyanchuk N.A., Ivanov V.B., Mironova V.V. 3D map of proliferation activity in *Arabidopsis thaliana* root tips: transition domain boundaries and its bilateral symmetry//Proceedings of the Tenth International Conference of Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems biology, 2016, P.167.
5. **Lavrekha V.V.**, Pasternak T., Omelyanchuk N.A., Ivanov V.B., Mironova V.V. High resolution map of key cell cycle events in *Arabidopsis* root tips: radial, bilateral and longitudinal symmetry//International conference on system biology, 2016, Barcelona, Spain.
6. **Lavrekha V.V.**, Pasternak T., Mironova V.V. 3D map of proliferation activity in *Arabidopsis thaliana* root tips: radial, bilateral and longitudinal symmetries//Proceedings of V international school for the young scientists, 2016, St-Petersburg, P. 125.
7. **Лавреха В.В.**, Миронова В.В. Математическое моделирование формирования и поддержания структуры апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana* L. // Сборник тезисов XXV международной конференции Математика Компьютер Образование, 2018, Дубна, Россия, С. 27.