

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

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

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

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

Новосибирск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	11
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	13
1.1. Стволовые клетки. Ниши стволовых клеток у растений.....	13
1.2. Структура апикальной меристемы корня <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
1.3. Клеточный цикл растения.....	20
1.3.1. Регуляция клеточного цикла фитогормонами.....	22
1.3.2. Экспериментальные методики изучения клеточного цикла в корне	23
1.3.3. Роль ауксина и цитокинина в развитии корня растения	27
1.4. Распределение ауксина в корне растений	31
1.4.1. Биосинтез ауксина.....	34
1.4.2. Активный транспорт ауксина	34
1.4.3. Пути передачи сигнала ауксина.....	35
1.5. Распределение цитокинина в корне растений	36
1.5.1. Биосинтез цитокинина	37
1.5.2. Транспорт цитокинина.....	39
1.5.3. Путь передачи сигнала цитокинина	39
1.6. Взаимодействие фитогормонов при поддержании структуры АМК	40
1.7. Применение методов математического моделирования при исследовании регуляции клеточных процессов у растений	43
1.7.1. Основной регулятор роста и деления ауксин (Grieneisen et al., 2007)	46
1.7.2. Ауксин и Фактор деления – регуляторы клеточного цикла (Mironova et al., 2010).....	48
1.7.3. Циклины основные регуляторы клеточного цикла (Barrio et al., 2013).....	52
1.8. Заключение по обзору литературы	54
ГЛАВА 2. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ СТРУКТУРЫ АМК.....	56
2.1. Решение обратной задачи: поиск минимального регуляторного контура	56
2.1.1. Логическая модель минимального регуляторного контура клеточного цикла под контролем ауксина и цитокинина.	58

2.1.2. Перебор более сложных вариантов регуляторного контура	62
2.2. Модели формирования распределения концентраций ауксина и цитокинина	64
2.2.1. Моделирование распределения ауксина.....	66
2.2.2. Моделирование распределения цитокинина	68
2.3. Моделирование роста и деления клеток	70
2.4. Реализация модели и численные расчеты	72
2.4.1. Стационарное распределение концентраций для постоянного числа клеток.....	74
2.4.2. Распределение концентраций фитогормонов для переменного числа клеток.....	75
2.5. Численный анализ модели при варьировании параметров.	77
2.5.1. Изменение притока ауксина в клеточный ансамбль	78
2.5.2. Изменение притока цитокинина в клеточный ансамбль.....	83
2.5.3. Изменение параметров регуляции клеточного цикла.	87
2.6. Заключение по модели формирования пролиферационного домена....	91
ГЛАВА 3. КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МИТОЗОВ В КОРНЕ.....	93
3.1. Экспериментальное исследование пролиферационной активности в кончике корня <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	93
3.1.1. Предложенные условия проведения эксперимента.....	94
3.1.2. Обработка изображений	95
3.1.3. Компьютерный и статистический анализ.....	97
3.2. Трехмерный компьютерный анализ распределения митозов и событий репликации ДНК в кончике корня	97
3.2.1. Проверка адекватности трехмерных реконструкций кончиков корней	100
3.2.2. Оценка распределения событий митозов и репликации ДНК в разных тканях кончика корня	101
3.3. Верификация предсказаний модели	106
3.3.1. Проверка предсказания 1. Увеличение потока ауксина со стороны побега приведёт к сокращению размеров домена событий репликации ДНК.....	106
3.3.2. Проверка предсказания 2. Увеличение потока цитокинина со стороны побега приведёт к сокращению размера пролиферационного домена.....	108

3.3.3. Проверка предсказания 3. Формирование меристемы у мутантов с дефицитом цитокинина и нарушениями передачи сигнала цитокинина	111
3.4. Новые знания о пролиферационной активности в тканях корня <i>A. thaliana</i> .	113
3.4.1. Билатеральная симметрия пролиферационной активности в эндодермисе и перицикле.	113
3.4.2. Пролиферационный и транзитный домены меристемы.	116
3.5. Заключение по анализу экспериментальных данных	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Апикальная меристема корня, находящаяся на его кончике, содержит стволовые клетки и обеспечивает длительный рост корня. В силу геометрически правильной и простой структуры, меристема корня модельного растения *Arabidopsis thaliana* L. стала удобным объектом в исследованиях механизмов формирования и поддержания ниши стволовых клеток растений. 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 этих вопросов требует привлечения математических моделей для анализа процессов, меняющихся во времени и в пространстве.

В меристеме корня можно выделить две группы клеток, кардинально отличающиеся по своему поведению. Покоящийся центр и окружающие его инициали являются стволовыми клетками – они очень редко и ассиметрично делятся, производя транзитно-амплифицирующиеся клетки, которые делятся гораздо быстрее и симметрично (Dolan et al., 1993). Механизмы поддержания пула стволовых клеток в меристеме корня достаточно хорошо изучены (Scheres, 2007), а вот механизмам поддержания пула транзитно-амплифицирующихся клеток было уделено меньше внимания. Для поддержания размеров меристемы скорость дифференцировки транзитно-амплифицирующихся клеток должна соответствовать скорости появления новых. Как достигается этот баланс? Это один из центральных вопросов в биологии развития растений.

Известно, что ауксин и цитокинин – ключевые сигнальные молекулы, контролирующие пролиферацию клеток в меристемах. Эти два фитогормона являются антагонистами в установлении размеров меристемы корня у *Arabidopsis thaliana* L. (Dello Ioio et al., 2007, 2008). Обработка экзогенным ауксином приводила к увеличению пула транзитно-амплифицирующихся клеток, а обработка экзогенным цитокинином, напротив, уменьшала их число.

Известно, что и ауксин, и цитокинин оказывают комплексное действие на клеточный цикл растения, влияя на регуляторы G1/S и G2/M переходов. Однако непонятно, какие именно пути обеспечивают выход клетки из клеточного цикла на границе меристемы. Выяснение роли фитогормонов в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток меристемы 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, обеспечивающий контроль клеточного цикла фитогормонами ауксином и цитокинином в меристеме корня *A. thaliana*. Анализ экспериментальных данных позволил выявить, что переход G1/S в меристеме разрешен при низких концентрациях ауксина, а при высоких концентрациях ингибируется; переход G2/M разрешен при низких концентрациях цитокинина, а при высоких концентрациях ингибируется. Непротиворечивость и достаточность этого регуляторного контура для контроля формирования пула транзитно-амплифицирующихся клеток в меристеме корня исследована в математической модели.

Впервые создана гибридная математическая модель, объединяющая механизмы (1) распределения ауксина; (2) распределения цитокинина; (3) регуляции клеточного цикла фитогормонами. Модель использована для исследования механизмов формирования и поддержания в апикальной меристеме корня *A. thaliana* двух зон с различной пролиферационной активностью (пролиферационного и транзитного доменов). В модели наблюдалось формирование и сохранение пула делящихся клеток (пролиферационный домен) между максимумом концентрации ауксина с одной стороны и максимумом концентрации цитокинина с другой.

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

Статистический анализ трехмерных карт распределения ключевых событий клеточного цикла в меристеме позволил получить новые знания о

структуре меристемы корня. Впервые предложен удобный метод определения границ пролиферационного и транзитного доменов меристемы.

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.

Теоретическая и практическая ценность работы

Ауксин и цитокинин – основные регуляторы пролиферации клеток, которые широко используются на практике в культурах тканей растений. Подбор правильных концентраций и временного интервала обработки этими фитогормонами – необходимый этап перевода растений в клеточные культуры. Как правило, этот этап происходит методом перебора разных условий, так как механизмы, лежащие в основе контроля пролиферации, недостаточно изучены. В данной работе мы на основе решения обратной задачи предложили концентрационно-зависимый механизм регуляции клеточного цикла ауксином и цитокинином. Помимо несомненной значимости для фундаментальной науки, эти знания могут быть полезны и на практике, для подбора условий перевода растений в культуры тканей. Созданная математическая модель может быть использована далее для исследования поведения ниши стволовых клеток растения в различных условиях.

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.

Публикации по теме диссертации

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.

Также опубликовано 7 тезисов в сборниках конференций.

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.

Благодарности

Выражаю свою искреннюю благодарность научному руководителю диссертации к.б.н. Виктории Владимировне Мироновой. Выражаю благодарность к.б.н. Николаеву Сергею Васильевичу и академику, д.б.н. Николаю Александровичу Колчанову за руководство моими исследованиями в аспирантуре. Искренне благодарю Н.А. Омелянчук и д.б.н. Иванова В.Б., которые поддерживали мою работу, делясь своими глубокими знаниями в физиологии и генетике растений. Выражаю свою благодарность Тарасу Пастернаку 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, д.б.н. В.А. Лихошвая и к.б.н. С.А. Лашина за консультации и плодотворные научные дискуссии. Особую благодарность выражаю своему мужу Лавреха Владимиру Владимировичу за поддержку и понимание.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АМК – апикальная меристема корня.

АТ – клетки атрихобласты эпидермиса.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

ЗР – зона растяжения.

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

К – кортекс.

КсП – протоксилемный полюс.

М – митоз.

МЗ – меристематическая зона.

мкс – метаксилема.

нП – неполюсные ряды клеток.

НСК – ниша ствольных клеток.

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

П – перицикл.

ПД – пролиферационный домен.

пкс – протоксилема.

пф – протофлоэма.

ПЦ – покоящийся центр.

РНК – рибонуклеиновая кислота.

С – сосудистая ткань.

Т – клетки трихобласты эпидермиса.

ТД – транзитный домен.

ФП – протофлоэмный полюс.

Эн – эндодермис.

Эп – эпидермис.

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.

GUS – бета-глюкуронидаза, флюоресцирующий белок.

EdU – 5-этинил-2'-деоксиридин, химическое соединение, которое встраивается в ДНК при репликации и окрашивает ядро, прошедшее S-фазу.

DAPI – 4', 6-диамидино-2-фенилиндол, вещество использованное для окрашивания ядер клеток.

DR5 – искусственная промоторная конструкция для индикации клеточного ответа на ауксин, состоящая из нескольких повторяющихся мотивов с последовательностью TGTCTC.

GFP – флюоресцирующий белок зелёного цвета.

IPT – изопентенилтрансферазы, семейство генов синтеза цитокинина.

LOG4 – LONELY GUY4 – ген, кодирующий фермент биосинтеза цитокинина.

PIN1 – Pin-Formed1, белок-транспортер ауксина, обеспечивающий активный транспорт ауксина из клетки.

ТАА – триптофан-аминотрансфераза, фермент участвующий в синтезе ауксина из триптофана.

VENUS – флюоресцирующий белок желтого цвета.

ntdTomato – nucleus tandem Tomato – ядерный флюоресцирующий белок красного цвета.

WOX5 – транскрипционный фактор ствольности в корне.

YUCCA – флавин-зависимая монооксигеназа, фермент участвующий в синтезе ауксина из триптофана.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Стволовые клетки. Ниши стволовых клеток у растений

Стволовые клетки – это недифференцированные клетки многоклеточных организмов, которые в результате делений могут давать начало предшественникам разных тканей. Поттен и Лафлер в 1997, давая определение общему термину «стволовые клетки», отметили следующие характерные признаки: 1) недифференцированное состояние, в котором клетки лишены тканевых маркеров; 2) способность к пролиферации; 3) способность к самовоспроизведению и, за счет этого, к поддержанию своего пула; 4) способность давать начало большому числу потомков, дифференцирующихся последовательно и формирующих ткани организма; 5) способность восстанавливать ткань после повреждения; 6) способность гибко использовать эти свойства (Potten, Loeffler, 1997).

Эволюция многоклеточности, происходившая параллельно у растений и животных, привела к созданию в этих царствах сходных механизмов, регулирующих баланс между пролиферацией (делением клеток), дифференцировкой и плюрипотентностью (Heidstra, Sabatini, 2014; Pavlović, Radotić, 2017; Somorjai et al., 2012; Grafi et al., 2011). Наибольшее сходство со стволовыми клетками животных демонстрируют стволовые клетки растений, расположенные в апикальной меристеме корня. Например, в этих пулах стволовых клеток функционируют очень похожие механизмы, определяющие, останется ли потомок стволовой клетки в пуле стволовых клеток или приступит к дифференцировке (Heidstra, Sabatini, 2014; Pavlović, Radotić, 2017). В основе этих механизмов лежит работа гена RBR (RETINOBLASTOMA RELATED) у растений (Арабидопсиса) и его гомолога супрессора опухолей RB у животных. И у животных, и у растений активация этих генов в стволовых клетках приводит к прекращению их делений, а подавление – к увеличению пула стволовых клеток (Burkhart, Sage, 2008; Wildwater et al., 2005). Стволовые клетки и растений, и животных имеют открытое состояние хроматина с одинаковыми модификациями ДНК и

гистонов и похожие изменения при дифференцировке. Одним из механизмов самоподдержания плюрипотентности является посттранскрипционное подавление экспрессии генов дифференцировки с помощью миРНК (Pavlović, Radotić, 2017). Из вышеперечисленного видно, что механизмы функционирования стволовых клеток животных и растений (особенно стволовых клеток меристемы корня) во многом похожи.

Еще одним примером сходства служит случай, когда поврежденная стволовая клетка корня замещается потомком от симметричного деления соседней стволовой клетки, но при этом этот потомок дает начало клеткам, дифференцирующимся по типу поврежденной клетки, т.е. путь дифференцировки осуществляется согласно позиционной информации. Аналогичная ситуация описывается и для многих ниш стволовых клеток животных (Heidstra, Sabatini, 2014). Также в корне пептид CLE40 из дифференцированных клеток корневого чехлика контролирует активность белка WOX5, в свою очередь контролирующего пул стволовых клеток, дающих начало клеткам корневого чехлика (Stahl, Simon, 2009; Stahl et al., 2013). Регуляция состояния пула стволовых клеток сигналами от дифференцирующихся потомков также характерна для ниш стволовых клеток животных (Hsu, Fuchs, 2012).

Стволовые клетки растений и животных способны к ассиметричному делению, когда одна дочерняя клетка остается стволовой, а вторая становится транзитно-амплифицирующейся (Heidstra, Sabatini, 2014; Pavlović, Radotić, 2017). Транзитно-амплифицирующиеся клетки несколько раз делятся симметрично и затем приступают к дифференцировке. И у животных, и у растений стволовые вместе с транзитно-амплифицирующимися клетками сохраняются в так называемых нишах стволовых клеток (НСК), поддерживающих специфическое микроокружение, необходимое для сохранения плюрипотентных клеток.

Тем не менее, существуют и различия, которые делают стволовые клетки растений более привлекательным и удобным объектом для

исследований. У животных стволовые клетки являются особой самоподдерживающейся популяцией клеток, возникшей в эмбриогенезе. Растения производят новые ниши стволовых клеток в течении всей жизни, в результате создания этих ниш развиваются, например, боковые стебли, боковые и придаточные корни.

В отличие от стволовых клеток животных, все стволовые клетки растения могут дифференцироваться в клетки абсолютно любых типов, то есть обладают свойством тотипотентности. Более того, этим свойством обладают практически все живые дифференцировавшиеся клетки, обретающие свойства стволовых клеток в процессе дедифференцировки при воздействии комбинации гормонов ауксина и цитокинина (Ikeuchi et al., 2013). Такая способность клеток лежит в основе регенерации, соматического эмбриогенеза и вегетативного размножения (Додуева и др., 2016). В частности, при образовании боковых корней, после удаления стволовых клеток в корне (Xu et al., 2006) или побеге (Reinhardt et al., 2003) происходит респецификация дифференцированных клеток в стволовые.

Хотя между стволовыми клетками растений и стволовыми клетками животных есть большие различия (Иванов, 2003; Barlow, 1997), для растений можно адаптировать концепцию ниши стволовых клеток (НСК). Меристему растений можно назвать НСК растения (Stahl, Simon, 2005). В меристемах специфическое микроокружение создается не только самими стволовыми клетками и сигналами, распространяющихся от них, но и другими активными веществами и факторами, которые синтезируются в дифференцирующихся тканях. В своей работе мы изучаем НСК корня – апикальную меристему корня модельного растения *Arabidopsis thaliana* L.

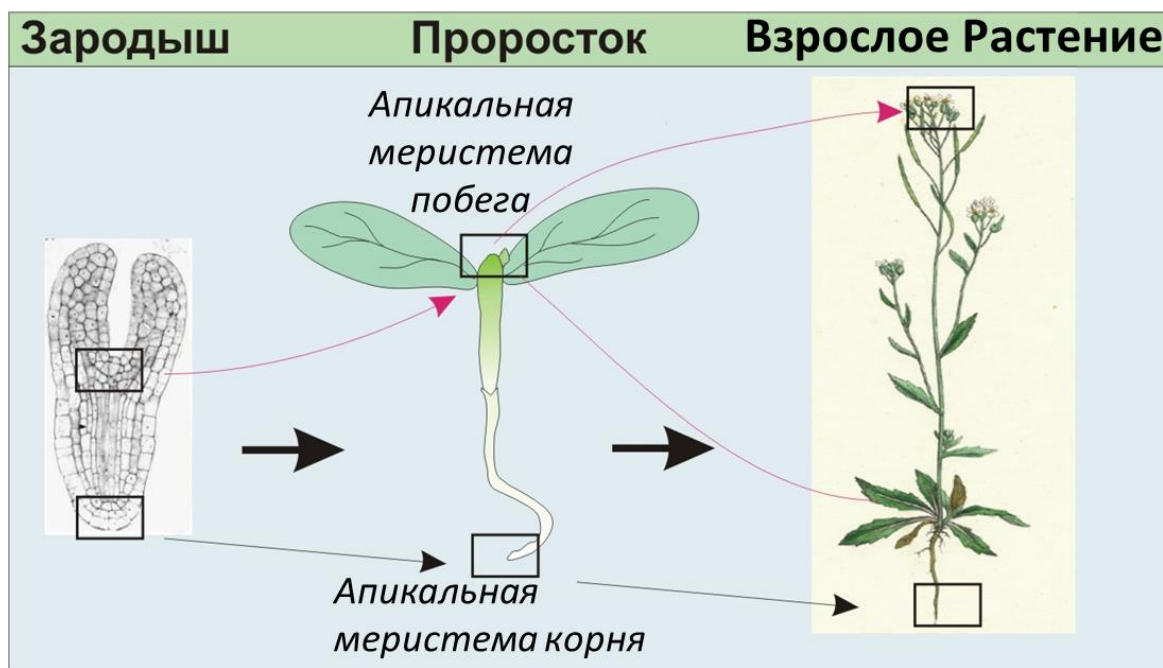


Рисунок 1.1. Апикальные меристемы корня и побега растения *Arabidopsis thaliana* в развитии (рисунок взят из Миронова, 2010).

1.2. Структура апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana*

Закладка меристемы корня растения начинается еще в эмбриогенезе: в базальной части зародыша формируется ПЦ и окружающие его инициали (Scheres, Berleth, 1998). Постэмбриональный рост главного корня, как показано на примере модельного двудольного растения *Arabidopsis thaliana*, происходит через периклиналильные и антиклиналильные деления в меристеме корня и через удлинение постмитотических клеток (Novák et al., 2016). Все типы клеток корня происходят строго из стволовых клеток, окружающих ПЦ (Weigel, Jurgens, 2002). В меристеме корня *Arabidopsis thaliana* L. к стволовым клеткам относят четыре клетки ПЦ (Dolan et al., 1993). Все признаки стволовых клеток (плюрипотентность, редкие, ассиметричные деления) также имеют инициали различных типов клеток, окружающие ПЦ (Simon, Stahl, 2005). Инициали колумеллы являются предшественниками клеток колумеллы; инициали корневого чехлика дают начало клеткам бокового корневого чехлика и эпидермиса; из инициалей кортекса образуются клетки кортекса и эндодермиса; инициали перицикла и сосудистой ткани, расположенные над

ПЦ, дают начало тканям сосудистого цилиндра (рис 1.2) (обзор в Benfey, Scheres, 2000).

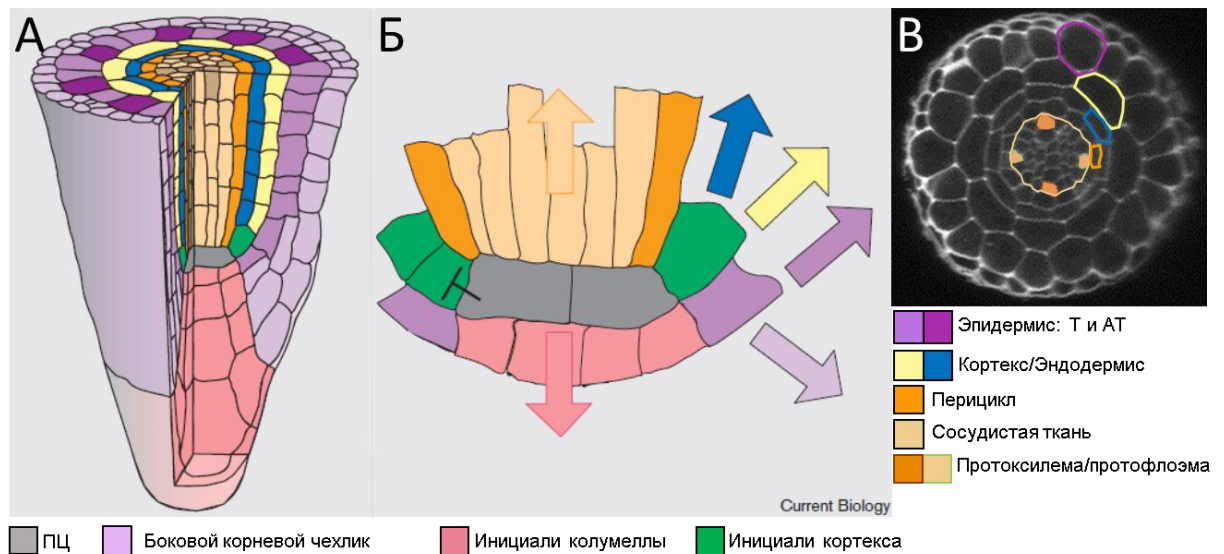


Рисунок 1.2. Пространственное расположение инициалей в кончике корня *Arabidopsis thaliana*. А. Трехмерная схема кончика корня. Б. Ниша стволовых клеток. Стрелками показаны направления деления и роста различных типов тканей (А и Б адаптированы из Benfey, Scheres, 2000). В. Поперечный срез кончика корня с обозначением типов клеток. Показано диаметрально противоположное нахождение полюсов протоксилемы и протофлоэмы. Т – клетки трихобласты, АТ – клетки атрихобласты.

Анатомически корень на продольном сечении (рис 1.2А) представлен отдельными клеточными рядами (файлами клеток), в которых в направлении снизу вверх от ПЦ идет инициаль, затем ее дочерние клетки. Дочерние клетки являются транзитно-амплифицирующимися и делятся гораздо быстрее инициалей. После ряда антиклинальных делений, транзитно-амплифицирующиеся клетки приступают к удлинению и окончательной дифференцировке. За счет этого кончик корня продольно снизу вверх разделен на три зоны: меристематическую, зону растяжения и дифференцировки (von Sachs, 1882).

Границу меристемы традиционно определяют по первой удлиненной клетке кортекса – место где она вдвое увеличивает свой размер (Casamitjana-Martínez et al., 2003; Dello Ioio et al., 2007; Moubayidin et al., 2010). Однако транзитно-амплифицирующиеся клетки в разных слоях заканчивают деления

несинхронно, поэтому эта граница является сильно размытой. Проблемы с определением границы меристемы вызвали неопределённость в терминологии (рис. 1.3).

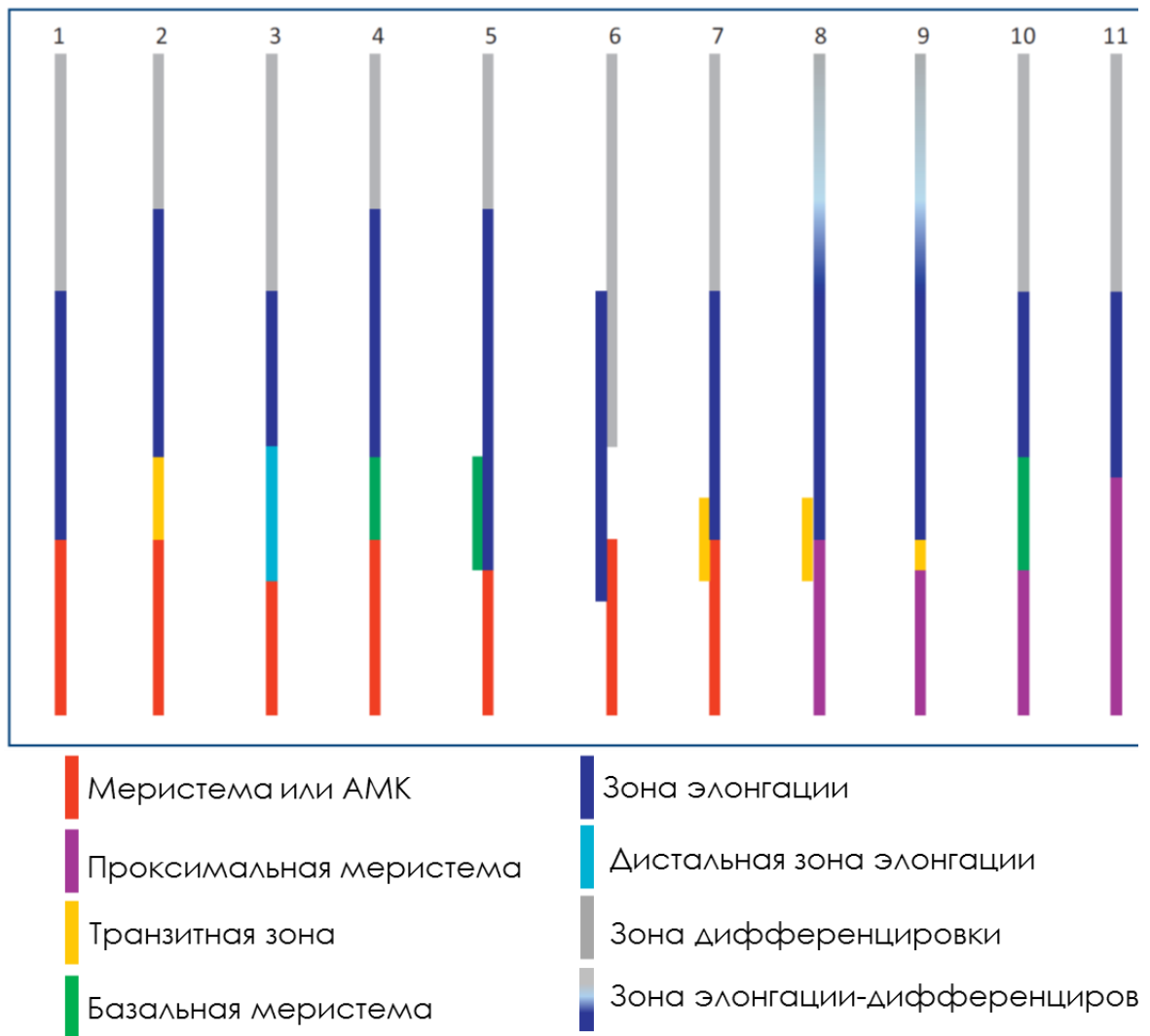


Рисунок 1.3. Различные варианты зонирования кончика корня (рисунок адаптирован из Ivanov, Dubrovsky (2013)).

Так, в дополнение к трем основным зонам кончика корня, было предложено выделить «переходную зону», в которой клетки уже прекратили деления, но не начали быстрого удлинения (Baluska et al., 2010). Также некоторые авторы предложили термин «базальная меристема», как зону, в которой происходит осцилляция концентрации ауксина, предeterminирующая инициацию боковых корней (de Smet et al., 2007). Несмотря на то, что «переходная зона» и «базальная меристема» являются

важными объектами в исследованиях физиологии растений (Dello Ioio et al., 2007; Dello Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010), их границы так и не были четко определены (Ivanov, Dubrovsky, 2013). Только в одном исследовании на кукурузе нижняя граница «переходной зоны» была определена как точка, где клетки начинают так называемый «изодиаметрический рост» (Baluska et al., 1990). Предлагаемые критерии позднее не использовались для установления нижней границы переходной зоны (Baluska et al., 2010).

Для решения проблемы нечеткой границы меристемы Иванов и Дубровский предложили выделить два домена меристемы: пролиферационный и транзитный. Пролиферационный домен образован инициалами и транзитно-амплифицирующимися клетками, он характеризуется последовательными клеточными делениями и небольшой скоростью роста клеток. Часть меристемы, в которой некоторые клетки уже прекратили деления, а некоторые еще делятся, предложено называть «транзитным доменом» (Ivanov, Dubrovsky, 2013). В своей работе мы будем придерживаться этой терминологии (рис. 1.4).

Пролиферационный и транзитный домен составляют апикальную меристему корня – наиболее удобный объект для изучения регуляции делений и дифференцировки ствольных клеток, т.к. потомки каждой ствольной клетки прослеживаются строго по вертикальной линии и степень дифференцировки дочерних клеток увеличивается по мере удаления от материнской ствольной клетки в сторону побега.

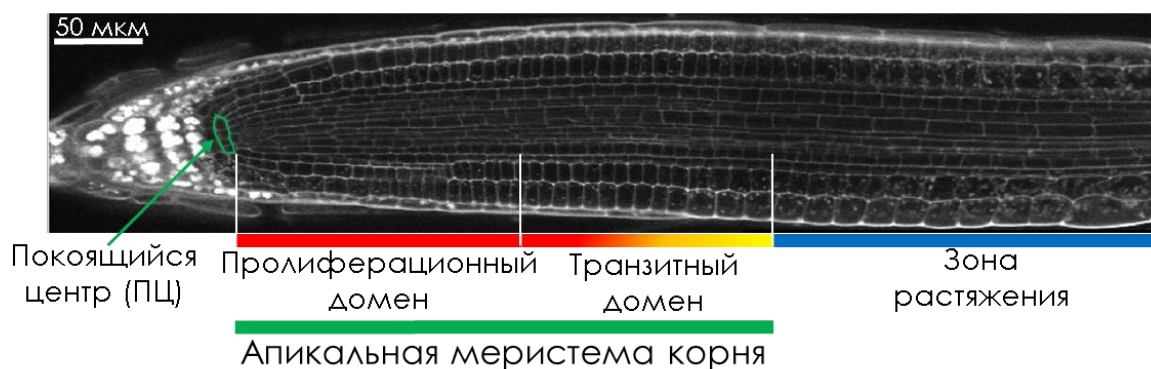


Рисунок 1.4. Зонирование кончика корня *Arabidopsis thaliana* L. (изображение предоставлено Тарасом Пастернаком).

1.3. Клеточный цикл растения

Одним из вопросов биологии развития растений является то, как в растениях контролируются темпы роста органов, как скорость роста меняется на разных стадиях развития и в ответ на внешние факторы. Скорость роста корня основана на двух пространственно-разделенных процессах – пролиферации клеток в меристеме и увеличении размеров клеток в зоне растяжения (рис. 1.4). Эффективность пролиферации клеток в меристеме устанавливается за счет количества делящихся клеток и скорости прохождения митотического цикла индивидуальной клетки, причем первый фактор также зависит от второго.

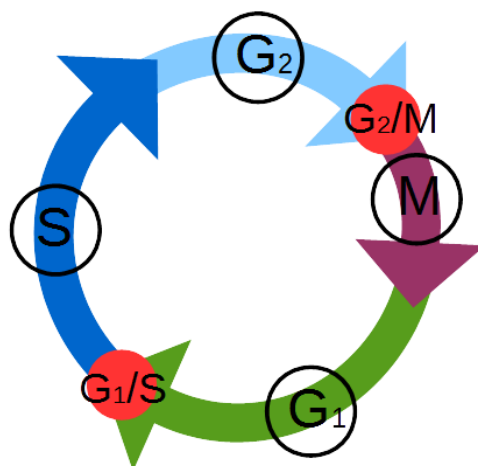


Рисунок 1.5. Схема клеточного цикла с обозначением основных фаз и переходов.

В 1953 году Альма Говард и Стивен Пелк описали клеточную пролиферацию в корнях бобов (Howard, Pelk, 1953; Dubrovsky, Ivanov, 2003). В частности, они предложили концепцию, клеточного цикла, которая стала классической, и выделили четыре основные фазы цикла: фазу репликации ДНК (S–фаза), митоз (M) и находящиеся между ними G₁ и G₂ фазы (рис.1.5). Позднее с помощью методов генетики и молекулярной биологии концепция клеточного цикла была дополнена информацией о контрольных точках клеточного цикла (Nurse, 1990). Ключевыми контрольными точками клеточного цикла являются G₁/S и G₂/M переходы. Считается, что клетка не

вступит в фазу репликации ДНК или фазу митоза, если у нее недостаточно ресурсов или если внешние условия являются неблагоприятными. Основными регуляторами, обеспечивающими G1/S и G2/M переходы у растений, являются циклин-зависимые протеинкиназы (CDK–Cyclin-Dependent Kinase), которые активируются в результате связывания с регуляторными белками – циклинами (CYC – Cyclin) (рис. 1.6). Киназы CDKA регулируют как G1/S, так и G2/M переходы (Vandepoele et al., 2002), а киназы CDKB участвуют в регуляции перехода G2/M (Inze, de Veylder, 2006). Циклины группы А (CYCA) взаимодействуют с CDKA при регуляции S фазы и G2/M перехода, а циклины CYCB взаимодействуют с CDKB при регуляции G2/M перехода (Boruc et al., 2010). CYCD регулирует G1/S переход, связываясь с CDKA и CDKB (Inze, de Veylder, 2006; Boruc et al., 2010).

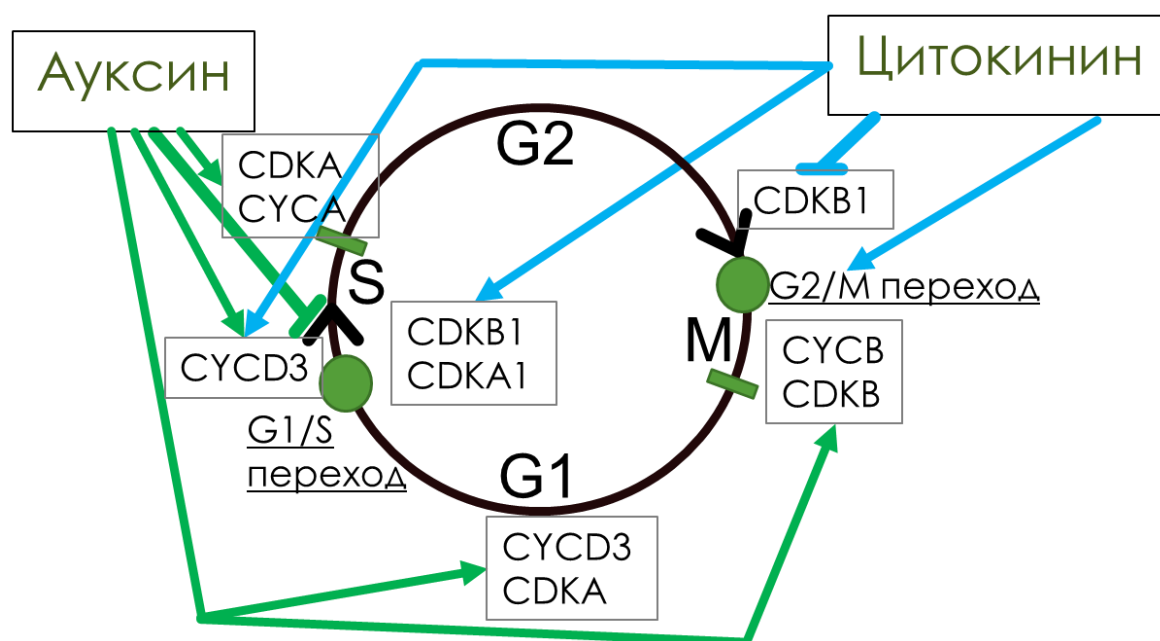


Рисунок 1.6. Основные регуляторы клеточного цикла и известные воздействия гормонов на них. Зелеными стрелками показана регуляция ауксином, голубыми – цитокинином (адаптировано из Новикова и др., 2013). Стрелки с острым концом обозначают активацию, стрелки с тупым концом обозначают ингибирование.

При переходе клетки к растяжению резко ускоряется ее метаболизм, что обеспечивает быстрые изменения в размерах самой клетки и ее органелл. Так, меняется форма и положение ядра клетки (Sliwinska et al., 2012). На

арабидопсисе показано увеличение количество ДНК за счет перехода от полного (митотического) цикла к эндоциклу после окончания делений (Hayashi et al., 2013). Эндоцикл – это укороченная версия клеточного цикла, где после репликации ДНК не происходит деления клетки, но увеличивается плоидность клетки. Переход от митотического цикла к эндоредупликации сопровождается инактивацией митотических циклин-зависимых киназ группы В и активацией киназ группы А (Adachi et al., 2011). Эндоредупликация вызывает значительное увеличение и изменение ультраструктуры ядра.

1.3.1. Регуляция клеточного цикла фитогормонами

Расположенные рядом клетки могут отличаться по скорости прохождения клеточного цикла, например, инициаль делится медленно, ее дочерние клетки в пределах меристематической зоны делятся быстрее, но при выходе из нее прекращают деления. Существует множество внутренних и внешних факторов, оказывающих влияние на регуляцию клеточного цикла. Одними из главных регуляторов являются фитогормоны. К примеру, фитогормоны ауксин, гиббереллин и брассиностероиды являются независимыми регуляторами прохождения клеточного цикла, оказывая влияние на взаимодействие циклинов группы D с киназами в S-фазе, комплекс стимуляции анафазы (anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/C), динамику микротрубочек и растяжимость клеточной стенки (Sablowski, Dornelas, 2013). Абсцизовая кислота подавляет клеточные деления при повышенных концентрациях в качестве гормона стресса, запрещая G1/S переход (Wang et al., 1998). Этилен способен ингибировать деления клеток и уменьшать размер меристемы (Ruzicka et al., 2007).

Несмотря на то, что клеточный цикл регулируется многими факторами, ауксин и цитокинин среди этих факторов занимают одно из первых мест. На рис. 1.6 обобщено действие фитогормонов ауксина и цитокинина на клеточный цикл согласно данным из работы (Новикова и др., 2013). Ауксин активирует экспрессию циклинов CYCD, CYCA и киназ CDKB2, тем самым

способствуя прохождению как перехода G1/S, так и G2/M (de Smet et al., 2007). У проростков *Arabidopsis* цитокинин способен повышать экспрессию генов киназы CDKA и циклинов CYCD, которые функционируют при активации S-фазы, таким образом цитокинин необходим для прохождения контрольной точки G1/S (Cho et al., 2010). Киназы G2/M перехода, функционально активны в отсутствии цитокинина, например, CDKB1;1 (Pasternak et al., 2007). Однако G2/M переход зависит от активации цитокинином фосфатаз дефосфорилирующих CDC киназы (Orchard et al., 2005).

В транзитном домене цитокинин активирует транскрипционный фактор цитокининового ответа ARR2 и подавляет ауксиновый сигнал индукцией SHY2/IAA3 (Takahashi et al., 2013). ARR2 индуцирует экспрессию CCS52A1 (CELL CYCLE SWITCH PROTEIN 52 A1) – активатора E3 убиквитин лигазы APC/C, которая, в свою очередь, обеспечивает деградацию регуляторов митоза, в результате чего клетки перестают делиться и переходят к эндоциклу.

1.3.2. Экспериментальные методики изучения клеточного цикла в корне

Меристема корня является удобным объектом для исследования регуляции клеточного цикла. Можно выделить две группы экспериментальных методов, имеющих отношение к изучению пролиферационной активности в меристеме: (1) изучение структуры меристемы как результата клеточной динамики и (2) изучение распределения клеток в различных фазах клеточного цикла.

Косвенным методом оценки пролиферационной активности в меристеме корня является размер АМК. Классическими параметрами при изучении структуры АМК стали длина меристемы и количество клеток вдоль оси корня, относящихся к ней. Подсчет клеток меристемы корня ведется по слою кортекса, т.к. он хорошо различим на микрофотографиях. Последней клеткой меристемы считают ту, которая в два раза меньше в длину следующей

за ней в ряду клеток кортекса (Casamitjana-Martínez et al., 2003). Этот метод активно используется при изучении влияния гормонов на клеточный цикл.

Экспериментальное определение распределения клеток в ткани в различных стадиях клеточного цикла является одним из способов изучения клеточного цикла. С 1930-х годов в цитологии применяется колхицин для «накопления» митозов в растительных тканях, поскольку стадия митоза наиболее скоротечна по сравнению с остальными фазами цикла. Колхицин ($C_{22}H_{25}NO_6$) – алкалоид трополонового ряда, блокирует деление клеток на стадии метафазы (Blakeslee, Avery, 1937). Поскольку действие колхицина связано с инактивацией веретена делящихся клеток, он влияет только на клетки, находящиеся в процессе деления.

Для того, чтобы выявить «накопленные» в ткани митозы ранее использовался метод выявления углеводного компонента ДНК по Фельгену или «Реакция Фельгена» (Саркисов, Петров, 1996). Метод Фельгена прост и надежен, позволяет определить различные фазы митоза (профаза, метафаза, анафаза, телофаза), но (1) достаточно трудоемкий, (2) нет возможности проследить динамику происходящих процессов, т.к. препарат анализируется уже в зафиксированном виде.

В настоящее время широко используется метод окрашивания ДНК с помощью DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол, рис. 1.7, Kapuscinski, 1995) благодаря легкости применения и высокой точности. DAPI представляет собой флуоресцентный краситель, который прочно связывается с А-Т богатыми регионами в ДНК и поэтому широко используется в флуоресцентной микроскопии. DAPI может проходить через неповрежденную клеточную мембрану, вследствие чего используется для окрашивания как живых, так и фиксированных клеток. Окрашивание ДНК с помощью DAPI позволяет увидеть под флуоресцентным микроскопом ядра клеток в ткани, а также отследить ядра в митозе, так как они имеют характерную форму (рис. 1.7).

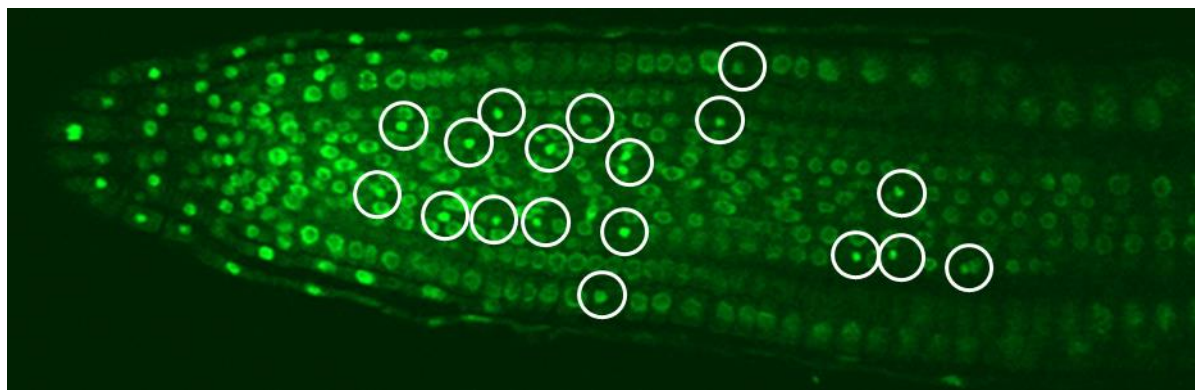


Рисунок 1.7. Окрашивание ядер клеток методом DAPI. На рисунке показан продольный срез кончика корня *Arabidopsis thaliana* с конфокального микроскопа, клетки в фазе митоза содержат ядра с более яркой окраской и меньшим размером по сравнению с соседними (выделены белыми кругами) (изображение предоставлено Тарасом Пастернаком).

Существует несколько методов изучения распределения событий репликации ДНК (S-фазы) в ткани. Первым предложенным методом было мечение с помощью радиоактивного [^3H]тимидина. Сигнал [^3H]тимидина слаб, а получение и использование этого препарата требует больших затрат времени. Позднее было предложено использование нерадиоактивного 5-бром-2'-деоксиуридин (BrdU), который определялся с помощью антител, специфичных к BrdU. Однако антитело к BrdU весьма объемное, поэтому оно не всегда может диффундировать через ткань к интересующим нас клеткам, в связи с чем падает точность метода. Совсем недавно был предложен новый улучшенный метод исследования событий репликации ДНК в ткани, с использованием 5-этинил-2'-деоксиридин (EdU), в котором терминальная алкиновая группа заменяет метиловую группу в 5-й позиции (Salic, Mitchison, 2008). EdU легко встраивается в клеточную ДНК во время ДНК репликации и флуоресцирует в присутствии одновалентной меди. Флуоресцентный сигнал фиксируется методами флуоресцентной микроскопии (рис. 1.8).



Рисунок 1.8. Окрашивание ДНК в процессе репликации методом EdU (изображение предоставлено Тарасом Пастернаком).

В качестве маркера перехода G2/M у растений используют циклин CYCB1;1, который экспрессируется только в поздней G2 и M фазах, т.е. это маркер клеток, следующих в митоз. Генетическая конструкция CYCB::GUS была встроена в геном *Arabidopsis* (рис. 1.9) для наблюдения за распределением клеток, находящихся в G2/M стадии (Colon-Carmona et al., 1999). Этот маркер широко используется для анализа изменения зон пролиферационной активности в корне на качественном уровне, например, в работе Dello Ioio et al. (2007).

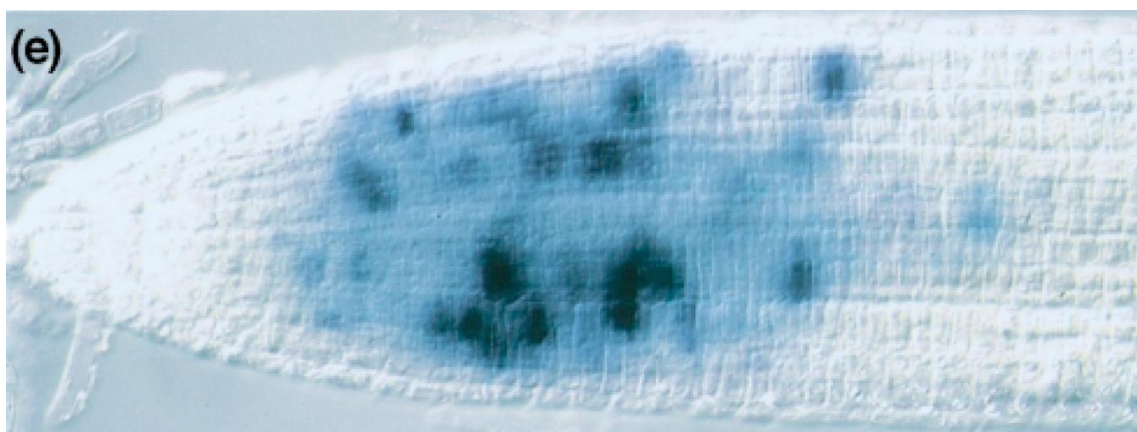


Рисунок 1.9. Активность репортерной конструкции CYCB1::GUS в кончике корня (Colon-Carmona et al., 1999)

До 1990х митотическая активность в АМК была хорошо изучена у многих видов растений (Ivanov, Dubrovsky, 2013). Несмотря на то, что арабидопсис является модельным объектом в генетике растений, детальный анализ пролиферационной активности в его АМК ранее не проводился. Это

связано с появлением репортерных конструкций *CYCB1::GUS*, исследование которых, хоть и проще, однако дает лишь качественную информацию. Считалось, что меристема арабидопсиса имеет очень простое строение и клетки разных тканей заканчивают деления случайным образом.

В большинстве работ ключевые фазы клеточного цикла изучались с использованием двумерных изображений. Такой подход был основным препятствием для изучения трехмерной структуры корня растения. Появление новых техник для трехмерного анализа позволяет по-новому взглянуть на эту тему. Недавно была разработана программа *iRoCS Toolbox* (Schmidt et al., 2014) для трехмерного аннотирования организации кончика корня. Вместе с улучшенным экспериментальным протоколом для обнаружения митозов в тканях (Pasternak et al., 2015), программа *iRoCS Toolbox* позволяет изучать пролиферационную активность во всем корне в трехмерном пространстве, а не только в двумерных проекциях.

1.3.3. Роль ауксина и цитокинина в развитии корня растения

Фитогормон ауксин участвует в регуляции различных биологических процессов растений, например, в зависимости от концентрации ауксина клетка может дифференцироваться или поддерживать стволовое состояние (Schaller et al., 2015). Кроме этого, ауксин в корне выполняет множество функций: обеспечивает формирование АМК в эмбриогенезе (Friml et al., 2003); регулирует периодичность и место закладки боковых корней (Dubrovsky et al., 2011); обеспечивает поддержание структуры ниши стволовых клеток; регулирует гравитропизм растения и активирует удлинение корневых волосков (Vanneste, Friml, 2009). Известна концентрационная зависимость эффектов ауксина, например, он по-разному действует на скорость деления и удлинения клеток. Типичной для клеточных ответов на ауксин является кривая дозовой зависимости в форме колокола (Campanoni, Nick, 2005). При низких концентрациях ауксин обеспечивает удлинение клетки по градиенту его распределения (Gray et al., 1998).

Цитокинины получили свое название за свою способность активировать цитокинез – деление эукариотической клетки после деления ядра. Миллер с коллегами в 1955 году выделил первый цитокинин и назвал кинетином (Miller et al., 1955), за этим последовала идентификация транс-зеатина (Miller, 1961). Ранние работы о цитокининах показали, что они ускоряют рост стебля, ингибируют рост корня, стимулируют клеточное деление и вызывают формирование меристемы побега из каллусов (Miller et al., 1956). В последующем было показано, что цитокинины важны во многих процессах развития растений, включая формирование органов, старение листьев, доминирование верхушки и всхожесть семян (Mok, Mok, 2001). Цитокинин ингибирует формирование боковых корней, блокируя первые деления клеток перицикла на ксилемном полюсе (Laplaze et al., 2007). Цитокинин также участвует в ответе на биотический и абиотический стрессы (Werner, Schmulling, 2009).

Взаимодействие путей передачи сигналов ауксина и цитокинина играет большую роль в развитии растения начиная с эмбриогенеза, в частности, закладка меристемы корня в эмбриогенезе зависит от сбалансированной активности обоих гормонов (Muller, Sheen, 2008). Ауксин активирует экспрессию репрессоров сигнального пути цитокинина *ARR7* и *ARR15*. С другой стороны, отсутствие ингибирования ауксином сигнала цитокинина вызывает активацию ответа на цитокинин, вследствие чего возникают серьезные проблемы в закладке меристемы корня в эмбриогенезе. Таким образом, взаимодействие путей передачи сигнала ауксина и цитокинина через гены *ARR7* и *ARR15* непосредственно связано с формированием ниши стволовых клеток корня (Muller, Sheen, 2008).

Ауксин и цитокинин являются ключевыми регуляторами, обеспечивающими баланс между скоростью деления клеток и их дифференцировкой (Schaller et al., 2015). Обработка корней как ауксином, так и цитокинином приводит к изменению размера меристемы (Beemster, Baskin, 2000) (рис. 1.10).

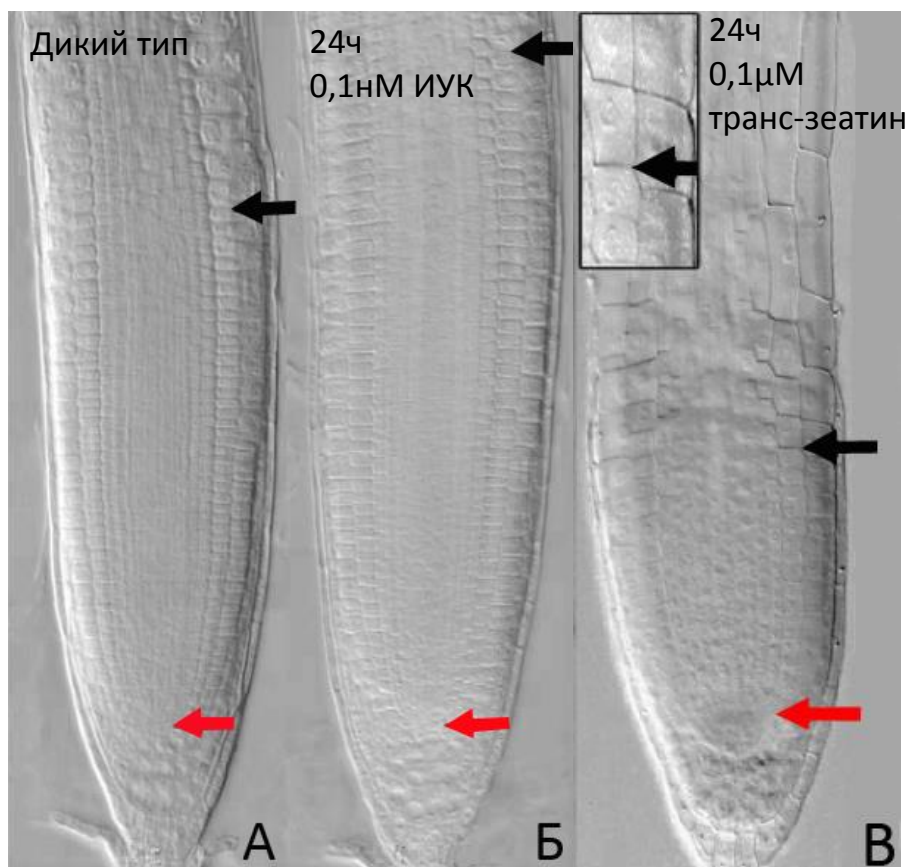


Рисунок 1.10. Влияние ауксина и цитокинина на длину меристематической зоны корня (Dello Ioio et al., 2007; Dello Ioio et al., 2008). А. Кончик корня дикого типа *Arabidopsis thaliana*. Б. Длина меристемы после 24 часов обработки индолил-3-уксусной кислотой (ИУК – природный ауксин) в концентрации 0,1нМ. В. Длина меристемы после 24 часов обработки транс-зеатином (природный цитокинин) в концентрации 0,1μМ. Красная стрелка обозначает ПЦ, черная стрелка - границу меристемы, определяемую по клеткам кортекса в месте начала их удлинения– двукратного увеличения их продольного размера.

Ауксин ускоряет рост клеток корня в длину и сокращает зону растяжения корня, и, таким образом, уменьшает длительность этого процесса в целом (Rahmann et al., 2007). Обработка ауксином увеличивает длину меристемы и активизирует деления клеток на границе меристемы с зоной растяжения (Blilou et al., 2005). Однако, информация о влиянии ауксина на пролиферацию неоднозначна: в работе Veemster, Baskin (2000) говорится о сокращении числа клеток в меристеме после обработки ауксином, а в работе Dello Ioio et al. (2008) показан обратный эффект на число клеток в меристеме.

Такие различия в данных могут быть связаны с разной дозой или типом ауксина, примененным для обработки растений. Например, обработка синтетическим ауксином НУК (нафтилуксусная кислота) вызывает удлинение клеток в концентрациях, при которых не происходит активация их делений (Campanoni, Nick, 2005). Напротив, обработка другим синтетическим ауксином 2,4-Д (2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота) в малых концентрациях не оказывает влияния на деления клеток, но стимулирует их растяжение (Beemster, Baskin 2000). Ауксин вызывает задержку клеток в меристеме, что приводит к замедлению их перехода к растяжению и сокращению периода растяжения (Burstrom, 1971).

Длина меристемы корня определяется количеством клеток способных к делению. Роль ауксина в регуляции пролиферации клеток была показана многими авторами (см. выше). До сих пор не было понятно, влияет ли фитогормон цитокинин на сохранение способности клеток к делению или регулирует процесс дифференцировки. В работе Dello Ioio et al. (2007) показано, что обработка цитокинином уменьшает длину меристемы и способствует переходу клеток к дифференцировке. Однако в работе Филина, Иванова (2017), напротив, было показано, что замедление скорости роста корня при воздействии транс-зеатина происходит из-за ингибирования пролиферации и перехода клеток к растяжению (Ivanov, Filin, 2017).

Размер меристематической зоны определяется количеством клеток с возможностью деления. Как видно из опубликованных данных ауксин и цитокинин оказывают критическое влияние на размер меристемы, а значит и на способность клеток к делению (рис. 1.11). Реакция клеток растения на ауксин и цитокинин зависит от концентрации этих веществ в клетке (Медведев, 2013), поэтому распределение фитогормонов в ткани может регулировать размеры и расположение пролиферационного домена. В разделах 1.4 и 1.5 рассмотрим, как распределены гормоны ауксин и цитокинин в корне.

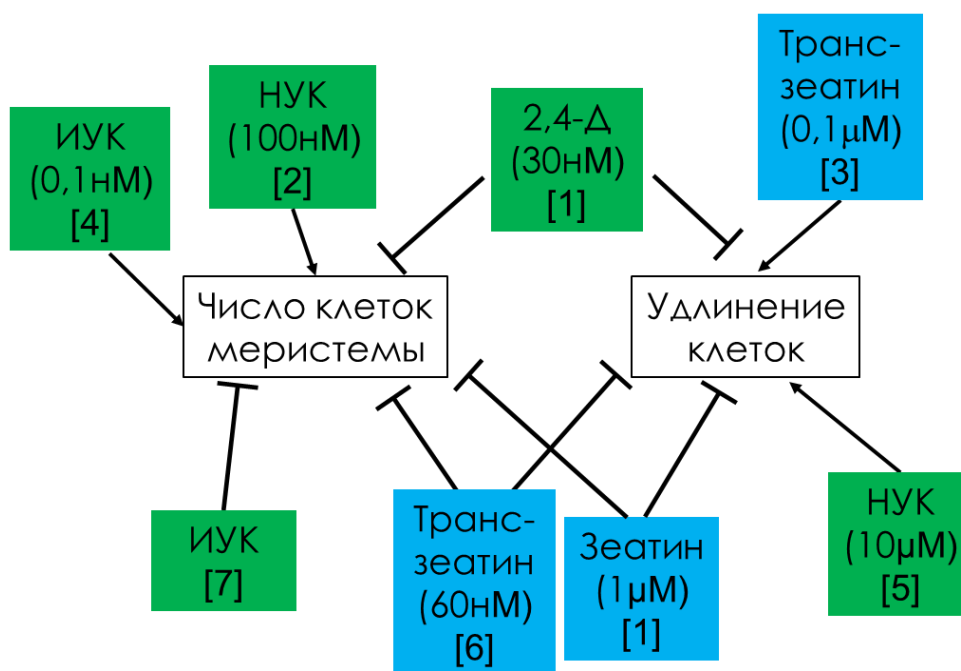


Рисунок 1.11. Обзор результатов экспериментов о влиянии ауксина и цитокинина на размер меристемы корня *A. thaliana* при обработке разными дозами экзогенных гормонов. [1] – Beemster, Baskin, 2000; [2] Blilou et al., 2005; [3] – Dello Ioio et al., 2007; [4] – Dello Ioio et al., 2008; [5] – Campanoni, Nick, 2005; [6] – Ivanov, Filin, 2017; [7] – Burstrom, 1971.

1.4. Распределение ауксина в корне растений

Ауксин является низкомолекулярным веществом (рис. 1.12Г), поэтому прямые методы измерения его концентрации не позволяют получить количественные данные о его распределении в тканях растения. Для оценки концентрации используются трансгенные растения с репортерными конструкциями, чувствительными к концентрациям ауксина. Есть два вида конструкций, принципиально отличающиеся по механизмам действия: 1) активация экспрессии белков под промотором DR5 в клетках (Ulmasov et al., 1999) или ядре (Liao et al., 2015); 2) деградация флюоресцирующего белка VENUS, вставленного в терминальный домен Aux/IAA (Brunoud et al., 2012).

Ауксин неравномерно распределен в ткани корня, и экспериментально показано наличие следующих максимумов концентрации ауксина в корне: (1) в стволовых клетках меристемы корня, (2) колумелле (рис. 1.12А-В), (3) в

клетках протоксилемы (рис. 1.12Д), (4) клетках перицикла зоны дифференцировки корня, (5) в точках инициации боковых корней (рис. 1.12Е).

В развитии максимум концентрации ауксина поддерживается в корневых меристемах главных, боковых и придаточных корней, где регулирует положение и количество стволовых клеток корня. У арабидопсиса максимум концентрации находится в ПЦ и в инициалах корневого чехлика (5-6 клетка от кончика корня), с плавным падением градиента концентрации ауксина к первой клетке корневого чехлика, с градиентом концентрации ауксина в АМК (Liao et al., 2015; Sabatini et al., 1999). Месторасположение максимума ауксина, а вместе с ним ПЦ, структура АМК в целом остаются неизменными в развитии, несмотря на постоянные деления клеток в этой зоне, в том числе деления клеток ПЦ.

Формирование максимумов концентрации ауксина происходит не только за счет локального синтеза ауксина, но также благодаря перемещению ауксина в ткани за счет диффузии и активного транспорта, регулируемого белками-переносчиками. Разберем эти процессы подробнее.

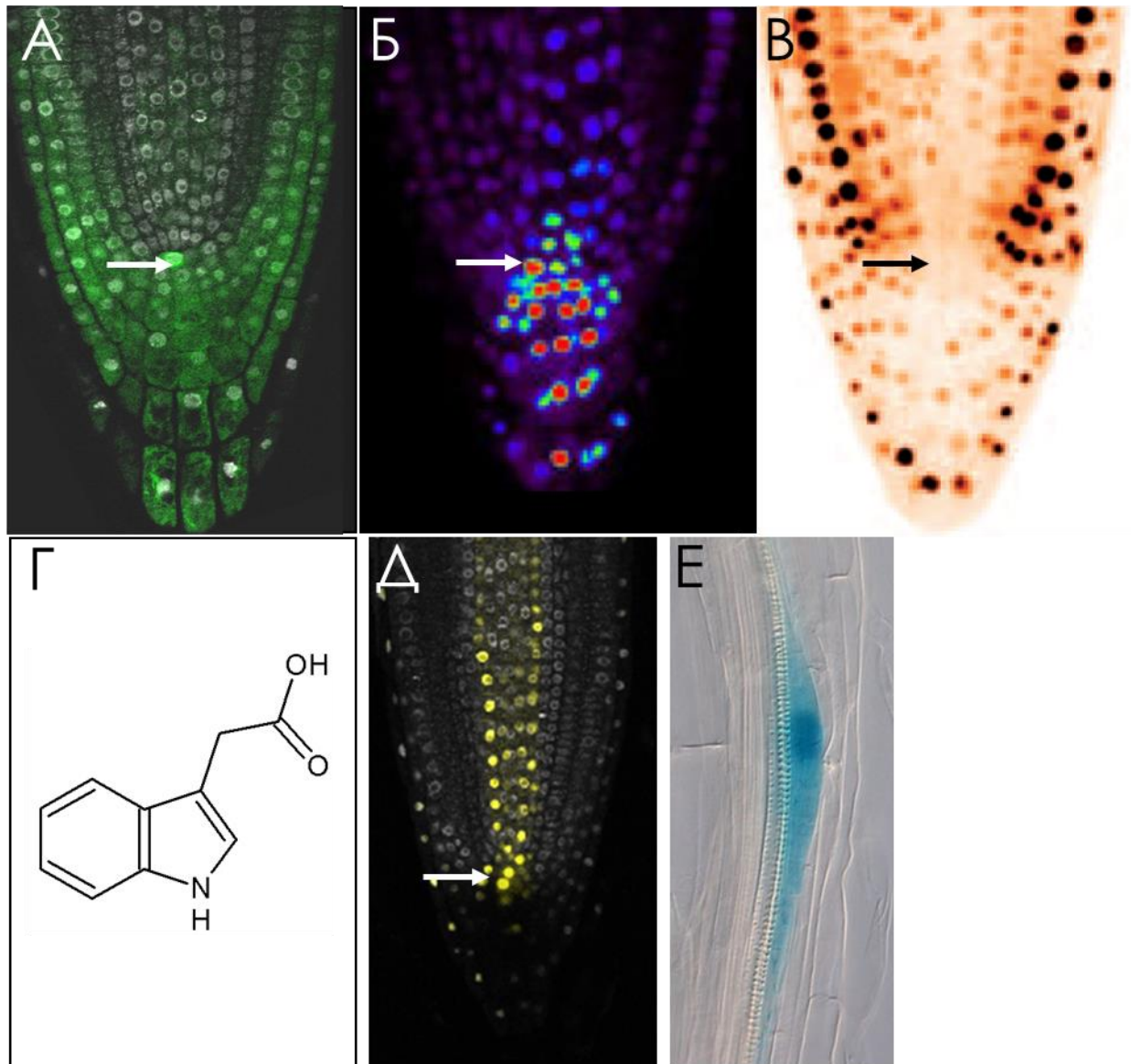


Рисунок 1.12. Максимумы концентрации ауксина в корне. А. Активность ауксин-чувствительного репортера DR5::GFP под конфокальным микроскопом. Максимум активности GFP ярко-зелёный на фотографии. Для наглядности сигнал GFP контрастирован сигналом DAPI (белый цвет). Б. Активность репортера DR5v2 (Liao et al., 2015). Максимум активности свечения обозначен красным, минимум – фиолетовым. В. Распределение ответа на ауксин, выявленное с помощью конструкции DII-VENUS. Максимум концентрации обозначен белым, минимум – черным (Brunoud et al., 2012). Г. Химическая формула природного ауксина – Индолил-3-уксусная кислота. Д. Максимум флюоресценции репортера DR5-VENUS наблюдается в ПЦ и в протоксилеме. Е. Активность репортера DR5::GUS при образовании бокового корня (Goh et al, 2012). Стрелки белого и черного цветов указывают на ПЦ.

1.4.1. Биосинтез ауксина

В корне растений биосинтез ауксина связан с триптофаном (одной из аминокислот, формирующих белки). Природный ауксин – ИУК (индолил-3-уксусная кислота) синтезируется из триптофана через две последовательные реакции с промежуточным продуктом – индолил-3-пировиноградной кислотой (ИПК) (рис. 1.13, Ljung, 2013). Эти реакции контролируются двумя ферментами: триптофан-аминотрансферазой (ТАА) и флавин-зависимой монооксигеназой (YUCCA).

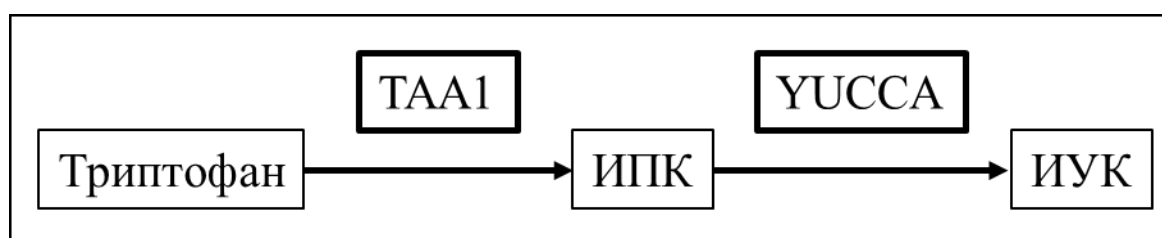


Рисунок 1.13. Триптофановый путь синтеза ауксина.

В клетках растений большая часть ИУК находится в виде конъюгатов, неактивных соединений с аминокислотами и сахарами, для поддержания гормонального гомеостаза (Ljung, 2013). Кроме того, конъюгаты ИУК используются для транспорта ауксина. Деградация ауксина происходит при помощи ИУК-оксидазы либо полифенолоксидазы, в результате чего образуются необратимые конъюгаты, и ауксин полностью инактивируется (Ljung, 2013).

1.4.2. Активный транспорт ауксина

Для ауксина показана его сложная система транспорта в растении, состоящая из пассивного транспорта по сосудам флоэмы и из активного полярного межклеточного транспорта. Показано, что формирование концентрационных максимумов ауксина в ткани растения в основном обеспечивается механизмами активного перераспределения ауксина между клетками (Mironova et al., 2010; 2012; Zažímalová et al., 2010). ИУК

распределяется в тканях через межклеточное пространство за счет активного транспорта, который осуществляется двумя семействами белков (Zažímalová et al., 2010). Семейство белков AUX/LAX (AUXIN-INSENSITIVE1/LIKE AUX1) обеспечивают приток ауксина в клетку. Белки семейства PIN (PIN-FORMED) осуществляют отток ауксина из клетки. В меристеме корня распределение ауксина регулируется в большей степени белками PIN, которые формируют потоки в разных направлениях, благодаря нахождению на мембране на разных сторонах клетки (Коврижных и др., 2014). Наибольший вклад в поступлении ауксина к кончику корня осуществляется за счет PIN1 белка, который локализуется на мембранах клеток сосудистой ткани, перицикла и эндодермиса (Omelyanchuk et al., 2016).

1.4.3. Пути передачи сигнала ауксина

Долгое время роль основного рецептора IAA отдавали белку ABP1 (AUXIN-BINDING PROTEIN 1), а в 2005 году было показано, что рецепторами ауксина также являются F-боксы белки TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), которые формируют убиквитин-лигазный комплекс (Dharmasiri et al., 2005). *Aux/IAA* (AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID) – гены первичного ответа на ауксин. Экспрессия *Aux/IAA* на уровне транскрипции регулируется ARF транскрипционными факторами первичного ответа на ауксин. В отсутствие ауксина транскрипционные факторы ARF, обеспечивающие ответ на ауксин, образуют неактивные гетеродимеры с корепрессорами *Aux/IAA*. Количество *Aux/IAA* в клетке регулируется убиквитин-лигазным комплексом с TIR1 в зависимости от концентрации ауксина.

Поскольку ауксин низкомолекулярное вещество и в активной форме пребывает его малое количество, для исследования его динамики в клетке используются специальные маркеры, связанные с сигнальным путем ответа на ауксин (рис. 1.12). DR5 – искусственная промоторная конструкция для индикации клеточного ответа на ауксин, состоящая из нескольких

повторяющихся мотивов с последовательностью TGTCTC, которая имеет аффинность к транскрипционным факторам ARF (Ulmasov et al., 1999). Усовершенствованная версия DR5 – DR5v2, содержит в повторяющихся мотивах последовательность TGTCGG и имеет большую аффинность к транскрипционным факторам ARF, чем DR5 (Liao et al., 2015). У обеих конструкций интенсивность свечения вставленного под промотор репортерного белка (GFP/GUS), коррелирует с концентрацией ауксина в клетке. Другой механизм действия имеет искусственная промоторная конструкция DII-VENUS, у которой в ответ на ауксин происходит деградация флюоресцирующего белка VENUS, вставленного в терминальный домен Aux/IAA (Brunoud et al., 2012), т.е. чем больше ауксина в клетке, тем меньше свечение белка.

1.5. Распределение цитокинина в корне растений

Цитокинин также является низкомолекулярным веществом (рис. 1.14А,Б), производным аденина. Неравномерность распределения цитокинина в корне показана в работе (Zürcher et al., 2013), на основании данных об активности цитокинин-чувствительного репортера TCSn::GFP (рис. 1.14В-Д).

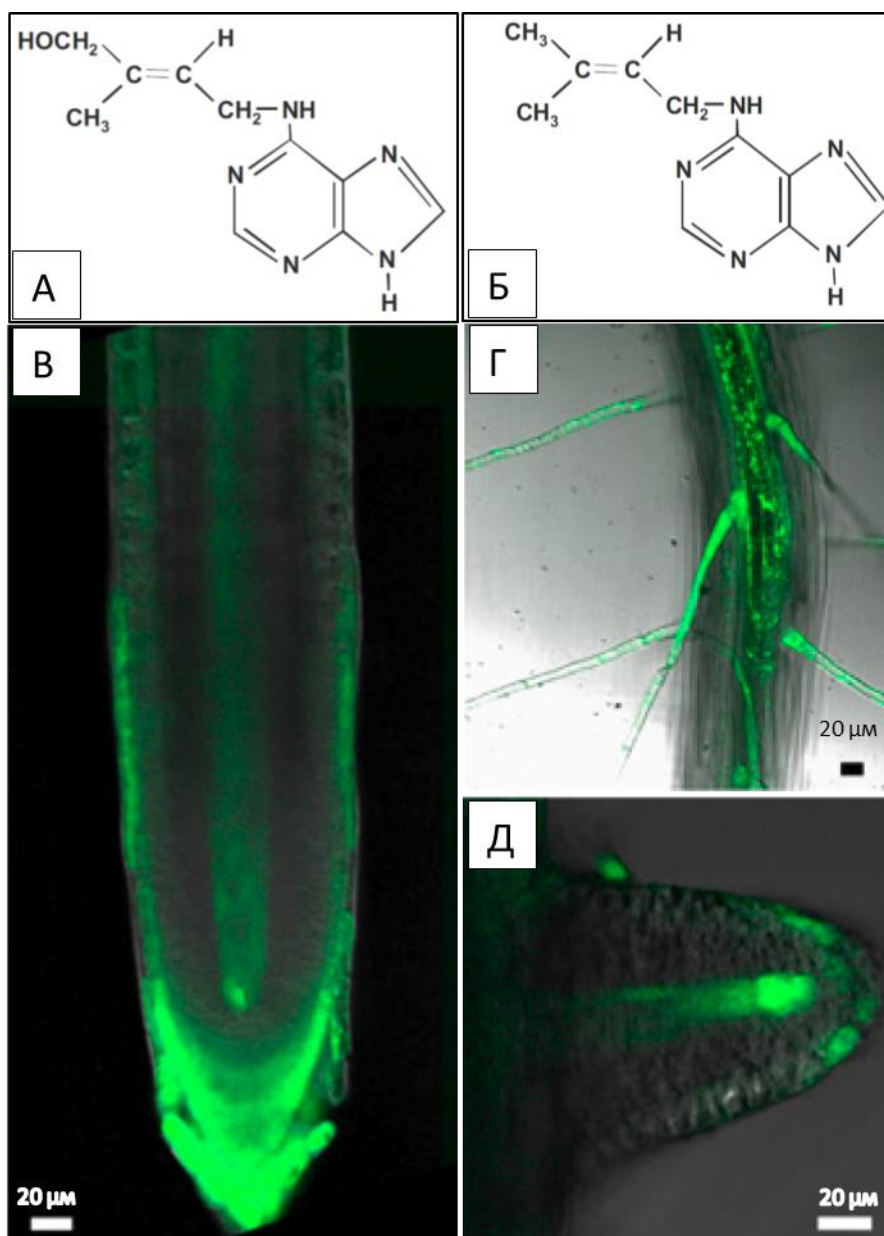


Рисунок 1.14. Химические формулы растительных цитокининов и активность цитокинин-чувствительного репортера TCSn::GFP в корне *Arabidopsis thaliana*. А – транс-зеатин (тЗ). Б – Изопентенил аденин (иП). В. Меристема главного корня растения возрастом 5дней. Г. Главный корень с волосками. Д. Образование бокового корня. Шкала 20мкм. Рисунки В-Д взяты из (Zürcher et al., 2013).

1.5.1. Биосинтез цитокинина

Синтез цитокинина у арабидопсиса контролируется генами АТР/АДР изопентенилтрансферазы (IPT), которые кодируют ферменты лимитирующей стадии в биосинтезе цитокинина (рис. 1.15). На первом шаге диметилаллиловый дифосфат (DMAPP) вступает в реакцию с монофосфатом

аденозина (AMP) для формирования 5' монофосфата iP-рибозида (iPRMP) с помощью генов семейства IPT в качестве катализатора. На следующем шаге, цитохром P450 монооксигеназа (CYP735A) переводит iPRMP в 5' монофосфат tz-рибозида (tzRMP) в tz-нуклеотид. В завершении цепочки ферменты, кодируемые семейством генов LOG, переводят tzRMP в активную форму цитокинина tz (Takei et al., 2004).

Семь IPT генов (*AtIPT1* и *AtIPT3* до *AtIPT8*), найденные в *Arabidopsis*, кодируют ферменты, которые синтезируют предшественника цитокинина – изопентениладенин (Kakimoto, 2001). Для каждого из этих генов характерен свой паттерн экспрессии. В работе (Miyawaki et al., 2004) исследованы уровни мРНК и паттерны экспрессии гена бета-глюкуронидазы (*GUS*), объединенного с регуляторной последовательностью каждого из *AtIPT* генов. Выявлены следующие преобладающие паттерны экспрессии в корнях: *AtIPT1::GUS* – клетки протоксилемы в кончике корня; *AtIPT3::GUS* – ткани флоэмы; *AtIPT5::GUS* – клетки колумеллы, зачатках корней, в клетках перицикла, где возможно будут образованы боковые корни; *AtIPT7::GUS* – клетки эндодермиса зоны элонгации корня.

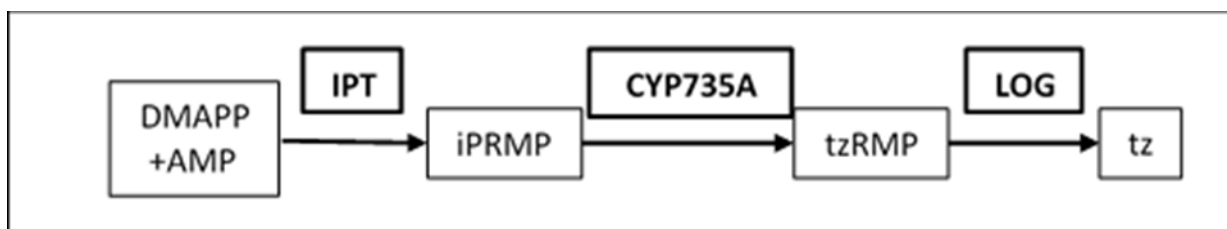


Рисунок 1.15. Путь биосинтеза цитокинина и ключевые ферменты катализирующие эти реакции.

Окисление цитокинина происходит при участии цитоксиндегидрогеназ, которые катализируют отщепление у боковой цепи N6 аденина. Скорость окисления цитокинина зависит от активности генов СКХ (CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE) (Werner, Schmulling, 2009).

1.5.2. Транспорт цитокинина

Эксперименты с растениями мутантами *ipt1;3;5;7* и диким типом показали какой транспорт является предпочтительным для разных типов цитокининов: транс-зеатины транспортируются в направлении от корня к побегу, тогда как изопентиладенины двигаются от побега к корню (Matsumoto-Kitano et al., 2008). Пассивный транспорт цитокинина на дальние расстояния по флоэме был показан в работе (Bishopp et al., 2011): авторы наблюдали перемещение в кончик корня цитокинина, помеченного радиоактивным изотопом, которым обрабатывали семядоли. Процесс активного транспорта цитокинина мало изучен и его транспортеры на дальние расстояния пока неизвестны, хотя есть претенденты на эту роль. На сегодняшний день предполагаемыми транспортерами цитокинина может быть семейство переносчиков взвешенных-нуклеозид (ENT) и семейство пуриновых пермеаз (PUP) (Muraro et al., 2011). Тем не менее, функциональная важность этих предполагаемых транспортеров цитокинина для роста и развития растений ещё не показана.

1.5.3. Путь передачи сигнала цитокинина

Путь передачи сигнала цитокинина идет через сенсорную гистидинкиназу, подвижный низкомолекулярный белок-фосфотрансмиттер (АНР) и отдельный регулятор ответа RR (Müller, 2011). Элементы сигнального пути цитокинина Арабидопсиса кодируются небольшими семействами генов, чьи члены обычно выполняют схожие функции (Pils, Heyl, 2009). Арабидопсис имеет три цитокининовых рецептора (АНК2, АНК3 и CRE1/WOL/АНК4), которые содержат консервативный цитокинин-связывающий домен CHASE, домен гистидин-киназы, и домен связывания (Inoue et al., 2001). Рецепторы АНК играют положительные, частично избыточные, роли в ответах на цитокинин (Inoue et al., 2001). АНР являются нижестоящими мишенями рецепторов цитокинина АНК и выступают в качестве промежуточных продуктов при передаче сигнала к регуляторам ответа (RR) (Hutchison et al.,

2006). Существует пять функциональных групп АНР у арабидопсиса (АНР1-АНР5), все кроме АНР4 являются положительными и частично избыточными элементами в передаче сигнала цитокина (Hutchison et al., 2006), а АНР6 подавляет чувствительность к цитокинину (Mahonen et al., 2006). Нижестоящие мишени АНР, RR, делятся на два основных класса: RR тип-А и тип-В. Существует несколько регуляторов типа-В, которые действуют как частично избыточные, положительно регулирующие транскрипционный ответ на цитокинин (Mason et al., 2004). Регуляторы ARR тип-А участвуют в отрицательной обратной связи в ответе на цитокинин (To et al., 2004).

Как и ауксин, цитокинин это низкомолекулярное соединение и его концентрацию косвенно определяют по его активности. Искусственная репортерная конструкция TCS (Two Component signaling Sensor) состоит из зеленого флюоресцирующего белка GFP под контролем минимального промотора с повторами консервативной последовательности 5'-(A/G)GAT(C/T)-3' для связывания регуляторов ответа на цитокинин RR тип-В (Müller, Sheen, 2008). Позднее был создан более чувствительный и сбалансированный репортер TCSn::GFP, в котором под промотором были не одинаковые последовательности нуклеотидов как в TCS, а их вариации для ответа на различные RR тип-В белки (Zürcher et al., 2013). Авторы исследования Zürcher et al. (2013) сообщают, что данные по распределению активности репортера не могут быть полными пока в репортерную конструкцию не будут включены все транскрипционные факторы, вовлеченные в путь передачи сигнала цитокинина.

1.6. Взаимодействие фитогормонов при поддержании структуры АМК

Рассмотрим как именно гормоны ауксин и цитокинин действуют в апикальной меристеме корня. На рисунке 1.16 указаны различные элементы биосинтеза, метаболизма и сигнальных путей ауксина и цитокинина, а также возможные точки взаимодействия этих двух фитогормонов. Анализ точек

взаимодействия может прояснить по каким генным путям проходит регуляция структуры АМК ауксином и цитокинином.

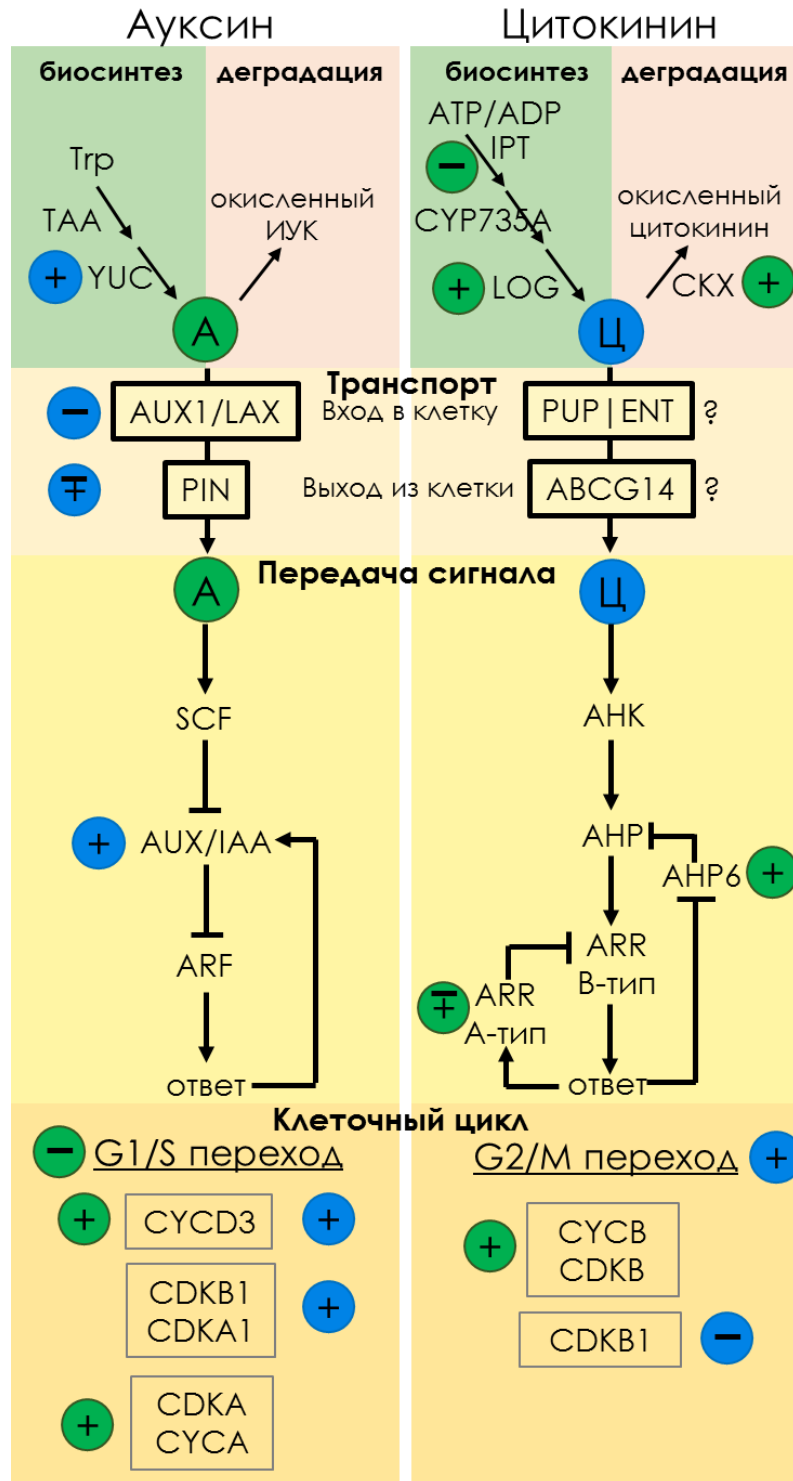


Рисунок 1.16. Ключевые элементы путей ауксина и цитокинина. Элементы путей ауксина и цитокинина, участвующие в биосинтезе, деградации, транспорте и передаче сигналов, а также участвующие в регуляции клеточного цикла. Точки активации (+) или подавления (-) гормонами для соответствующих путей обозначены зеленым (ауксин) и синим (цитокинин) кругами. А – ауксин, Ц – цитокинин. Адаптировано и дополнено из Schaller (2015).

Учитывая значимость меристемы для роста корня, не удивительно, что были обнаружены многие точки взаимодействия путей передачи сигнала ауксина и цитокинина, контролирующие размер АМК. Анализ мутантов *ARR* тип-В показывает, что уменьшение размера меристемы в ответ на обработку цитокинином находится под контролем в большей степени транскрипционных факторов *ARR1*, *ARR10* и *ARR12* и меньшей степени *ARR2* и *ARR11* (Dello Ioio et al., 2008; Moubayidin et al., 2010). Белок *SHY2* (*SHY*–*SHORT HYPOCOTYL2*) находится в центре взаимодействия путей передачи сигнала ауксина и цитокинина. В работе Miyawaki et al. (2004) авторы показали, что гены биосинтеза цитокинина *AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5*, *AtIPT7* уменьшают свою активность в корнях в ответ на обработку цитокинином в течение 4-х часов в корне, в тоже время гены *AtIPT5* и *AtIPT7* увеличивают свою экспрессию в корнях в ответ на обработку ауксином в течение 4-х часов. Дальнейшие исследования показали, что увеличение экспрессии гена *AtIPT5* в ответ на ауксин регулируется через *SHY/IAA3* сигнальный путь (Dello Ioio et al., 2008). Те же авторы продемонстрировали, что цитокинин подавляет активность *PIN* генов транспортеров ауксина через синтез белка *SHY2*, который негативно влияет на синтез цитокинина. Позднее связь между цитокинином и *SHY2* была дополнена включением позитивной регуляции *SHY2* геном *ARR12* (Moubayidin et al., 2010). В свою очередь цитокинин регулирует метаболизм ауксина через экспрессию *AXR3/IAA17* (Jones et al., 2010).

Сложная сеть взаимосвязей между фитогормонами ауксином и цитокинином, а также их опосредованным влиянием на формирование корня через клеточный цикл, побуждает исследователей обращаться к такому инструменту как математическое моделирование. Математическое моделирование позволяет изучать динамику процессов в пространстве и времени. Одним из примеров такого рода исследования можно считать работу Muraro et al. (2014). Взаимодействия путей передачи сигнала ауксина и цитокинина, описанные выше, были включены в математическую модель для проверки того, достаточно ли их для формирования и поддержания

распределения гормонов в корневой меристеме на поперечном срезе (рис. 1.17А). Однако стабильная картина наблюдалась только при начально задаваемом условии асимметрии в распределении транспортеров ауксина PIN белков. Дальнейшие исследования с помощью математического моделирования показали, что асимметрия в распределении PIN белков непосредственно определяется распределением ауксина (de Rybel et al., 2014).

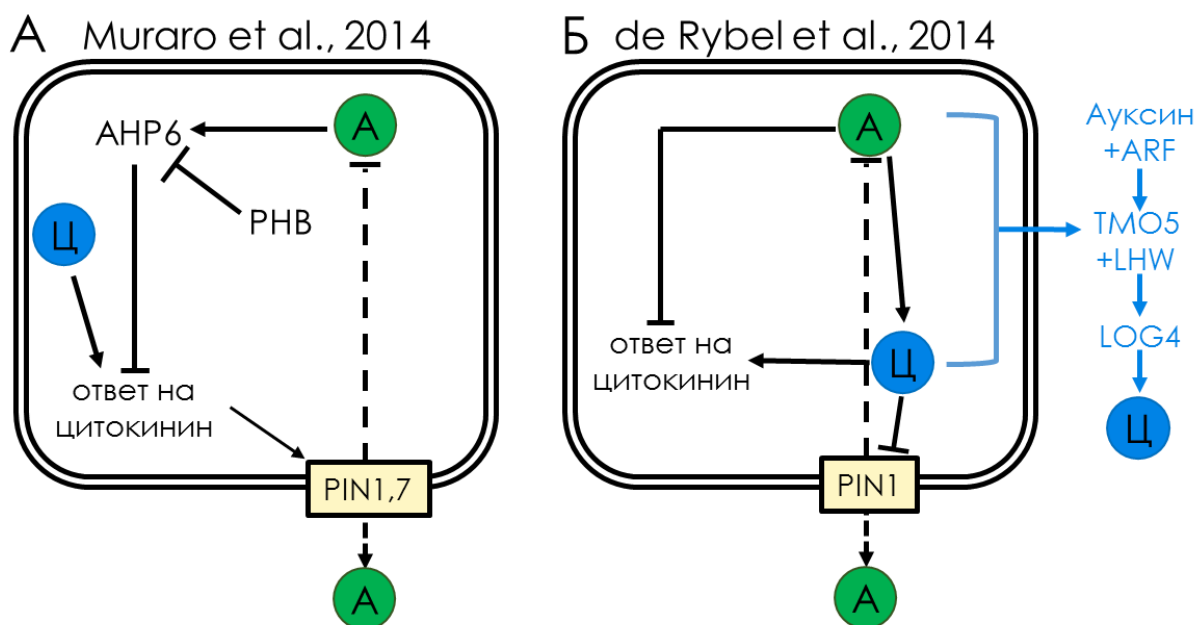


Рисунок 1.17. Моделируемые регуляторные сети формирования сосудистой ткани в работах (А) – Muraro et al., 2014; (Б) – de Rybel et al., 2014.

А – ауксин, Ц – цитокинин. Пунктирные стрелки показывают уменьшение концентрации ауксина в клетке за счет вывода ауксина из клетки с участием PIN белков. Сплошные стрелки демонстрируют моделируемое взаимодействие сигнальных путей ауксина и цитокинина. Голубыми стрелками показано, какие процессы подразумевались под активацией ауксином цитокинина.

1.7. Применение методов математического моделирования при исследовании регуляции клеточных процессов у растений

В настоящее время изучение влияния фитогормонов на морфогенез растения в целом и отдельных его органов в частности требует исследования динамики этих процессов во времени и пространстве, и математическое моделирование предоставляет широкие возможности для этого. На рис. 1.18

представлены лишь некоторые модели роста и деления клеток в меристемах растения.

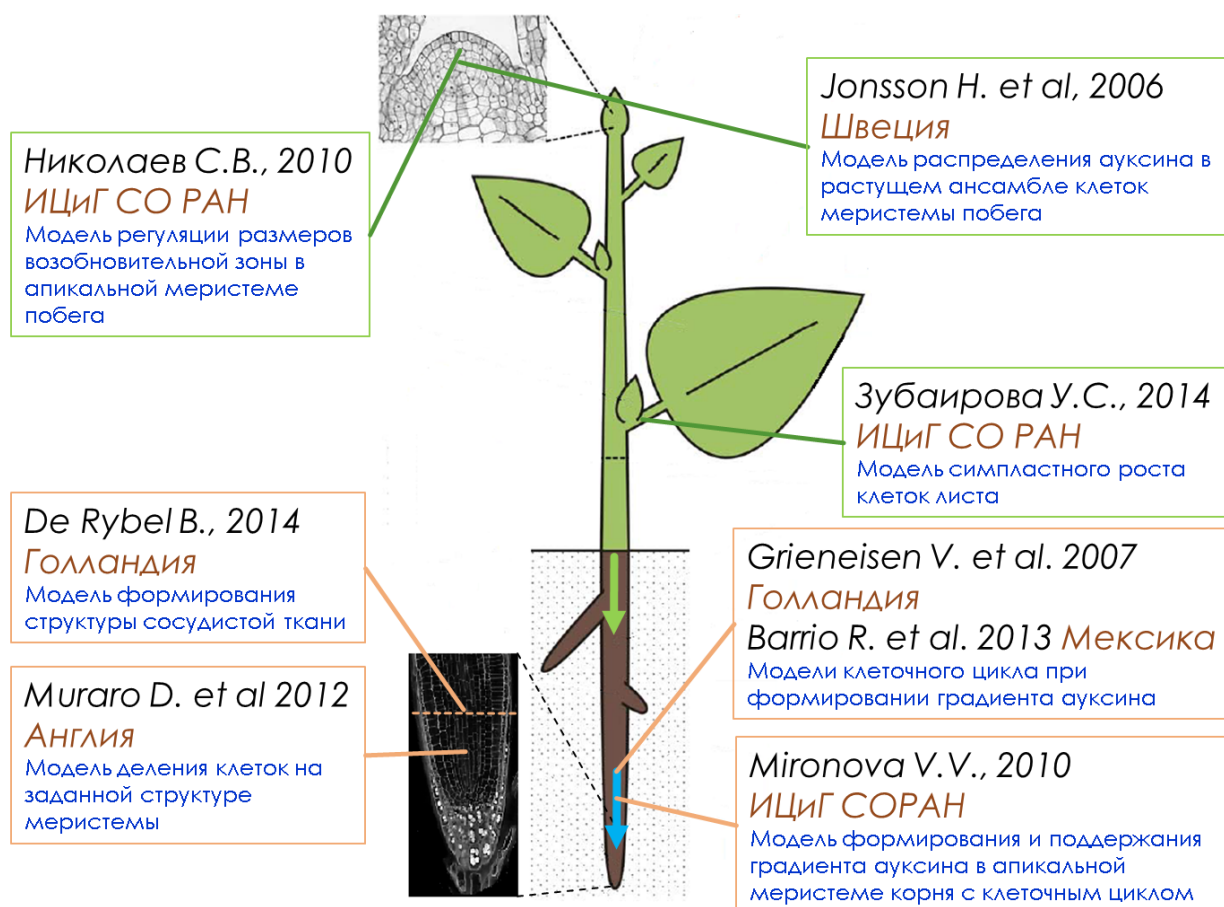


Рисунок 1.18. Некоторые математические модели меристем растений (адаптирован и дополнен из Werner, Schmulling, 2009).

На рисунке можно выделить следующие группы моделей (1) одномерные, (2) двумерные и (3) двумерные с «механическим» взаимодействием клеток. К первой группе относятся одномерные модели роста и деления клеток в зависимости от распределения сигнальных веществ в меристемах побега (Николаев и др., 2010) и корня (Mironova et al., 2010; Muraro et al., 2012). Во всех трех моделях изменения концентраций сигнальных веществ в клетках описываются дифференциальными уравнениями, а для описания клеточной динамики использовались разные формализмы, рассмотренные ниже. В работе Николаева и др. (2010) клеточная динамика была реализована с помощью формализма дифференциальных L-систем (Prusinkiewicz et al., 1993). Суть данного метода состоит в том, что

система, состоящая из различных подсистем, представляется в виде цепочки символов. Развитие системы заключается в дискретном изменении ее структуры: либо изменяется тип подсистемы, либо вместо одной подсистемы возникает несколько; что моделируется переписыванием строки символов по правилам, определенным в L-системе. В работе Николаева и др. (2010) подсистемой является клетка меристемы побега, а системой одномерный массив клеток вдоль центральной оси меристемы побега. В работе Mironova et al. (2010) для моделирования клеточной динамики была использована стохастическая параметризованная грамматика, реализованная в пакете Plenum для системы Mathematica (подробнее о модели см. в разделе 1.7.2). Авторы работы Muraro et al. (2012) разделили моделируемую область на зоны с заданными характеристиками, а клеточный цикл заменили вероятностью поделиться случайной клетки из зоны деления после определенного времени роста.

Ко второй группе относятся двумерные модели (1) роста и зонирования меристемы корня (Grieneisen et al., 2007) и (2) формирования структуры сосудистой системы корня на поперечном срезе (de Rybel et al., 2014). В модели Grieneisen et al. (2007) использовался формализм «Cellular Potts Model», согласно которому динамика клетки управляется через минимизацию свободной энергии конфигурации клетки (подробное описание модели дано в разделе 1.7.1). В работе de Rybel et al. (2014) взаимодействие путей передачи сигналов гормонов, описанное дифференциальными уравнениями, наложено на пространство растущих клеток при помощи программы VirtualLeaf (Merks et al., 2011).

К третьей группе относят модели, в которых учитывается механическое взаимодействие между клетками (Jonsson et al., 2006; Зубаирова и др., 2014; Barrio et al., 2013). В модели роста меристемы побега, предложенной Jonsson et al. (2006), клетка представляется в виде полусферы. Механическое межклеточное взаимодействие соседних клеток моделируется с привлечением теории упругости. Центры масс клеток считаются соединенными сжатой

пружиной, растяжение которой имитирует относительное расположение клеток во время их роста. Скорость роста клеток определяется характеристиками пружины. Клетки растут и прекращают рост при достижении определенного размера. Делятся только клетки, достигшие определенного размера, в случайном направлении и со случайным разделением по объему. Такое же правило деления клеток в заданном направлении использовано в модели симпластного роста листовой пластины в работе Зубаировой и др. (2014), реализованной в формализме склеенных одномерных дифференциальных L-систем. Во всех моделях изменение концентраций веществ и размеров клеток описаны в терминах дифференциальных уравнений. Авторы Barrio et al. (2013) заключили, что на ранних стадиях развития корня включаются в основном три связанные динамики: деление клеток, модификация «упругого поля» и распределение концентрации гормона (подробнее в разделе 1.7.3)

Связь между распределением фитогормонов в кончике корня и их ролью в регуляции роста и деления клеток интересовала исследователей давно, однако приблизиться к изучению этих вопросов удалось лишь совсем недавно, с развитием методов математического моделирования. Далее более подробно описаны по одной модели из каждой группы, в которых с помощью методов математического моделирования анализировались механизмы гормональной регуляции клеточной динамики в корне.

1.7.1. Основной регулятор роста и деления ауксин (Grieneisen et al., 2007)

В работе Grieneisen et al. (2007) основным регулятором роста и деления клеток является ауксин. В модели использовался формализм «Cellular Potts Model». Согласно этому подходу моделирования динамики клеток, каждой клетке приписывается некоторое значение индекса δ , которое задается каждой точке на границе клетки. Весь внеклеточный матрикс имеет $\delta=0$, клеткам приписываются значения от 1 до N_{cell} . Динамика клетки управляется через

минимизацию свободной энергии конфигурации клетки (форма и размер), описанной гамильтонианом:

$$\mathcal{H} = \sum_{\langle nn \rangle} \mathcal{J}_{\sigma_{ij}, \sigma'_{i'j'}} + \sum_{\sigma=1}^{N_{cells}} \lambda (\mathcal{A}_{\sigma} - \mathcal{A}_{target}(\sigma))^2.$$

Где первый член описывает локальные взаимодействиями между соседними клетками, а J – константа энергии, определенная в зависимости от значений $\delta_{i,j}$. Второй член гамильтониана учитывает размеры клетки, в которых затраты энергии клетки зависят от отклонения площади ее поверхности \mathcal{A}_{target} от некоторого среднего значения \mathcal{A}_{δ} . Значение \mathcal{A}_{target} изменяется в процессе расчета модели в зависимости от концентрации ауксина в клетке. В модель вводятся ограничения на размер клетки: (1) размер клетки должен быть больше минимального размера (параметр \mathcal{A}_{min}) и (2) клетка не растет больше определенного размера (параметр \mathcal{A}_{max}): $\mathcal{A}_{min} < \mathcal{A}_{target} < \mathcal{A}_{max}$.

Изменение конфигурации клетки описано через вероятность Больцмана:

$$p(\sigma_{i,j} \rightarrow \sigma'_{i'j'}) \begin{cases} = 1 & \text{если } \Delta\mathcal{H} \leq -Y \\ = e^{-i \frac{\Delta\mathcal{H} + Y}{kT}} & \text{если } \Delta\mathcal{H} \geq -Y \end{cases}.$$

В модели клеточный цикл состоит из двух фаз: фазы медленного роста $T1=const$ и фазы быстрого роста $T2(C)$ (рис. 1.19). Время, после которого клетка может поделиться является минимальным ($T1$), если выполнится условие для деления – высокая концентрация ауксина в клетке. В фазе $T2$ клетка растет быстрее, чем в фазе $T1$, и время нахождения клетки в фазе $T2$ пропорционально логарифму отношения концентрации ауксина в клетке к пороговому значению:

$$T2(C) = \max(\alpha * \ln \frac{C}{C_{min}}, 0), \quad \text{где } C_{min} \text{ – пороговое значение}$$

концентрации ауксина.

После времени $T1 + T2(C)$ клетка может поделиться снова. Таким образом, клетка поделится быстрее, пройдя только $T1$ фазу, если будет

сохранять уровень ауксина выше порогового. Следует отметить, что описанный механизм регуляции клеточного цикла не распространяется на клетки колумеллы и покоящийся центр. Устойчивый градиент ауксина, связанный с максимумом, в сочетании с разными ролями ауксина в клеточном делении и росте, способны объяснить формирование, поддержание и рост зон меристемы и растяжения. В результате моделирования показано, что активный транспорт и диффузия могут полностью определять стабильный максимум ауксина и его градиенты. Стоит также уточнить, что в модели жёстко задана структура перераспределения ауксина, что не позволяет моделировать морфогенез сам по себе.

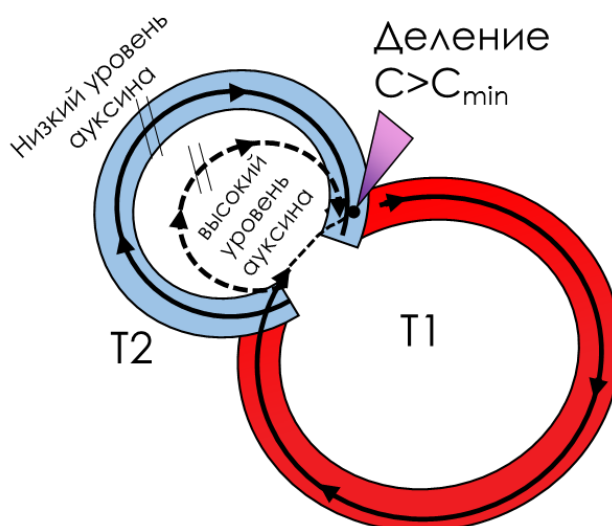


Рисунок 1.19. Модель ауксин зависимой регуляции клеточного цикла (адаптировано из Grieneisen et al. (2007)).

1.7.2. Ауксин и Фактор деления – регуляторы клеточного цикла (Mironova et al., 2010)

В работе Mironova et al. (2010) рассматривается одномерная модель, где ансамбль клеток расположен вдоль центральной оси корня. Самая дистальная клетка, находящаяся на кончике корня, имеет номер 1. В соответствии с анатомией корня *A.thaliana* (Dolan et al., 1993), такой ряд клеток начинается с 3-5 клеток корневого чехлика (слущивающиеся клетки не учитываются). Следующая стволовая клетка корневого чехлика, затем ПЦ, стволовая клетка

сосудистой ткани, ее дочерние клетки и, наконец дифференцирующиеся клетки сосудистой ткани (рис. 1.20А). Последняя клетка в ансамбле (клетка с номером N) находится в переходной зоне от корня к побегу. В модели рассматривается акропетальный поток ауксина из клетки N по направлению к клетке 1, который регулируется PIN1 белком.

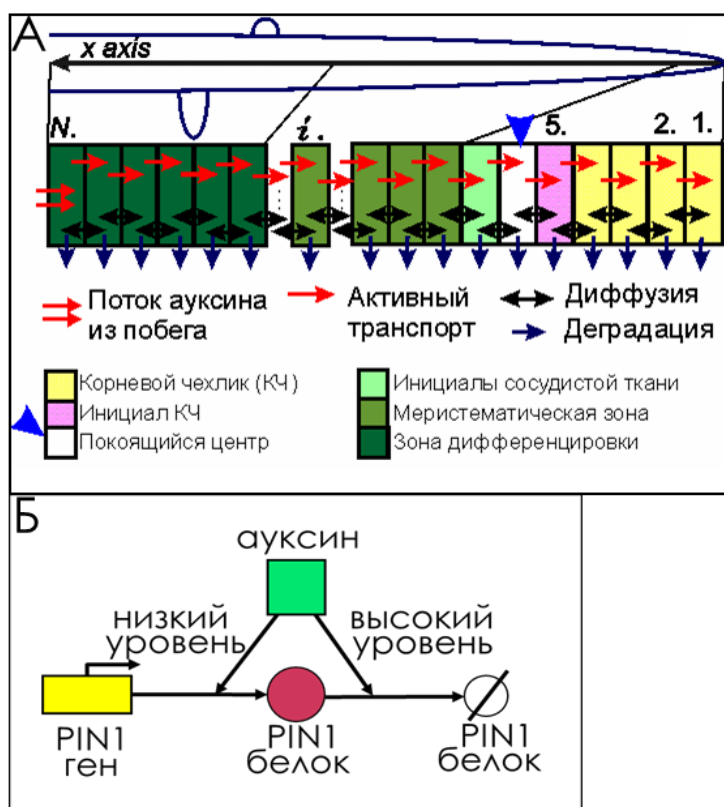


Рисунок 1.20. А. Структура кончика корня *A.thaliana* вдоль центральной оси корня и его представление в одномерной модели. Стрелками указаны используемые в модели процессы, влияющие на распределение ауксина. Б. Влияние ауксина на синтез и деградацию белка PIN1 (адаптировано из Mironova et al. (2010)).

Постоянный поток ауксина из побега описан линейно для N -ой клетки, межклеточные промежутки в модели игнорируются. Концентрация ауксина в каждой из N клеток рассчитывается в соответствии со следующими процессами: (i) ауксин перемещается между клетками диффузией (пассивный транспорт); (ii) Синтез PIN1 активируется при низких концентрациях ауксина, а деградация белка при высоких (рис. 1.20Б). Однонаправленный активный транспорт ауксина линейно зависит от концентрации PIN1 белка в клетке. (iii) Особое граничное условие определено для первой клетки: ауксин выходит из

клетки только диффузией и только во вторую клетку. (iv) Необратимый вывод ауксина из системы описывается линейной диссипацией, которая объединяет процессы конъюгации, окисления и транспорта перпендикулярно продольной оси корня. Изменение концентрации ауксина в клетках описано следующей системой уравнений (1.1):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da_1}{dt} = D(a_2 - a_1) + K_o a_2 PIN_1 - K_d a_1 \\ \frac{dPIN_1}{dt} = k_1 \left(\frac{a_1}{q_1} \right)^{h_1} / \left(1 + \left(\frac{a_1}{q_1} \right)^{h_1} \right) - k_2 PIN_1 \left(1 + \left(\frac{a_1}{q_3} \right)^{h_2} \right) \\ \dots \\ \frac{da_i}{dt} = D(a_{i+1} + a_{i-1} - 2a_i) + K_o (a_{i+1} PIN_{i+1} - a_i PIN_i) - K_d a_i \\ \frac{dPIN_i}{dt} = K_1 \left(\frac{a_i}{q_1} \right)^{h_1} / \left(1 + \left(\frac{a_i}{q_2} \right)^{h_1} \right) - k_2 PIN_i \left(1 + \left(\frac{a_i}{q_3} \right)^{h_2} \right) \\ \dots \\ \frac{da_N}{dt} = \alpha + D(a_{N-1} - a_N) - K_d a_N - K_o a_N PIN_N \\ \frac{dPIN_N}{dt} = k_1 \left(\frac{a_N}{q_1} \right)^{h_1} / \left(1 + \left(\frac{a_N}{q_2} \right)^{h_1} \right) - k_2 PIN_N \left(1 + \left(\frac{a_N}{q_3} \right)^{h_2} \right) \end{array} \right. , \quad (1.1)$$

где N - клетка, ближайшая к побегу (число клеток в ансамбле равно N). a_i и PIN_i – концентрации ауксина и PIN1 в клетке i . α поток ауксина из побега, описан для N -ой клетки; K_d и D коэффициенты диссипации и диффузии, соответственно. K_o константа скорости активного транспорта, регулируемого PIN1 белками. Активация и подавление экспрессии PIN1 ауксином описана функциями Хилла с коэффициентами синтеза и деградации k_1 и k_2 , с q_1 порогом активации синтеза q_1 , порогом насыщения активации синтеза q_2 и порогом активации деградации PIN1 белка q_3 , а h_1 и h_2 коэффициенты нелинейности механизмов активации синтеза и деградации PIN1, соответственно.

В работе Mironova et al. (2010) регуляция клеточного цикла гормонами исследована более подробно в сравнении с работой Grineisen et al. (2007), для

этого наряду с ауксином рассмотрено влияние дополнительного морфогена – фактора деления (Division Factor). Клеточный цикл был представлен последовательными фазами роста и ожидания перед делением. Время прохождения фаз – это случайные величины с функциями плотности вероятности, зависящими от функций f_{GP} и f_{IP} . Функция f_{GP} зависит от линейного размера клетки (r) и растет во времени:

$$f_{GP}(r) = \frac{1}{1 + \exp(-10^2(r - r_{\min}))}. \quad (1.2)$$

В то время как функция f_{IP} представлена функцией Хилла и зависит от концентрации фактора деления:

$$f_{IP}(DivF) = \frac{\left(\frac{DivF}{k_{div,1}}\right)^{h_{div,1}}}{1 + \left(\frac{DivF}{k_{div,2}}\right)^{h_{div,2}}}. \quad (1.3)$$

Авторы предположили, что скорость деления клетки нелинейно зависит от концентрации фактора деления в ней: скорость низкая (или нулевая) появляется при недостатке или избытке фактора деления, а высокая – при средних значениях концентрации фактора деления. Фактор деления, синтезируясь с постоянной скоростью в клетках ПЦ, и, деградируя в каждой клетке в зависимости от концентрации ауксина, распространяется по ткани диффузией со скоростью, превышающей скорость диффузии ауксина (рис. 1.21). Несмотря на то, что авторам удалось промоделировать митотическую активность в кончике корня, данная модель требует развития для приближения к реальным гормонам растения.

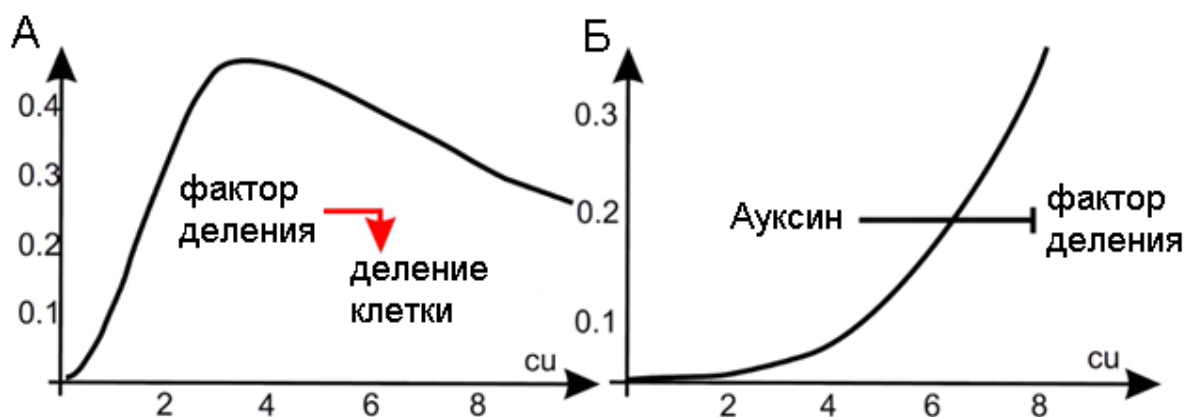


Рисунок 1.21. А. Функция, с которой Y регулирует скорость деления клетки. Б. Скорость деградации фактора деления в зависимости от концентрации ауксина (адаптировано из Mironova et al. (2010)).

1.7.3. Циклины основные регуляторы клеточного цикла (Barrio et al., 2013)

В работе Barrio et al. (2013) определяющими регуляторами клеточного цикла в меристеме корня представлены циклины групп D, B и A (CYCD, CYCA и CYCB), колебания концентраций которых определяют переходы между фазами клеточного цикла: G1/S и G2/M. Упрощенный клеточный цикл состоит из 4-х фаз: G1, S, G2, M. Концентрацией ауксина в клетке определяется время прохождения всего клеточного цикла до деления. Авторы выбрали модель Лотки–Вольтерры для описания осцилляций в клетке CYCD (u) и CYCB (v) в зависимости от концентрации ауксина (рис. 1.22, система уравнений (1.4)). CYCB в этой модели представляет собой объединение функций CYCA и CYCB.

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial \tau} &= u(1 - v) \\ \frac{\partial v}{\partial \tau} &= \beta v(u - 1), \end{aligned} \quad (1.4)$$

Эта система реализует колебательное поведение, если β находится внутри определенного диапазона, период (T) и форма волны зависят только от β и граничных условий. Нетрудно показать, что период T равен:

$$T = \frac{2\pi}{\sqrt{\beta}}, \quad (1.5)$$

который обратно пропорционален квадратному корню из линейного темпа роста «жертвы» (u) до уровня смертности «хищника» (v).

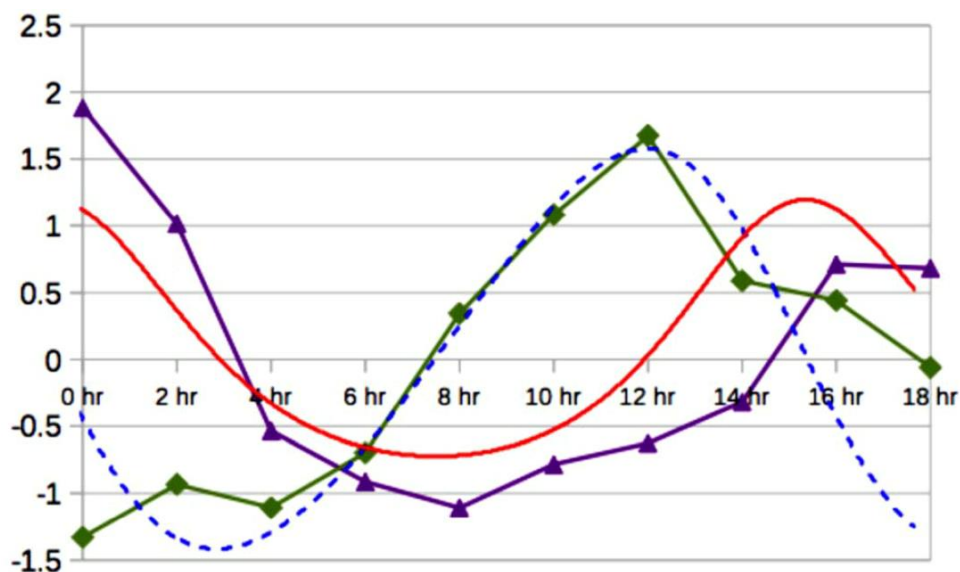


Рисунок 1.22. Изменения концентраций двух типов циклиновых групп и типичные осцилляции из модели Лотки–Вольтерры. Относительные данные экспрессии циклинов группы D (фиолетовый цвет) и группы B (зеленый цвет). Голубая и красная линии соответствуют ингибитору и активатору в модели Лотки–Вольтерры (рисунок взят из Barrio et al. (2013)).

Авторы предположили, что концентрация ауксина линейно связана с единственным параметром этой динамической системы: $\beta = \gamma \cdot c(i)$, где $c(i)$ – концентрация ауксина в i клетке. Следовательно, каждая клетка имеет свои отдельные часы, которые запускаются быстрее или медленнее в зависимости от концентрации ауксина в рассматриваемой модели. Клетка делится, когда $t = \delta \cdot (n\Delta t - T_i / \tau)$, где функция δ равна 1, когда число итераций равно $n\Delta t$, используемых в интегрировании Эйлера, превышает период. Следовательно, γ – другая константа, которая связывает временную шкалу воспроизведения (τ) с временным шагом, который используется для динамики релаксации.

Таким образом, авторы предположили, что период клеточного цикла обратно пропорционален концентрации ауксина в клетке, т.е. чем выше концентрация, тем реже клетка будет делиться. И в численном моделировании показали, что их модель адекватно описывает пролиферационную активность в меристеме корня *A. thaliana*.

1.8. Заключение по обзору литературы

Меристема корня является удобным объектом для исследования механизмов функционирования ниши стволовых клеток. Ввиду геометрически просто устроенной ниши стволовых клеток, в клеточных рядах меристемы легко прослеживаются все стадии дифференцировки клетки от плюрипотентной до специализированной. Вопрос о механизме поддержания плюрипотентных клеток ПЦ меристемы корня успешно и давно исследуется в целом ряде работ российских и зарубежных ученых. Меньше внимания было уделено исследованию поддержания количества транзитно-амплифицирующихся клеток, которые составляют большую часть меристемы. Остается непонятным, что ограничивает количество делений этих клеток? В зависимости от какого сигнала из двух дочерних клеток, одна продолжает делиться, а вторая приступает к дифференцировке? Как в меристеме происходит поддержание баланса между количеством делящихся и специализирующихся клеток?

Выявление механизмов, лежащих в основе морфогенетических процессов – это «обратные задачи» биологии развития. В отличие от «прямой задачи», исследователю известны и начальное и конечное состояния системы, но необходимо определить совокупность правил и условий, которые позволили ей прийти из одного состояния в другое. Для исследования регуляции клеточного цикла в меристеме корня также следует решать «обратную задачу»: из многообразия разнородных данных об активности разнообразных регуляторов в корне, выбрать наиболее важные и выяснить внутренние причинно-следственные связи между этими данными и профилем пролиферационной активности в меристеме.

Важную роль в регуляции пространственно-распределенных процессов играют морфогены, которые неравномерно распределены в ткани и в зависимости от концентрации по-разному влияют на клеточную динамику. У растений ключевыми морфогенами, регулирующими нишу стволовых клеток в корне, являются фитогормоны ауксин и цитокинин. Известно, что оба

гормона участвуют в регуляции основных контрольных точек клеточного цикла (G1/S и G2/M), но есть данные как о позитивной регуляции гормонами этих переходов, так и об возможности ингибирования переходов к S и M фазам. Сопоставление экспериментальных данных о распределении фитогормонов, о их роли в регуляции пролиферации и о пролиферационной активности в кончике корня может помочь выявить ключевые регуляторные механизмы, обеспечивающие прохождение клеточного цикла в делящихся клетках и выход из цикла по мере их дифференцировки.

Математическое моделирование предоставляет возможности для решения этой задачи, путем выявления минимальных регуляторных контуров, при которых полностью воспроизводятся основные характеристики системы и ее динамики. Однако существующие модели либо недостаточно корректно описывали контроль клеточного цикла (Grieneisen et al., 2007; Barrio et al., 2013), либо учитывают гипотетические регуляторы (Mironova et al., 2010). В связи с этим актуальной является задача развития математической модели для исследования контроля клеточного цикла фитогормонами ауксином и цитокинином. Целью данной работы было не только формализация экспериментальных данных в математических моделях, но и генерация тестируемых в экспериментах гипотез и их последующая проверка.

ГЛАВА 2. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ СТРУКТУРЫ АМК

Предпосылками для создания настоящей модели были эксперименты Делла Йоо показавшие, что после обработки низкими концентрациями экзогенного ауксина (0,1нМ ИУК, 24ч) размер меристемы корня увеличивается, а после обработки высокими концентрациями цитокинина (0,1μМ транс-зеатина, 24ч) уменьшается (Dello Ioio et al., 2007; Dello Ioio et al., 2008) (рис. 1.10). Известно, что в кончике корня оба фитогормона имеют неравномерное распределение (см разделы 1.4, 1.5, рис. 1.12, 1.14). Ауксин и цитокинин оказывают существенное влияние на прохождение всех этапов клеточного цикла в растении (рис. 1.6, рис. 1.16). Однако, остается неизвестным, какие из этих регуляторных воздействий являются ключевыми в меристеме корня, и как они реализуются в градиентах распределения ауксина и цитокинина в кончике корня. В данной главе мы попытаемся ответить на эти вопросы с использованием методов математического моделирования.

2.1. Решение обратной задачи: поиск минимального регуляторного контура

Мы выдвинули гипотезу, что границы меристемы, регулируются в соответствие с распределением концентраций ауксина и цитокинина в ткани и их концентрационно-зависимым влиянием на клеточный цикл. Для проверки этой гипотезы мы сформулировали «обратную задачу», построили на ее основе логическую модель и провели ее анализ.

Формулировка «обратной задачи».

Необходимо подобрать минимальный регуляторный контур контроля клеточного цикла растения фитогормонами ауксином и цитокинином, при котором может формироваться и поддерживаться пролиферационный домен меристемы корня в градиентах концентрации этих фитогормонов.

Для решения «обратной задачи» необходимо было на первом этапе снизить сложность исследуемой системы, убрав из рассмотрения некоторые детали исследуемого процесса и приняв ряд допущений.

Допущение 1. Концентрации ауксина и цитокинина усреднены для трех зон в кончике корня.

Распределения концентрации ауксин и цитокинина в кончике корня имеют сложные профили, существуют тканеспецифичные особенности синтеза, транспорта и передачи сигнала этих фитогормонов (Schaller et al., 2015). Информации об эндогенных концентрациях фитогормонов в клетках меристемы корня нет, есть только относительные данные (рис. 1.12, 1.14), поэтому мы будем использовать бинарную классификацию: низкие и высокие концентрации. В этом случае, в кончике корня можно выделить три зоны, для которых характерны в среднем низкие или высокие концентрации двух фитогормонов (рис. 2.1А). В колумелле и ПЦ (область «1»), концентрации обоих гормонов относительно высокие. В пролиферационном домене меристемы (область «2»), концентрации обоих гормонов низкие. В транзитном домене меристемы (область «3»), концентрация ауксина остается низкой, а концентрация цитокинина повышена.

Допущение 2. Низкие и высокие концентрации ауксина и цитокинина имеют противоположное действие.

Известно, что и ауксин, и цитокинин необходимы для прохождения клеточного цикла, однако их высокие концентрации препятствуют делению клетки (Campanoni, Nick, 2005; Dello Ioio et al. 2007). На первом этапе мы будем считать, что разные концентрации имеют противоположный эффект на тот или иной этап клеточного цикла. Например, что низкая концентрация активирует прохождение фазы клеточного цикла, а высокая ингибирует его, и наоборот. Далее будут рассмотрены более сложные варианты регуляции.

Допущение 3. Рассмотрена регуляция только G1/S и G2/M переходов.

Мы рассмотрели упрощенную схему клеточного цикла, состоящего из двух фаз G1 и G2 и двух контрольных точек G1/S и G2/M (рис. 2.1Б). Клетка, начав репликацию ДНК, или митоз, не останавливается на полпути, поэтому мы не рассматриваем в данной работе регуляцию этих процессов. Регуляция остальных чекпойнтов клеточного цикла считается включенной в G1/S или G2/M переходы. Известно, что ауксин и цитокинин оказывают влияние на прохождение G1/S и G2/M переходов (рис. 1.6). Кроме того, именно на переходе G1/S у растений наблюдается выход из митотического клеточного цикла в эндоцикл в транзитном домене, т.е. деления прекращаются (Adachi et al., 2011).

Допущение 4. Упрощенные профили пролиферационной активности

Клетки разных тканей делятся с различной интенсивностью, однако, как и в случае с распределением фитогормонов (рис. 2.1А), мы можем пренебречь некоторыми деталями при рассмотрении одномерной модели. Но нужно учитывать, что клетки колумеллы (область «1») преимущественно находятся в G1 фазе. Клетки пролиферационного домена (область «2») активно делятся, поэтому могут находиться как в G1, так и G2 фазе. В транзитном домене клетки (область «3») все еще способны перейти G1/S контрольную точку, но не способны к делению и находятся в G2 фазе (Hayashi et al., 2013).

2.1.1. Логическая модель минимального регуляторного контура клеточного цикла под контролем ауксина и цитокинина.

С учетом принятых допущений (1)-(4), начальными данными для решения «обратной задачи» были упрощенные распределения концентраций ауксина и цитокинина вдоль кончика корня (рис. 2.1А). Конечные данные –

это экспериментально-наблюдаемые профили митотической активности клеток (рис. 2.1А). Мы рассмотрели варианты регуляции фитогормонами ключевых переходов в клеточном цикле (рис. 2.1Б), так чтобы в градиентах распределения концентрации фитогормонов сформировались экспериментально-наблюдаемые профили митотической активности клеток.

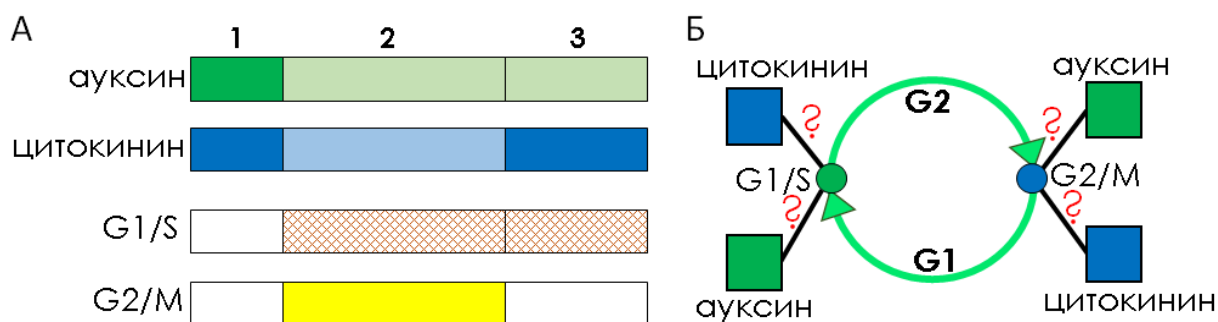


Рисунок 2.1. Логическая модель для поиска минимального регуляторного контура контроля клеточного цикла в меристеме корня. А. Начальные и конечные данные для решения обратной задачи. Начальные данные: распределения концентраций ауксина и цитокинина (интенсивность цвета соответствует пониженной или повышенной концентрации). Выходные данные: профили распределения событий репликации ДНК (G1/S) и митозов (G2/M), согласно экспериментальным данным. Область «1» – колумелла; область «2» – пролиферационный домен; область «3» – транзитный домен меристемы. Б. Возможные варианты (?) регуляции переходов G1/S и G2/M фитогормонами ауксином и цитокинином

Итого с учетом допущений (1)-(4) мы получили 8 комбинаторных вариантов регуляции клеточного цикла фитогормонами ауксином и цитокинином (рис. 2.2А). Например, во втором варианте для прохождения клеткой контрольной точки G1/S лимитирующим фактором является низкие концентрации ауксина, а для прохождения перехода G2/M нужна высокая концентрация цитокинина. Логические правила для альтернативных вариантов описаны ниже:

$$(1) \begin{cases} \text{если } a \in H, \text{ то } G1 \rightarrow G2 \\ \text{если } c \in H, \text{ то } G2 \rightarrow G1 \end{cases}$$

$$(2) \begin{cases} \text{если } a \in H, \text{ то } G1 \rightarrow G2 \\ \text{если } c \in B, \text{ то } G2 \rightarrow G1 \end{cases}$$

$$(3) \begin{cases} \text{если } a \in B, \text{ то } G1 \rightarrow G2 \\ \text{если } c \in B, \text{ то } G2 \rightarrow G1 \end{cases}$$

$$(4) \begin{cases} \text{если } a \in B, \text{ то } G1 \rightarrow G2 \\ \text{если } c \in H, \text{ то } G2 \rightarrow G1 \end{cases}$$

$$(5) \begin{cases} \text{если } c \in H, \text{ то } G1 \rightarrow G2 \\ \text{если } a \in H, \text{ то } G2 \rightarrow G1 \end{cases}$$

$$(6) \begin{cases} \text{если } c \in H, \text{ то } G1 \rightarrow G2 \\ \text{если } a \in B, \text{ то } G2 \rightarrow G1 \end{cases}$$

$$(7) \begin{cases} \text{если } c \in B, \text{ то } G1 \rightarrow G2 \\ \text{если } a \in B, \text{ то } G2 \rightarrow G1 \end{cases}$$

$$(8) \begin{cases} \text{если } c \in B, \text{ то } G1 \rightarrow G2 \\ \text{если } a \in H, \text{ то } G2 \rightarrow G1 \end{cases}$$

Где a – концентрация ауксина, c – концентрация цитокинина, H – относительно низкие концентрации гормонов, а B – относительно высокие концентрации гормонов.

Объединяя данные о распределении фитогормонов (рис. 2.2Б) и варианты об их регуляции переходов $G1/S$ и $G2/M$, мы вывели логически в каких зонах кончика корня (согласно рис. 2.1А) клетки будут делиться, а в каких нет (рис. 2.2В). В результате, 2 из 8 вариантов позволили локализовать зону с делящимися клетками правильно: варианты 1 и 5 на рисунке 2.2В, в зоне «2», соответствующей пролиферационному домену. При реализации других вариантов регуляторного контура деления клеток будут происходить в областях, не соответствующих пролиферационному домену.

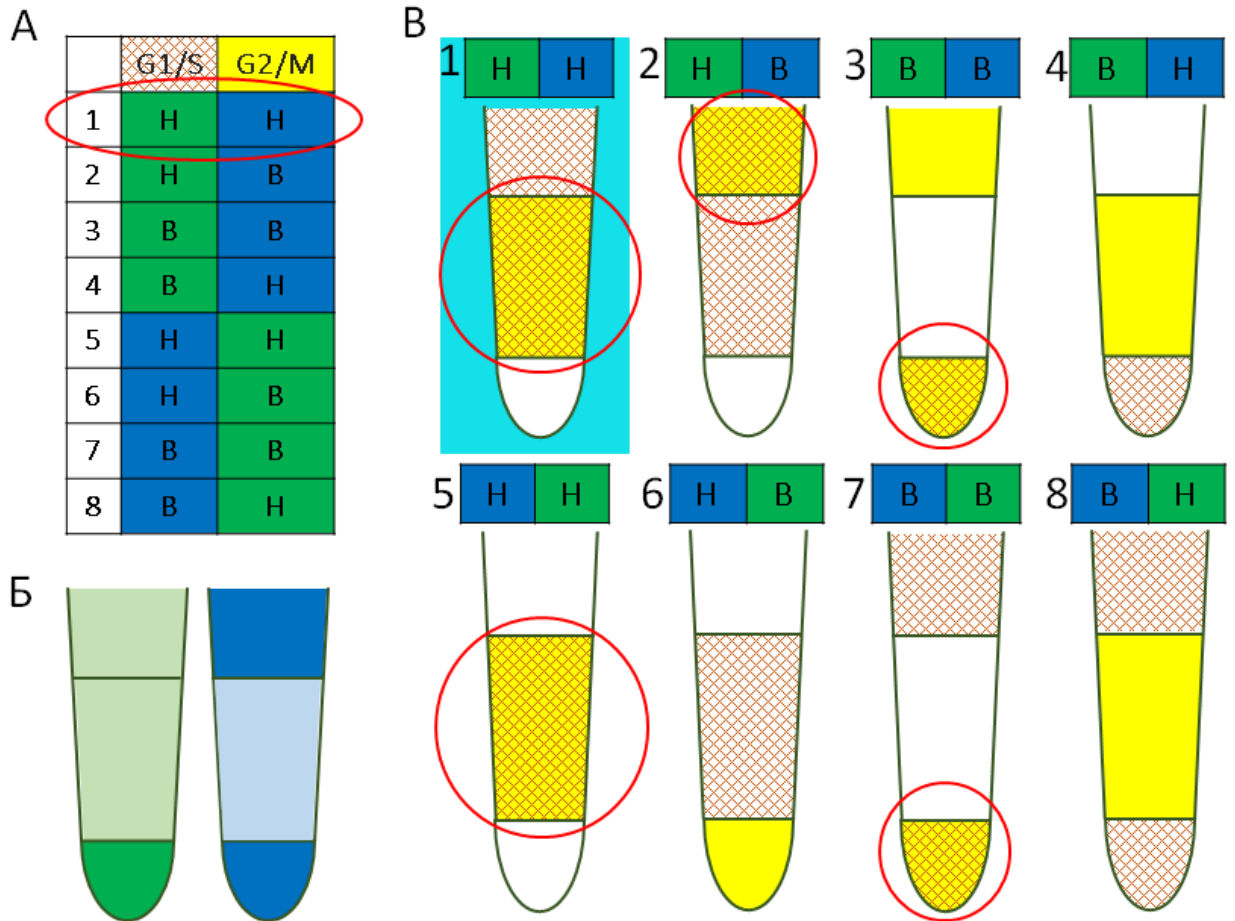


Рисунок 2.2. Анализ логической модели поиска минимального регуляторного контура контроля клеточного цикла. А. Варианты регуляции фитогормонами ключевых переходов в клеточном цикле. Н – низкая концентрация гормона, В – высокая концентрация гормона, зеленый цвет заливки ячейки – ауксин, синий цвет заливки ячейки – цитокинин. Б. Распределение концентраций фитогормонов ауксина (зеленый) и цитокинина (синий) в кончике корня (бинарная классификация, схематично). В. Решения логической модели (рис. 2.1.) с учетом разных вариантов регуляторного контура (рис. 2.2А). На схемах кончиков корней, где возможны G1/S и G2/M переходы, закрашены коричневой штриховкой и желтым цветом соответственно. Красным кругом обозначены зоны корня, в которых клетки будут делиться.

Из двух подходящих вариантов регуляции мы также отбросили вариант №5, так как он противоречит данным об эндоредупликации после окончания делений в пролиферационном домене (Hayashi et al., 2013). При реализации этого регуляторного контура клетки транзитного домена не будут способны осуществлять переход G1/S (Рис. 2.2В). Таким образом, из восьми комбинаторных вариантов регуляции контрольных точек клеточного цикла

только вариант «1» удовлетворяет показанным ранее экспериментальным фактам (рис. 2.3).

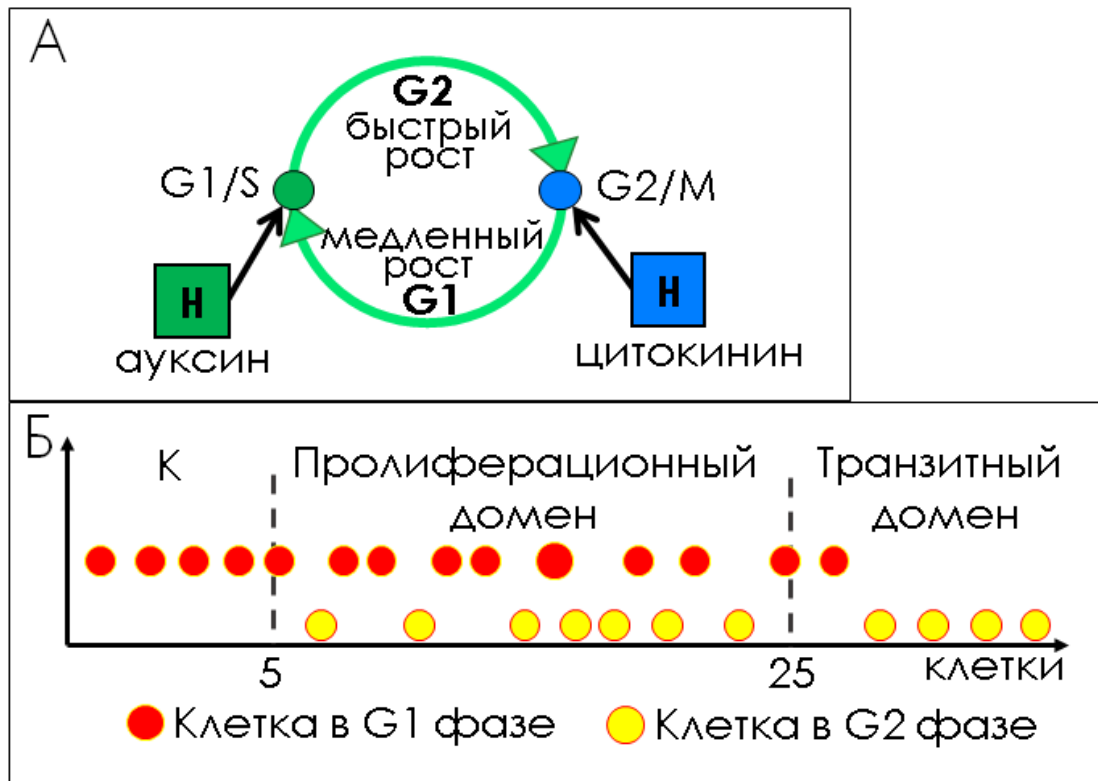


Рисунок 2.3. Решение обратной задачи в логической модели регуляции клеточного цикла фитогормонами. А. Минимальный регуляторный контур клеточного цикла, удовлетворяющий всем условиям логической модели (рис. 2.1), вариант «1» из рис. 2.2А. Б. Схематичное распределение клеток по фазам клеточного цикла.

2.1.2. Перебор более сложных вариантов регуляторного контура

После анализа простых вариантов регуляции клеточного цикла гормонами мы рассмотрели более сложные (рис. 2.4). Так, мы выделили случаи, когда одни из переходов регулируется нулевой концентрацией одного из фитогормонов (“0”), когда переход не регулируется никаким из фитогормонов (-), и, когда присутствует регуляция сразу двумя фитогормонами одного или двух переходов.

Проведя для всех возможных вариантов регуляции клеточного цикла такой же логический анализ, как и в предыдущем разделе, мы заключили, что только один вариант из 64 удовлетворяет всем экспериментальным данным

(обведен красным овалом на рис. 2.4). Это вариант, в котором переход G1/S разрешен при низких концентрациях только ауксина, а G2/M разрешен при низких концентрациях обоих гормонов. Этот вариант является частным случаем предыдущего решения обратной задачи (рис. 2.3). Он подразумевает, что ауксин может оказывать контроль обоих переходов в зависимости от концентрации.

G1/S	G2/M	G1/S	G2/M	G1/S	G2/M	G1/S	G2/M
О	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н
О	В	Н	В	В	Н	Н	Н
Н	О	В	Н	В	В	Н	В
В	О	В	В	Н	В	В	В
О	Н	В	Н	Н	В	Н	Н
О	В	Н	Н	В	Н	Н	Н
Н	О	Н	В	В	Н	В	В
В	О	В	В	Н	В	В	В
-	Н	Н	Н	В	Н	Н	Н
-	В	Н	В	Н	Н	В	Н
Н	-	В	Н	Н	В	Н	В
В	-	В	В	В	В	В	В
-	Н	В	Н	В	В	Н	Н
-	В	Н	Н	Н	Н	В	Н
Н	-	Н	В	Н	Н	В	В
В	-	В	В	В	В	В	В

Рисунок 2.4. Различные варианты регуляции контрольных точек клеточного цикла гормонами ауксином и цитокинином. Н – низкая концентрация гормона, В – высокая концентрация гормона, зеленый цвет заливки ячейки – ауксин, синий цвет заливки ячейки – цитокинин. Красным овалом обозначен вариант удовлетворяющий всем экспериментальным данным, при решении логической модели контроля клеточного цикла (рис. 2.1).

При решении обратной задачи в ряде случаев невозможно избежать множественности вариантов ответов. Задача исследователя при моделировании выделить пространство тех гипотез, которые будут проверены. Оба найденных варианта решения обратной задачи с учетом сделанных допущений разрешают G1/S переход при низкой концентрации ауксина. В обоих случаях G2/M переход разрешен только при низких концентрациях цитокинина, но в более сложном варианте необходимо также

поддержание низких концентраций ауксина. Поскольку при поиске решения мы искали минимальный регуляторный контур, то мы выбрали первый вариант (рис. 2.3А), когда каждый из переходов регулируется только одним фитогормоном. Для проверки достаточности и непротиворечивости этой гипотезы мы использовали методы математического моделирования, рассмотренные в разделах 2.2-2.4.

2.2. Модели формирования распределения концентраций ауксина и цитокинина.

Согласно решению «обратной задачи» в логической модели (рис. 2.3) специфического распределения растительных гормонов в меристеме корня должно быть достаточно для формирования трех зон с принципиально отличающейся клеточной динамикой. Для проверки этой гипотезы необходимо было сначала исследовать механизмы формирования распределения фитогормонов (рис. 2.5) и их поддержания в динамике.

Ранее в ИЦиГ СО РАН, под руководством д.б.н. Виталия Александровича Лихошвая была создана модель самоорганизации распределения ауксина вдоль продольной оси корня по механизму отраженной волны (рис. 1.19, Mironova et al., 2010), в которой максимум концентрации ауксина формировался и поддерживался в клетке, соответствующей ПЦ (подробно описана в разделе 1.7.2). Эта модель была взята за основу данной работы и значительно доработана.

В настоящей модели рассматривается ансамбль клеток вдоль центральной оси корня (рис. 2.5), сигнальные вещества ауксин и цитокинин, белок-транспортер ауксина PIN1 распределены неравномерно вдоль клеток (рис. 2.5 Б–Г). Количество клеток в ансамбле N может меняться в течение численного расчета. В модели самая дистальная клетка, находящаяся на кончике корня, имеет номер 1, последняя клетка в ансамбле (клетка с номером N) находится в транзитном домене. Клетка с номером i имеет длину $2r_i$, где r_i

– радиус клетки, координаты центра x_i , фазу клеточного цикла G_i , концентрации активных веществ a_i , $PIN1_i$ и c_i .

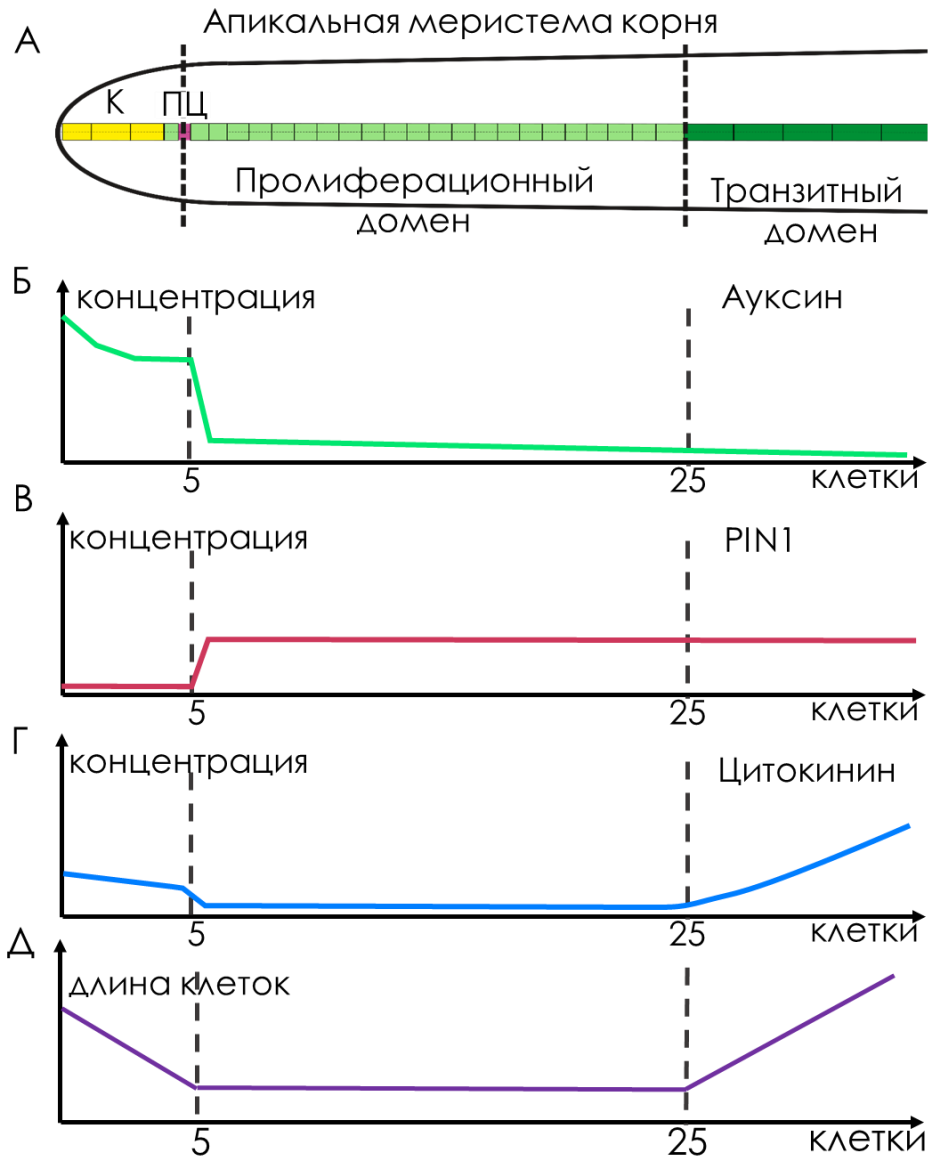


Рисунок 2.5. А. Клеточный ансамбль, рассмотренный в модели (на рисунке слева направо): К (колумелла), покоящийся центр (ПЦ), пролиферационный домен, и транзитный домен. Б. Профиль распределения ауксина в корне, реконструированный по активности ауксин-чувствительного репортера DR5 (Sabatini et al., 1999). 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). Д. Распределение размеров клеток вдоль центральной оси корня. Кончик корня слева.

2.2.1. Моделирование распределения ауксина

Для описания распределения ауксина исходная модель (Mironova et al., 2010) была изменена в части функции синтеза ауксина и правил экспрессии его белка транспортера PIN1. Как и в исходной модели, изменение концентрации ауксина мы описали процессами пассивного и активного транспорта, синтеза и деградации. Ауксин поступает из побега через сосудистую систему корня в клетку N с интенсивностью $\alpha(t)$, которая растёт линейно по времени t :

$$\alpha(t) = \alpha_0 + kt. \quad (2.1)$$

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 клетками моделируется по закону Фика с коэффициентом D_a . Скорость деградации ауксина в клетке описана линейно с коэффициентом $K_{d,a}$. Концентрация ауксина в клетке уменьшается за счет ее удлинения, что учтено функцией скорости разбавления $f_d(r_i)$:

$$f_d(r_i) = \frac{r'_i}{r_i}. \quad (2.2)$$

Где r_i – размер i клетки, r'_i – скорость прироста радиуса клетки за время dt .

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 :

$$f_t(PIN1_i) = K_{at,a} * PIN1_i. \quad (2.3)$$

В модели Mironova et al. (2010) основным источником ауксина в корне был его приток из побега, при этом с ростом количества клеток корня максимум концентрации ауксина исчезал. Этот факт позволил предположить, что существует критический размер корня, который может развиваться только за счет источника ауксина из побега. Для дальнейшего развития корня в меристеме должен иницироваться синтез ауксина *de novo*. Этот вывод соответствует экспериментальным данным Bhalerao et al. (2002): ауксин

начинает синтезироваться в корне примерно на 3-ий день после прорастания. Поэтому в настоящую модель введено дополнение – нерегулируемый синтез ауксина в каждой клетке с интенсивностью σ_0 . Система дифференциальных уравнений, описывающая изменения концентрации ауксина в клетках модели, представлена ниже:

$$\frac{da_1}{dt} = -D_a(a_1 - a_2) + \sigma_0 - K_{d,a}a_1 + f_t(PIN1_2)a_2 - f_d(r_1)a_1,$$

$$\frac{da_i}{dt} = D_a(a_{i+1} + a_{i-1} - 2a_i) + \sigma_0 - K_{d,a}a_i + f_t(PIN1_{i+1})a_{i+1} - f_t(PIN1_i)a_i - f_d(r_i)a_i, \quad (2.4)$$

$$\frac{da_N}{dt} = \alpha(t) + D_a(a_{N-1} - a_N) + \sigma_0 - K_{d,a}a_N - f_t(PIN1_N)a_N - f_d(r_N)a_N.$$

где a_i и PIN_i – концентрации ауксина и белка PIN1 в клетке i , остальные обозначения даны выше.

Транспортер ауксина PIN1. Как и в модели Mironova et al. (2010) концентрация белка PIN1 зависит от концентрации ауксина в клетке (рис. 1.19Б). Для ускорения расчетов регуляцию скоростей синтеза и деградации белка PIN1 описали кусочно-линейными функциями (рис. 2.6) вместо функций Хилла:

$$f_{s,pin1}(a_i) = \begin{cases} 0, & \text{if } a_i < T_a^{sp} \\ 1, & \text{else} \end{cases} \quad (2.5)$$

$$f_{d,pin1}(a_i) = \begin{cases} 9, & \text{if } a_i \geq T_a^{dp} \\ 0.01, & \text{else} \end{cases} \quad (2.6)$$

Итого, в i клетке рассчитывали изменения в концентрации PIN1 как:

$$\frac{dPIN1_i}{dt} = K_{s,pin1}f_{s,pin1}(a_i) - K_{d,pin1} \left(1 + f_{d,pin1}(a_i)\right) PIN1_i \quad (2.7)$$

где $K_{s,pin1}$ и $K_{d,pin1}$ – коэффициенты синтеза и деградации PIN1; $f_{s,pin1}(a_i)$ и $f_{d,pin1}(a_i)$ – кусочно-линейные функции управления скоростями синтеза и

деградации PIN1, соответственно, в зависимости от концентрации ауксина в клетке; T_a^{sp}, T_a^{dp} – пороговые значения концентрации ауксина для переключения функций $f_{s,pin1}(a_i)$ и $f_{d,pin1}(a_i)$.

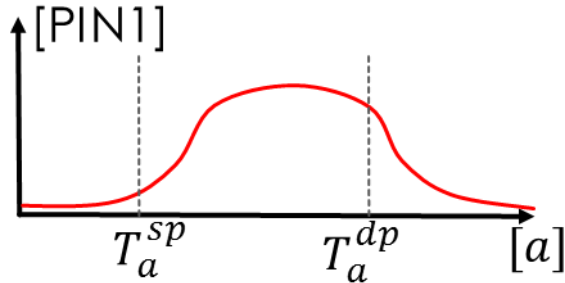


Рисунок 2.6. График зависимости концентрации PIN1 белка от концентрации ауксина в клетке.

2.2.2. Моделирование распределения цитокинина

Согласно данным о цитокинин-чувствительном репортере TCS (Zürcher et al., 2013), повышенная концентрация цитокинина наблюдается в колумелле и транзитном домене меристемы (рис. 2.5Г). Формирование градиента концентрации цитокинина в корне ранее нигде не исследовалось и в данной работе мы впервые моделировали этот процесс. Для этого были приняты следующие допущения:

1) Динамика концентрации цитокинина в клетках зависит от процессов синтеза, диффузии и деградации. Активный транспорт не рассматривается, так как согласно экспериментальным данным, если он и существует, то не вносит серьезный вклад в распределение цитокинина в корне вдоль продольной оси (Zürcher, Müller, 2016).

2) Клетки с высоким уровнем экспрессии репортера TCS (Zürcher et al., 2013) являются также клетками с повышенной концентрацией ауксина (рис. 2.5Б), и, к тому же показано, что ген синтеза *IPT5*, экспрессирующийся в колумелле (Miyawaki et al., 2004), повышает свою экспрессию в ответ на ауксин (Dello Ioio et al., 2008). Поэтому можно предположить, что высокие концентрации ауксина вызывают синтез цитокинина. В модели мы описали ауксин-чувствительный синтез цитокинина (рис. 2.7А).

3) Другим источником цитокинина в модели является поток цитокинина из побега, который идет в направлении кончика корня по флоэме (Bishopp et al., 2011).

В соответствие с экспериментальными данными, в модели рассмотрено два источника цитокинина. Во-первых, его поток в клетку N с интенсивностью $\beta(t)$, которая растет линейно по времени t :

$$\beta(t) = \beta_0 + lt, \quad (2.8)$$

где β_0 – базальный уровень интенсивности потока цитокинина, поступающего в N -ю клетку, l – константа прироста интенсивности потока цитокинина.

Во-вторых, регулируемый синтез цитокинина описан кусочно-линейной функцией $f_{s,c}(a_i)$ (рис. 2.7). При концентрации ауксина ниже пороговой (T_a^{sc}) рассматривается базальная (невысокая) скорость синтеза цитокинина, при концентрации ауксина выше T_a^{sc} увеличивается скорость синтеза цитокинина на порядок:

$$f_{s,c}(a_i) = \begin{cases} 1, & \text{if } a_i > T_a^{sc} \\ 0.01, & \text{else} \end{cases} \quad (2.9)$$

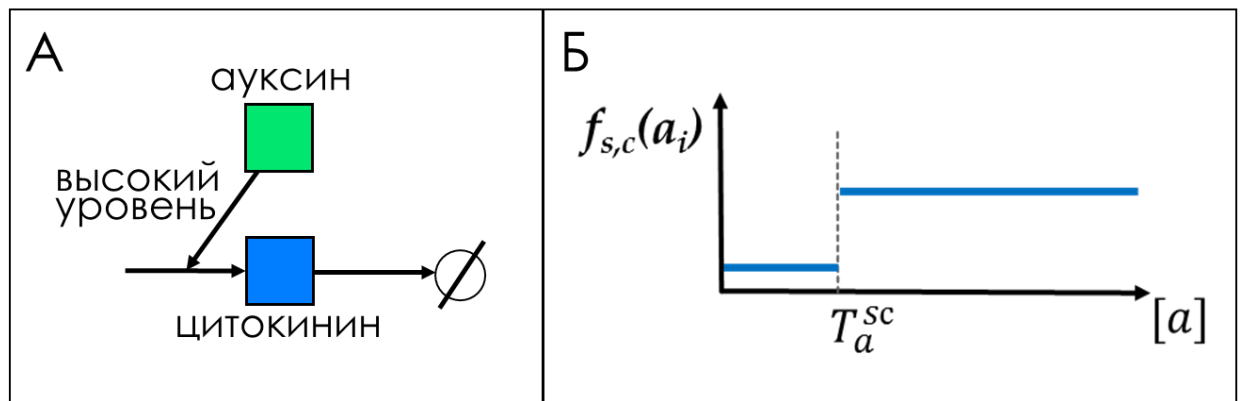


Рисунок 2.7. А. Влияние ауксина на синтез цитокинина в модели. Б. Кусочно-линейная функция синтеза цитокинина в зависимости от концентрации ауксина в клетке.

Пассивный транспорт цитокинина между клетками моделируется по закону Фика с коэффициентом D_c . Скорость деградации цитокинина в клетке описана линейной функцией с коэффициентом $K_{d,c}$. Уменьшение

концентрации цитокинина в клетке за счет её удлинения учтено с использованием функции скорости разбавления $f_d(r_i)$ (см. 2.2.1).

Итого, изменение концентрации цитокинина в клеточном ансамбле описано системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned}\frac{dc_1}{dt} &= -D_c(c_1 - c_2) + K_{s,c}f_{s,c}(a_1) - K_{d,c}c_1 - f_d(r_1)c_1 \\ \frac{dc_i}{dt} &= D_c(c_{i+1} + c_{i-1} - 2c_i) + K_{s,c}f_{s,c}(a_i) - K_{d,c}c_i - f_d(r_i)c_i \\ \frac{dc_N}{dt} &= \beta(t) + D_c(c_{N-1} - c_N) + K_{s,c}f_{s,c}(a_N) - K_{d,c}c_N - f_d(r_N)c_N\end{aligned}\quad (2.10)$$

где a_i , c_i – концентрации ауксина и цитокинина в клетке i ; r_i – размер i клетки; остальные параметры описаны выше.

2.3. Моделирование роста и деления клеток

В исходной модели (Mironova et al., 2010) скорость деления клеток зависела от гипотетического фактора деления (*DivisionFactor*). В данной работе вместо гипотетического фактора мы рассмотрели влияние гормонов ауксина и цитокинина на скорость деления, с учетом выявленного при решении обратной задачи минимального регуляторного контура (рис. 2.3А). Также, исходная модель была расширена для описания двух контрольных точек G1/S и G2/M, а не одной. Модель была построена с учетом следующих допущений:

1) Зная, что для прохождения контрольной точки G1/S, размер клетки должен быть больше минимального (Sablowski, Dornelas, 2014), мы добавили в функцию вероятности прохождения контрольной точки G1/S размер клетки r . Используя экспериментальные данные, предоставленные Тарасом Пастернаком (Университет Фрайбурга, Германия), мы оценили минимальный размер клетки в сосудистой ткани меристемы корня способной к делению $r_{min} = 6,2$ мкм.

2) Известно, что при выходе из пролиферационного домена клетки начинают расти более интенсивно (рис. 2.5Д). Чтобы учесть этот эффект в математической модели, мы описали, что в фазе G2 скорость роста клетки увеличивается относительно скорости роста клетки в фазе G1. Вне зависимости от фазы клеточного цикла, существует ограничение на предельный размер клетки (Sablowski, Dornelas, 2014), что учтено в математической модели, наложением ограничения на максимальный размер клетки. Для меристемы корня мы оценили максимальный радиус в сосудистой ткани, которого может достичь клетка как $r_{max} = 20$ мкм.

В модели время нахождения клетки в фазе G1 и G2 – τ , определяется в соответствии с функциями распределения вероятностей прохождения контрольных точек $P_{G1/S}(\tau)$ и $P_{G2/M}(\tau)$:

$$P_{G1/S}(\tau) = \rho_{GP}(r_i) * \rho_{g1/s}(a_i) * \exp(-\rho_{GP}(r_i) * c_{g1/s}(a_i) * \tau) \quad (2.11)$$

$$P_{G2/M}(\tau) = \rho_{g2/m}(c_i) * P(x_1, x_2|x) * \exp(-\rho_{g2/m}(c_i) * P(x_1, x_2|x) * \tau) \quad (2.12)$$

Для индивидуальной клетки $P_{G1/S}(\tau)$ зависит от ее размера $\rho_{GP}(r_i) = (1 + \exp(-\frac{r_i - r_{min}}{T}))^{-1}$ и текущей концентрации ауксина

$$\rho_{g1/s}(a_i) = \begin{cases} 1, & \text{if } a_i < T_a^{G1/S} \\ 0, & \text{else} \end{cases} \quad (2.13)$$

$P_{G2/M}(\tau)$, в свою очередь, зависит от концентрации цитокинина:

$$\rho_{g2/m}(c_i) = \begin{cases} 1 - c_i/T_c^{G2/M}, & \text{if } c_i < T_c^{G2/M} \\ 0.0001, & \text{else} \end{cases} \quad (2.14)$$

где $P_{G1/S}(\tau)$, $P_{G2/M}(\tau)$ – функции распределения вероятности прохождения G1/S и G2/M; a_i , c_i – концентрации ауксина, цитокинина в клетке i ; r_i – размер клетки i ; r_{min} – минимальный размер клетки способной к делению; $T = 0,01$ – параметр оценки вклада размера клетки в вероятность перехода G1/S; $T_a^{G1/S}$ – пороговое значение концентрации ауксина для перехода G1/S; $T_c^{G2/M}$ – пороговое

значение концентрации цитокинина для перехода G2/M; $P(x_1, x_2|x)$ – функция вероятности положения центров дочерних клеток (x_1 и x_2) после деления клетки с координатой центра x .

Скорости роста клеток в фазах G1 и G2 отличаются константами роста K_{g1} и K_{g2} , соответственно:

$$r_i(t) = \begin{cases} r_0 + \begin{cases} t * K_{g1}, & \text{if } G1 \\ t * K_{g2}, & \text{if } G2 \end{cases}, & \text{if } r_i(t) < r_{max} \\ 0, & \text{else} \end{cases} \quad (2.15)$$

где $K_{g2}/K_{g1}=3$ – константа роста; r_{max} – максимальный радиус, которого может достичь клетка.

2.4. Реализация модели и численные расчеты

Для подтверждения достаточности и непротиворечивости минимального регуляторного контура контроля клеточного цикла (рис. 2.3А) необходимо было выяснить возможность самоорганизации трех доменов клеток с принципиально отличающейся клеточной динамикой. А именно, в колумелле клетки должны находиться преимущественно в G1 фазе, т.е. не проходить ни одной контрольной точки (рис. 2.3Б). В пролиферационном домене клетки могут находиться как в G1, так и в G2 фазах, т.е. проходить две контрольные точки. В транзитном домене меристемы клетки должны находиться в G2 фазе, т.е. проходить только G1/S переход. Домены должны не только формироваться, но и поддерживаться, несмотря на деления клеток и увеличение длины моделируемого ансамбля.

В модели использована динамическая грамматика, реализованная в пакете Plenum для программы Mathematica (Yosiphon, Mjolsness, 2007). Рост и перемещение клеток вдоль оси, активный и пассивный транспорт сигнальных веществ между клетками, а также деградация веществ описаны непрерывными функциями. А переходы между дискретными событиями описаны стохастическими правилами. Блок схема модели представлена на рис. 2.9. При решении дифференциальных уравнений модели использовался численный

метод интегрирования (Рунге-Кутта 4-го порядка), встроенный в программу Mathematica, NDSolve с предусмотренными по умолчанию параметрами.

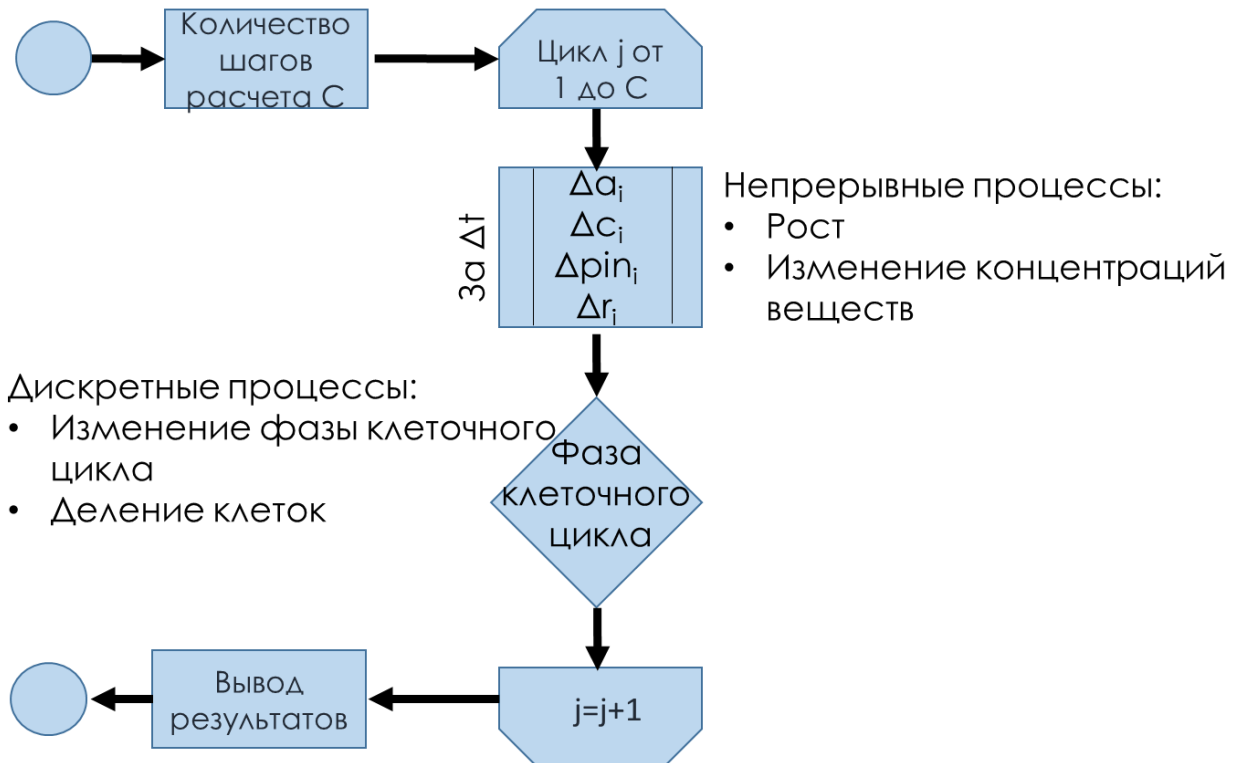


Рисунок 2.9. Гибридная модель роста и деления клеток. Блок схема модели.

В работе проводился численный расчет и анализ двух вариантов распределения концентраций сигнальных веществ: для постоянного и увеличивающегося числа клеток. Первым шагом было получение картин распределения концентраций сигнальных веществ ауксина и цитокинина, соответствующих экспериментальным данным (рис. 2.5Б,Г). На втором шаге в модель были добавлены правила роста и деления клеток для моделирования «растущего» ансамбля клеток.

2.4.1. Стационарное распределение концентраций для постоянного числа клеток

При реализации модели с постоянным числом клеток ($N=20$), клетки не росли и не делились, интенсивности потоков ауксина и цитокинина оставались постоянными (значения параметров модели k и $l = 0$). В программе Mathematica рассчитывались изменения концентрации ауксина (2.1)–(2.4), белка PIN1 (2.5)–(2.7) и цитокинина (2.8)–(2.10) в клеточном ансамбле. В качестве начальных данных использовались равномерные распределения концентраций ауксина, цитокинина и белка PIN1 в клетках: $a_i=1.0$, $c_i=0.001$ и $PIN1_i=0$, $i=1, \dots, N$. Равномерные начальные данные были использованы для дополнительной проверки системы уравнений на предмет самоорганизации картин распределения концентраций сигнальных веществ в заданном ансамбле клеток. Размер клеток вычислялся как два радиуса клетки (r_i), который в начальный момент моделирования выбирался случайным образом из интервала от 2.5 до 5.4 микрометра. Исходя из радиуса клетки, рассчитывалось положение её центра (x_i) на координатной оси x . Численный расчет велся до момента времени $t=30000$, в течение которого распределения концентраций ауксина, цитокинина и PIN1 формировались из начальных равномерных и далее оставались постоянными.

В качестве первоначального набора параметров был использован «жесткий» набор параметров из модели (Mironova et al., 2010), т.к. этот набор параметров уже был исследован ранее на устойчивость. Остальные параметры подбирались таким образом, чтобы в процессе расчета происходила самоорганизация максимума концентрации ауксина в 4-й клетке от кончика корня и двух максимумов концентрации цитокинина – в основании и кончике корня (рис. 2.10). Эти максимумы сохраняли свое положение сколь угодно долго в течение расчета, что позволяет нам говорить о формировании распределений концентраций в соответствии с экспериментальными данными (рис. 2.5Б-Г). Итоговые значения параметров представлены в таб. 2.1.

Таблица 2.1. Значения параметров модели, влияющих на распределение концентраций ауксина, цитокинина, PIN1 белка и регуляцию клеточного цикла. Указанные размерности: *cu* – единица концентрации, *tu* – единица времени.

Параметры для описания динамики веществ в модели								
Ауксин			Цитокинин			PIN1 белок		
α_0	0.06	<i>cu/tu</i>	β_0	0.08	<i>cu/tu</i>	S_p	0.001	<i>1/tu</i>
k	0.0001	<i>cu/tu^2</i>	l	0.01	<i>cu/tu^2</i>	D_p	0.001	<i>1/tu</i>
σ_0	0.002	<i>cu</i>	$K_{s,c}$	0.01	<i>1/tu</i>	T_a^{sp}	0.1	<i>cu</i>
$K_{d,a}$	0.0055	<i>1/tu</i>	$K_{d,c}$	0.008	<i>1/tu</i>	T_a^{dp}	0.9	<i>cu</i>
D_a	0.06	<i>1/tu</i>	D_c	0.08	<i>1/tu</i>			
$K_{at,a}$	0.26	<i>1/tu</i>	T_a^{sc}	4	<i>tu</i>			
Параметры для описания прохождения контрольных точек								
$T_a^{G1/S}$	1.2	<i>cu</i>	$T_c^{G2/M}$	0.5	<i>cu</i>	r_{min}	6.2	<i>мкм</i>

2.4.2. Распределение концентраций фитогормонов для переменного числа клеток

При реализации модели с динамическим числом клеток «включались» предложенные правила регуляции клеточного цикла (2.11)–(2.15), а также были использованы ненулевые коэффициенты k и l для описания возрастания потоков ауксина и цитокина во времени. Расчет в этом случае начинался с $N = 15$ клеток с начальными распределениями концентраций как для варианта с постоянным числом клеток в ансамбле: $a_i = 1.0$, $c_i = 0.001$ и $PIN1_i = 0$. В начальный момент времени все клетки находились в фазе G1 клеточного цикла.

Расчеты проводились со значениями параметров, указанными в таб. 2.1. Кроме того, были подобраны значения параметров k и l . Параметры были подобраны так, что распределение ауксина с дистальным максимумом концентрации и распределение цитокинина с дистальным и проксимальным максимумами не менялись на качественном уровне при росте клеточного ансамбля. В процессе расчета максимум концентрации ауксина формировался

в 4-й клетке и сохранялся на протяжении численного эксперимента, что соответствует экспериментальным данным (рис. 2.5Б). Распределение концентрации цитокинина, а именно, наличие двух максимумов концентрации, качественно совпадает с распределением, полученным для расчёта с постоянным числом клеток ансамбля (рис. 2.10А, Б) и экспериментальными данными (рис. 2.5Г, 2.3Б). Самоорганизация и поддержание распределения цитокинина в корне во времени с учетом клеточной динамики показаны впервые.

При получении постоянного распределения концентраций мы наблюдали формирование трех областей, различающихся по статусу клеток в клеточном цикле. На рис. 2.10В видно, что клетки, относящиеся к колумелле, находятся в фазе G1, клетки, относящиеся к транзитному домену, находятся в фазе G2, клетки, относящиеся к пролиферационному домену, находятся как в фазе G1, так и в фазе G2. Такое распределение клеток по принципу фазовой принадлежности хорошо соотносится с экспериментальными данными (рис. 2.3Б). Эти три домена кончика корня сохранялись при расчете сколь угодно продолжительное время, что свидетельствует о непротиворечивости предложенного нами механизма гормональной регуляции клеточного цикла (рис. 2.3В) для формирования устойчивых в развитии доменов апикальной меристемы корня.

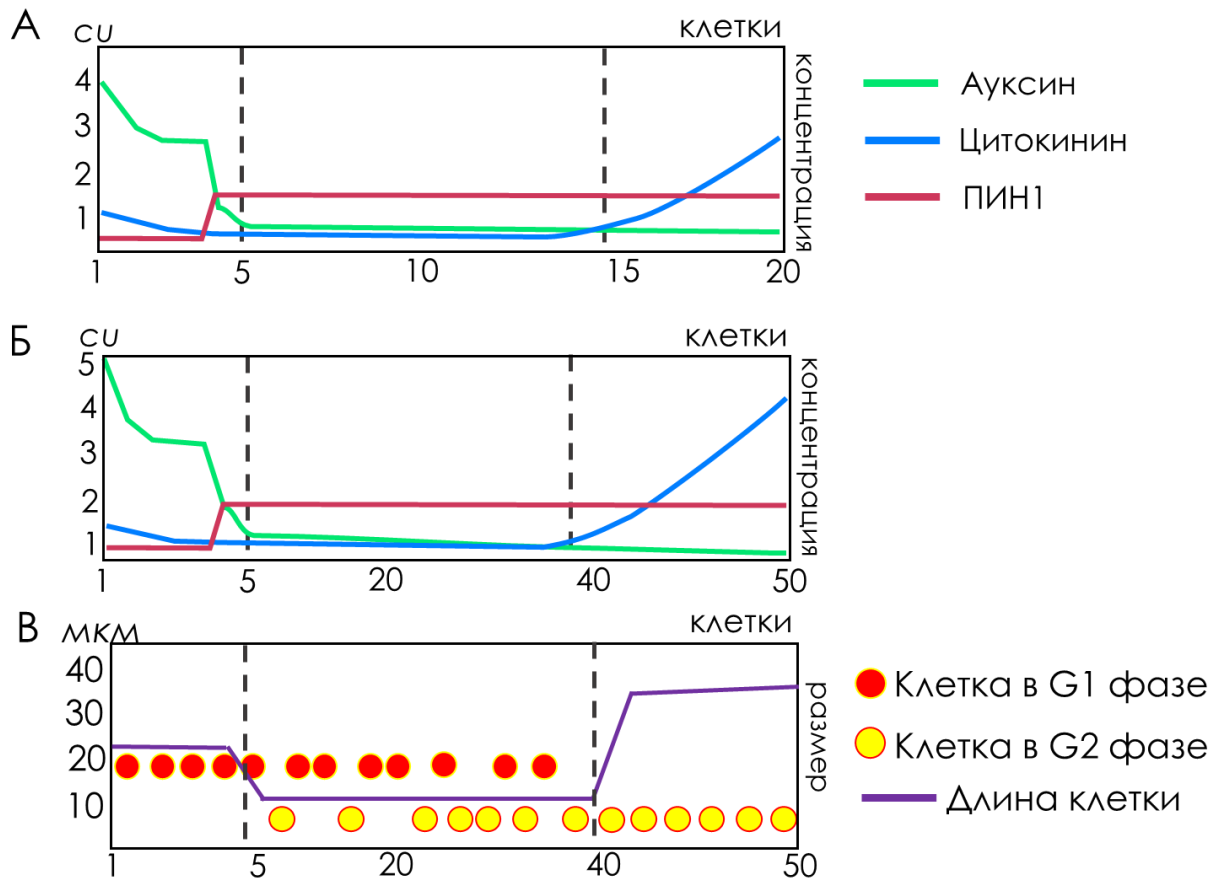


Рисунок 2.10. Результаты моделирования. А. Распределение концентраций сигнальных веществ в расчете модели с постоянным числом клеток $N=20$. Б. Распределение концентраций сигнальных веществ в расчете модели с динамическим числом клеток от $N=15$ до $N=50$. В. Результат динамического распределения клеток по фазам и размерам.

2.5. Численный анализ модели при варьировании параметров.

В данной работе мы не исследовали устойчивость решения модели распределения ауксина к начальным данным и ее чувствительность к варьированию большей части параметров, так как подробный анализ был проведен для предшествующей модели (Mironova et al., 2010). Мы провели анализ чувствительности модели к варьированию параметров, ответственных за распределение цитокинина и выявили, что характерное распределение формировалось в широком интервале варьирования параметров скоростей пассивного транспорта, деградации, порогов и интенсивности синтеза. В данной главе мы подробно проанализировали чувствительность модели к варьированию параметров, связанных с интенсивностью поступления

фитогормонов в систему (интенсивность потока, входящего в N -ую клетку, скорость синтеза). Кроме того, мы провели исследование чувствительности модели к изменению параметров, отвечающих за регуляцию клеточного цикла.

Мы провели численное исследование модели для переменного числа клеток при варьировании этих параметров. В расчетах мы анализировали следующие характеристики: положение клетки с максимумом концентрации ауксина (соответствующей клетке ПЦ), количество делящихся клеток, концентрацию ауксина в клетках, соответствующих в модели клеткам ПЦ и клеткам колумеллы, а также максимум концентрации цитокинина. При исследовании изменялось значение только одного параметра (константы), расчет велся до момента времени $t=30000$. Поскольку модель содержит стохастические правила переходов, при исследовании для каждого значения параметра проводилось от 20 до 50 испытаний.

2.5.1. Изменение притока ауксина в клеточный ансамбль

Приток ауксина в клеточный ансамбль имеет две компоненты: через независимый синтез с константой σ_0 , и через поток ауксина в N -ую клетку с константой начального потока α_0 и константой увеличения потока во времени k (уравнения 2.1, 2.4).

2.5.1.1. Варьирование константы независимого синтеза σ_0 ауксина

Результаты расчетов при варьировании константы σ_0 указаны в таб. 2.2. Видно, что набор параметров (таб. 2.1), подобранный для модели, является наиболее оптимальным для поддержания концентрации ауксина в ПЦ (таб. 2.2, выделено жирным шрифтом). А именно, для значения $\sigma_0=0.002$ мы наблюдаем максимальные значения концентрации ауксина в клетках, соответствующих ПЦ и колумелле. Кроме того, именно при выбранном значении параметра $\sigma_0=0.002$ формирование максимума происходит в 4-ой клетке от кончика

корня, и это положение поддерживается на протяжении всего расчета, что является важным свойством для поддержания стволовых клеток ПЦ. При уменьшении σ_0 максимум переходит в 3-ю клетку, а при увеличении в 6-ю от кончика корня, в обоих случаях концентрация ауксина в максимуме снижается.

Таблица 2.2. Поведение модели при варьировании константы независимого синтеза ауксина σ_0 . В колонке 2 представлено положение максимума концентрации ауксина, наиболее часто встречаемое в испытаниях. В колонках 3-6 представлены средние значения. Число испытаний от 20 до 50.

σ_0	Положение ПЦ (№ клетки)	Концентрация ауксина в ПЦ (сi)	Максимальная концентрация ауксина в клетках колумеллы (сi)	Максимум концентрации цитокинина (сi)	Количество делящихся клеток
0.0005	3	1.69412	2.68255	3.16043	36.45
0.001	3	2.43506	3.82206	3.17913	35.25
0.002	4	2.87113	4.90825	3.20620	34.35
0.003	6	2.77394	4.80067	3.23873	33.47
0.004	6	1.60073	3.34286	3.38287	32.05
0.005	-	-	-	-	0

Повышение константы синтеза ауксина в модели приводит к увеличению максимума цитокинина, что в свою очередь приводит к сокращению количества делящихся клеток (последний столбец таб. 2.2). При увеличении σ_0 до 0.005 в модели прекращаются деления клеток. Можно заключить, что нерегулируемый синтез ауксина с невысокой интенсивностью может являться адаптивным преимуществом для поддержания ниши стволовых клеток в меристеме корня.

2.5.1.2. Варьирование константы базального потока ауксина α_0

Ранее было показано (Mironova et al., 2010), что уменьшение потока ауксина приводит к потере максимума ауксина к клетке, соответствующей ПЦ, аналогичные результаты были получены при исследовании параметра α_0 (таб. 2.3). При уменьшении константы начального потока ауксина на 0.03 максимум концентрации ауксина клетке, соответствующей ПЦ, формируется в 3-ей клетке от кончика корня. Дальнейшее понижение этой константы приводит к исчезновению максимума ауксина в кончике корня. Также при понижении константы отмечалось закономерное снижение максимальной концентрации ауксина как в клетках колумеллы, так и в клетках, соответствующих ПЦ, даже несмотря на переход максимума в 3-ю клетку от кончика корня. При увеличении константы начального потока ауксина до $\alpha_0=0.18$ максимум смещается в 6-ю клетку.

Таблица 2.3. Зависимость концентрации ауксина в модели от изменения константы начального потока ауксина α_0 . В колонке 2 представлено значение, наиболее часто встречаемое в испытаниях. В колонках 3-5 представлены средние значения. Число испытаний от 20 до 50.

α_0	Положение ПЦ (№ клетки)	Концентрация ауксина в ПЦ (сн)	Максимальная концентрация ауксина в клетках колумеллы (сн)	Количество клеток в G2 в транзитном домене
0.02	-	-		
0.03	3	2.75077	4.85425	0
0.04	4	2.85582	4.79722	0
0.06	4	2.87113	4.90825	0
0.11	4	2.87257	4.93148	4
0.16	6	2.25289	3.769284	4
0.18	-	-		

При повышении значения параметра начального потока до $\alpha_0=0.11$ клетки после окончания делений переходят в G2 фазу и могут пройти переход

G2/M, т.к. повышается поток ауксина, а соответственно и уровень ауксина (в том числе в ПЦ и колумелле). Это происходит согласно заложенному в модель механизму регуляции клеточного цикла. На рис. 2.11 представлен случай увеличения параметра начального потока до $\alpha_0=0.11$. На графике видно, что в отличие от исходных распределений концентрации ауксина (раздел 2.4.2) со стороны побега (на рисунке справа) появляется второй максимум ауксина.

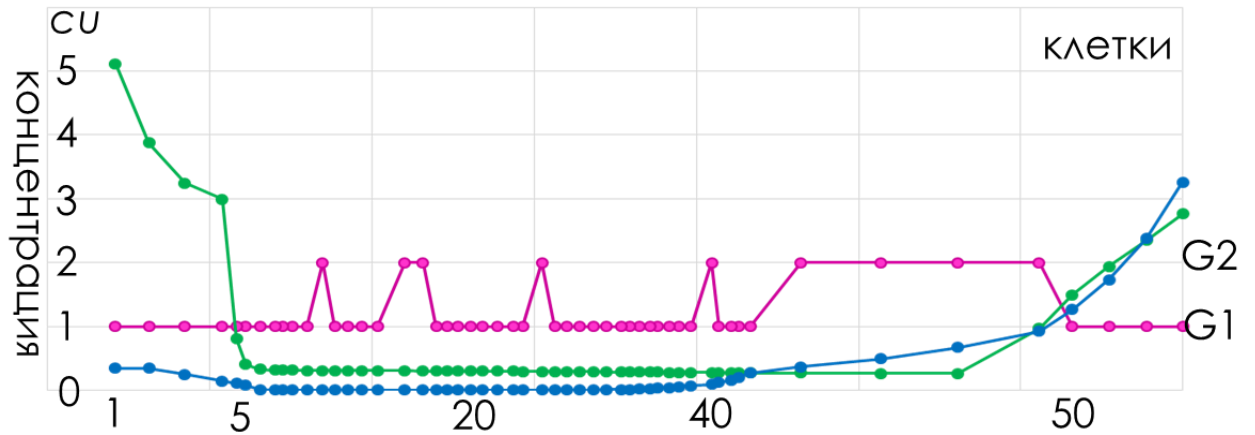


Рисунок 2.11. Распределения концентрации гормонов ауксина (зеленый), цитокинина (синий) и фаз клеточного цикла (малиновый) в модели при значении параметра начального потока $\alpha_0=0,11$.

2.5.1.3. Варьирование константы увеличения потока ауксина во времени k

Константа увеличения потока ауксина во времени отвечает за рост концентрации ауксина, входящего в клетку с номером N . Как видно из таб. 2.4 вклад константы роста потока ауксина при выбранных оптимальных параметрах незначителен. Лишь при повышении значения константы в 50 раз максимум концентрации ауксина перемещается в 5-ю клетку от кончика корня. Не происходит появления клеток в G2 фазе в транзитном домене при изменении значения константы, в таких интервалах, чтобы сохранялся максимум концентрации ауксина в 4-ой клетке от кончика корня.

Таблица 2.4. Зависимость концентрации ауксина в модели от изменения константы увеличения потока ауксина во времени k . В колонке 2 представлено значение, наиболее часто встречаемое в испытаниях. В колонках 3-5 представлены средние значения. Число испытаний от 20 до 50.

K	Положение ПЦ (№ клетки)	Концентрация ауксина в ПЦ (сн)	Максимальная концентрация ауксина в клетках колумеллы (сн)	Количество клеток в G2 в транзитном домене
0.00001	-	-		
0.00005	4	2.88486	4.93997	0
0.0001	4	2.87113	4.90825	0
0.0002	4	2.88793	4.94505	0
0.0003	4	2.88994	4.94837	0
0.0005	4	2.84911	4.93664	0
0.001	4	2.88204	4.93674	0
0.005	5	2.67017	4.71618	0

2.5.1.4. Заключение по варьированию параметров потока ауксина

Как показало исследование варьирования по параметрам, модель чувствительна к изменению константы синтеза ауксина, константы начального потока и менее чувствительна к изменению константы роста потока ауксина при варьировании значений в пределах одного порядка чистовых значений. Одним из показателей чувствительности модели является перемещение локального максимума концентрации ауксина из 4-й клетки в 3-ю или 6-ю, что происходило при понижении и повышении констант синтеза и начального потока ауксина. Также было показано, что выбранные значения констант изменения концентрации ауксина в модели являются оптимальными.

Повышение константы независимого синтеза ауксина может моделировать рост корня трансгенных растений *uuc1-D*, сверхэкспрессирующих ген фермента синтеза ауксина *YUC1* (Zhao et al., 2001).

Действительно, у таких растений отмечается повышенный уровень эндогенного ауксина и укороченные корень и меристема. Кроме того, у растений *uic1-D* увеличено количество клеток колумеллы. Все эти изменения у трансгенного растения хорошо согласуются с предсказаниями модели (см. таб. 2.2).

Появление второго максимума ауксина со стороны побега при увеличении базального потока приводит к изменению распределения клеток по фазам в зоне, соответствующем транзитному домену. В сравнении с рисунком 2.10В видно, что после группы клеток в G2 фазе, появляется группа клеток в G1 фазе. Такое поведение модели предсказывает, что при увеличении потока ауксина, будет сокращаться домен репликации ДНК. Это предсказание может быть проверено экспериментально при детальном исследовании разных тканей сосудистой системы (протофлоэмы, прокамбия и протоксилемы), так как известно, что в эти ткани входят различные по интенсивности потоки ауксина (см. раздел 1.4). Подтверждение предсказания смотри в разделе 3.3.1.

2.5.2. Изменение притока цитокинина в клеточный ансамбль

Изменения притока цитокинина в клеточный ансамбль можно осуществить за счет варьирования следующих констант (уравнения 2.8–2.10):

- начального потока из побега β_0 ,
- роста потока из побега с ростом корня l ,
- синтеза цитокинина $K_{s,c}$.

Рассмотрим изменение каждой из констант по отдельности.

2.5.2.1. Варьирование константы начального потока цитокинина β_0

Анализ изменения концентрации цитокинина в модели от константы начального потока β_0 показывает, что уровень концентрации цитокинина пропорционален начальному потоку (таб. 2.5). При уменьшении константы начального потока на 0.01 максимум концентрации ауксина клетке,

соответствующей ПЦ, формируется в 2-й клетке от кончика корня, количество делящихся клеток увеличивается (последняя колонка таб. 2.5). Повышение же значения константы приводит к сокращению числа клеток, относящихся к пролиферационному домену, но не влияет на положение клеток, соответствующих ПЦ, а также незначительно влияет на концентрацию ауксина.

Таблица 2.5. Поведение модели в зависимости от константы начального потока цитокинина β_0 . В колонке 2 представлено значение, наиболее часто встречаемое в испытаниях. В колонках 3-6 представлены средние значения. Число испытаний от 20 до 50.

β_0	Положение ПЦ (№ клетки)	Концентрация ауксина в ПЦ (cu)	Максимальная концентрация ауксина в клетках колумеллы (cu)	Максимум концентрации цитокинина (cu)	Количество делящихся клеток
0.07	2	1.89235	2.6089	2.86248	38
0.08	4	2.87113	4.90825	3.20620	34.35
0.10	4	2.87057	4.91699	3.90164	33.75
0.12	4	2.86757	4.91464	4.60812	32.35
0.16	4	2.8006	4.80933	6.01681	30.65
0.18	4	2.88658	4.94955	6.75152	30.6
0.20	4	2.8037	4.82169	7.46754	29.1

2.5.2.2. Варьирование константы увеличения потока цитокинина l

Как видно из таб. 2.6 значение константы увеличения потока цитокинина оказывает существенное влияние на концентрацию цитокинина в дистальном максимуме и как следствие на размер пролиферационного домена. При значениях константы $l=0.01$ значения максимумов концентрации ауксина в среднем меньше, чем при других значениях константы l .

Таблица 2.6. Зависимость концентрации ауксина и цитокинина в модели от изменения константы увеличения потока цитокинина во времени l .

В колонке 2 представлено значение, наиболее часто встречаемое в испытаниях. В колонках 3-6 представлены средние значения. Число испытаний от 20 до 50.

l	Положение ПЦ (№ клетки)	Концентрация ауксина в ПЦ (cu)	Максимальная концентрация ауксина в клетках колумеллы (cu)	Максимум концентрации цитокинина (cu)	Количество делящихся клеток
0.001	4	2.89226	4.94714	2.74078	35.1
0.005	4	2.88497	4.93321	2.9417	35
0.01	4	2.87113	4.90825	3.20620	34.35
0.03	4	2.89414	4.95449	4.23824	34.3
0.05	4	2.88645	4.94763	5.4871	32
0.1	4	2.89113	4.95477	8.7689	30.1
0.5	-	-			0

2.5.2.3. Варьирование константы синтеза цитокинина $K_{s,c}$

В таб. 2.7. показаны зависимости от константы синтеза цитокинина $K_{s,c}$ в клетке изменения следующих характеристик: концентрации ауксина в клетках, соответствующих в модели клеткам ПЦ, клеткам колумеллы, и максимума концентрации цитокинина. Видно, что набор параметров (таб. 2.1), подобранный для модели, является наиболее оптимальным для поддержания концентрации ауксина в ПЦ (таб. 2.7, выделено жирным шрифтом). Варьирование значений константы производилось до тех пор, пока максимум ауксина формировался в 4-ой клетке и клетки в ансамбле делились, при повышении значения константы до 0.1 во всех испытаниях клетки переставали делиться, а именно проходить G2/M переход. Данные в колонке 5 показывают повышение максимума цитокинина с повышением значения константы синтеза. Также с повышением константы синтеза цитокинина происходило сокращение количества делящихся клеток.

Таблица 2.7. Зависимость концентрации ауксина и цитокинина в модели от изменения константы синтеза цитокинина $K_{s,c}$. В колонке 2 представлено значение, наиболее часто встречаемое в испытаниях. В колонках 3-6 представлены средние значения. Число испытаний от 20 до 50.

$K_{s,c}$	Положение ПЦ (№ клетки)	Концентрация ауксина в ПЦ (сi)	Максимальная концентрация ауксина в клетках колумеллы (сi)	Максимум концентрации цитокинина (сi)	Количество делящихся клеток
0.005	2	1.77381	2.36055	3.14594	37.27
0.01	4	2.87113	4.90825	3.20620	34.35
0.03	4	2.84323	4.87732	3.25878	32.6
0.04	4	2.83762	4.88406	4.22135	28.25
0.05	4	2.83807	4.89094	12.79304	20.125
0.1	4	2.71088	4.69686	20.41774	0

2.5.2.4. Заключение по варьированию параметров потока цитокинина

Данные, представленные в таб. 2.5, 2.6 показывают, что концентрация цитокинина в дистальном максимуме растёт с увеличением параметров потока цитокинина в корень, что в свою очередь приводит к уменьшению количества делящихся клеток в пролиферационном домене. Таким образом модель предсказывает, что увеличение максимальной концентрации цитокинина в транзитном домене ведёт к сокращению размеров пролиферационного домена. Это предсказание может быть проверено экспериментально при рассмотрении пролиферационной активности в сосудистой системе корня, где имеются различия в концентрации цитокинина согласно литературным данным (см. раздел 1.5).

Согласно данным, представленным в таб. 2.7, модель предсказывает, что снижение синтеза цитокинина приведёт к увеличению размеров пролиферационного домена. Это предсказание может быть проверено

экспериментально при сравнении пролиферационной активности в корнях дикого типа и корнях мутантных по синтезу цитокинина растений (3.3).

2.5.3. Изменение параметров регуляции клеточного цикла.

Регуляция клеточного цикла в модели определяется пороговыми константами $T_a^{G1/S}$ и $T_c^{G2/M}$ при прохождении переходов G1/S и G2/M соответственно. Рассмотрим значения каждой из констант по отдельности.

2.5.3.1. Варьирование константы пороговой концентрации ауксина для регуляции перехода G1/S

Анализ изменения значения $T_a^{G1/S}$ показал, что пролиферационный домен формируется в интервале $0.25 < T_a^{G1/S} < 2.5$ (таб. 2.8). При $T_a^{G1/S} = 0.25$ клетки ансамбля перестают делиться. При $T_a^{G1/S} = 2.5$ в ансамбле клеток максимум концентрации ауксина образуется в клетке, соответствующей ПЦ, но в процессе расчета модели максимум смещается в сторону дистальной части меристемы, а в кончике начинает образовываться новый нестабильный максимум (рис. 2.12), и его концентрация снижается.

Данные, представленные в таблице, показывают, что уменьшение значения константы пороговой концентрации ауксина для перехода G1/S приводит к повышению концентрации ауксина в клетках, соответствующих ПЦ и колумелле. Кроме того, уменьшение значения константы приводит к уменьшению пролиферационного домена, что может быть связано с увеличением дистального максимума концентрации цитокинина (колонки 5 и 6). Повышение значения константы до 2.0, как и понижение, незначительно повышает концентрацию ауксина в максимумах, но влечет понижение максимума цитокинина, достаточное для увеличения количества делящихся клеток.

Таблица 2.8. Зависимость размера пролиферационного домена от величины константы пороговой концентрации ауксина $T_a^{G1/S}$ для перехода G1/S. В колонке 2 представлено значение, наиболее часто встречаемое в испытаниях. В колонках 3-6 представлены средние значения. Число испытаний от 20 до 50.

$T_a^{G1/S}$	Положение ПЦ (№ клетки)	Концентрация ауксина в ПЦ (cu)	Максимальная концентрация ауксина в клетках колумеллы (cu)	Максимум концентрации цитокинина (cu)	Количество делящихся клеток
0.25	-	-	-	-	0
0.30	4	2.90089	4.97056	3.30096	32
1.0	4	2.89149	4.95143	3.24392	33.66
1.2	4	2.87113	4.90825	3.20620	34.35
1.4	4	2.89198	4.95183	3.20030	35.1
2.0	4	2.88791	4.94505	3.20187	34.5
2.5	>6	1.85219	3.22460	3.14454	37.4

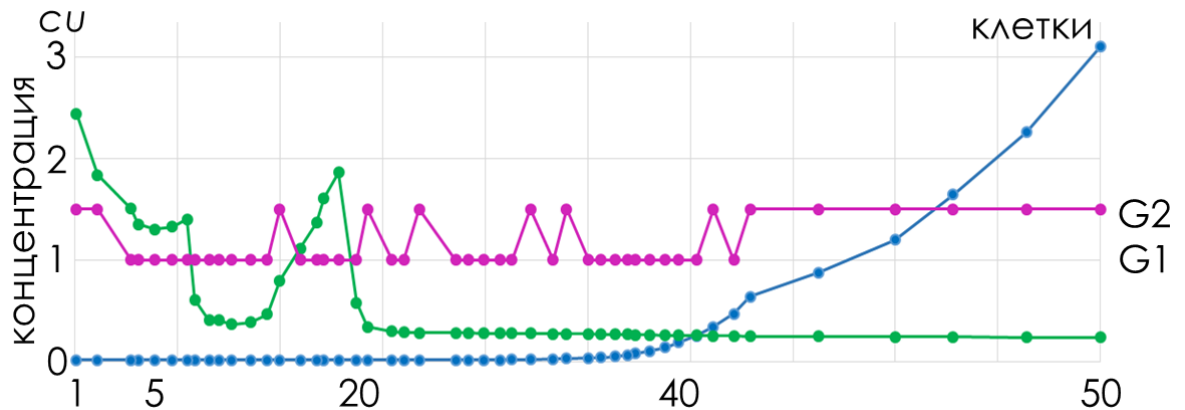


Рисунок 2.12. Распределения концентрации гормонов ауксина (зеленый), цитокинина (синий) и фаз клеточного цикла (малиновый) в модели при значении константы пороговой концентрации ауксина $T_a^{G1/S} = 2.5$.

2.5.3.2. Варьирование константы пороговой концентрации цитокинина для регуляции перехода G2/M

Изменение порогового значения $T_a^{G2/M}$, также влияет на размеры пролиферационного домена. Анализ расчетов показал, что уменьшение значения константы пороговой концентрации цитокинина для перехода G2/M приводит к уменьшению пролиферационного домена, и наоборот (таб. 2.9).

Таблица 2.9. Зависимость размера пролиферационного домена от величины константы пороговой концентрации цитокинина $T_c^{G2/M}$ для перехода G2/M. В колонках 2,3,5 представлены средние значения. В колонке 4 представлено значение, наиболее часто встречаемое в испытаниях. Число испытаний от 20 до 50.

$T_c^{G2/M}$	Количество делящихся клеток	Максимум концентрации цитокинина (cu)	Положение ПЦ (№ клетки)	Концентрация ауксина в ПЦ (cu)
0.30	30.4	3.30072	4	2.79979
0.35	31.9	3.27324	4	2.86633
0.40	33.03	3.23976	4	2.83825
0.45	33.55	3.22168	4	2.8449
0.50	34.35	3.20620	4	2.87113
0.55	34.53	3.19858	4	2.85847
0.60	35.38	3.18986	4	2.86511
0.65	35.93	3.17514	4	2.85566
0.70	-	-	-	-

Значения в последней колонке показывают, что при $T_c^{G2/M} = 0.50$ наблюдается наибольшее значение максимума концентрации ауксина в клетках, соответствующих ПЦ, что является важной характеристикой для поддержания ниши стволовых клеток в меристеме.

2.5.3.3. Заключение по варьированию параметров регуляции клеточного цикла

Анализ варьирования константы пороговой концентрации ауксина показал, что ауксин не имеет прямого влияния на размер пролиферационного домена, а только через изменение дистального максимума цитокинина (таб. 2.8). Однако при высоких значениях константы $T_a^{G1/S}$ наблюдалось смещение максимума из ПЦ с последующим формированием дополнительного максимума. Ранее формирование дополнительного максимума наблюдалось при увеличении потока ауксина из побега (Mironova et al., 2010). Мы предположили, что этот эффект может обеспечивать закладку бокового корня. Таким образом, в данной работе показано, что закладка бокового корня может регулироваться не только на уровне управления потоков ауксина, но и на уровне контроля клеточного цикла. Этот вопрос требует дальнейшего исследования.

Данные, представленные в таб. 2.9 показывают, что уменьшение значения константы пороговой концентрации цитокинина для перехода G2/M приводит к уменьшению пролиферационного домена, и наоборот. Согласно уравнению 2.14 функция вероятности перехода обратно пропорциональна константе порогового значения, а значит, чем больше значение константы, тем меньше чувствительность клетки к концентрации цитокинина. Таким образом, модель предсказывает, что снижение чувствительности клетки к цитокинину приведет к увеличению размеров пролиферационного домена. Это предсказание может быть проверено экспериментально при сравнении пролиферационной активности в корнях дикого типа и корнях мутантных растений с нарушением передачи сигнала цитокинина (3.3).

2.6. Заключение по модели формирования пролиферационного домена

В данной главе на основе интеграции разнородных экспериментальных данных предложен минимальный регуляторный контур контроля фитогормонами клеточного цикла в апикальной меристеме корня растений. Согласно решению обратной задачи, высокие концентрации ауксина в клетке ингибируют прохождение перехода G1/S, в то время как высокие концентрации цитокина в клетке ингибируют прохождение перехода G2/M. Создана гибридная математическая модель, в которой деления клеток происходят под управлением этого минимального регуляторного контура. В результате численного анализа модели показано, что этого контура достаточно для формирования и поддержания трех зон кончика корня с различной пролиферационной активностью (колумеллы, пролиферационного и транзитного доменов). Пролиферационный домен формировался и поддерживался между максимумом ауксина в ПЦ и максимумом цитокинина в транзитном домене.

При варьировании значений параметров наблюдались изменения в положениях максимумов концентрации ауксина и цитокинина и, как результат, размеров пролиферационного домена. Эти сценарии могут описывать реальные изменения пролиферационной активности в корне как в различных тканях, так и при различных внешних и внутренних условиях. На основе этого анализа, мы сформулировали следующие предсказания.

Предсказание 1. Увеличение потока ауксина со стороны побега приведёт к сокращению размера домена событий репликации ДНК.

Предсказание 2. Увеличение потока цитокинина со стороны побега приведёт к сокращению размеров пролиферационного домена.

Предсказание 3. Снижение концентрации цитокинина в транзитном домене или снижение чувствительности клеток растения к цитокинину приведёт к увеличению длины пролиферационного домена.

Для проверки этих предсказаний было проведено планирование и экспертное сопровождение экспериментов, результаты анализа которых представлены в следующей главе.

ГЛАВА 3. КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МИТОЗОВ В КОРНЕ

Во второй главе был предложен минимальный механизм регуляции клеточного цикла ауксином и цитокинином, достаточность и непротиворечивость которого была проверена в математической модели. В результате анализа модели был сделан ряд предсказаний, для проверки которых нами был спланирован эксперимент, реализованный Тарасом Пастернаком из Университета Фрайбурга (Германия). В данной главе описываются условия проведения эксперимента и результаты компьютерного анализа изображений, подтверждающие предсказания модели.

3.1. Экспериментальное исследование пролиферационной активности в кончике корня *Arabidopsis thaliana* L.

Для проверки предсказаний модели (см. раздел 2.6) необходимо было провести исследование распределения событий репликации ДНК и митозов в разных тканях корня. Сложность заключалась в том, что длительность обеих фаз по отношению ко времени клеточного цикла достаточно скоротечна (Vurplelová et al., 2017). Считается, что деление клеток происходит во всех тканях по длине АМК в случайном порядке (Доброчаев, Иванов, 1999), поэтому чтобы говорить о достоверности каких-либо различий необходимо изучать распределение митозов во всех тканях корня в трехмерном пространстве. Идеальным вариантом было бы изучать корни с окрашенными стенками и ядрами клеток, чтобы можно было однозначно проаннотировать митозы. Однако технологии одновременного окрашивания стенок и ядер не позволяют получить изображение в хорошем качестве, в связи чем мы сделали выбор в пользу окрашивания только ядер клеток кончика корня *A. thaliana*. Совсем недавно появился флуоресцентный краситель EdU, позволяющий окрашивать реплицирующуюся ДНК в том числе *in vivo* (Salic, Mitchison, 2007). Одновременное окрашивание клеток корня DAPI, EdU с

предобработкой колхицином позволит исследовать распределение репликации ДНК и событий митоза на одних и тех же корнях.

Эксперименты были спланированы и проведены по предложенным нами схемам. Все экспериментальные процедуры проводил наш коллега, Тарас Пастернак, из лаборатории Клауса Пальме в университете Фрайбурга (Германия). Тарас Пастернак предоставил нам все оригинальные изображения с конфокального микроскопа для дальнейшего анализа.

3.1.1. Предложенные условия проведения эксперимента

Было предложено использовать в эксперименте растения *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа (экотип Columbia-0). Обработка семян и выращивание проводилась согласно стандартным протоколам (Pasternak et al., 2015) на вертикально-ориентированных чашках Петри с агаризованной питательной средой, было предложено использовать в работе растения 4-дневного возраста после прорастания.

Перед подготовкой корней растений к микроскопии было предложено провести адаптацию проростков к условиям жидкой питательной среды в течение 12 часов. После адаптации в жидкую среду надо было добавить и 1 мг/мл колхицина, тормозящего прохождение метафазы митоза, и EdU (5-этинил-2'-деоксиридин, Salic, Mitchison, 2007), окрашивающего ядра клеток в процессе репликации ДНК, на 90 минут. Фиксация растений и окрашивание ДНК EdU и DAPI проводилось согласно протоколу с некоторыми адаптациями из работы (Pasternak et al., 2015), в результате чего глубина (Z-стек) анализа достигала 100 микрон (средняя толщина исследуемых корней). Далее корни необходимо было отсканировать с высоким разрешением (375 и 600 кратное оптическое увеличение) на конфокальном микроскопе в двух каналах флуоресценции (для DAPI и EdU) с серией оптических срезов (до 150 срезов) на глубину до 100 мкм. Для оценки распределения пролиферационной активности вдоль меристемы необходимо провести несколько сканирований вдоль одного корня на расстояние до 500 мкм от кончика (в режиме tiles).

Необходимо было отсканировать в хорошем качестве 10-15 корней дикого типа и по 4-6 корней мутантов *ipt3ipt5ipt7*, *arr12*. Также необходимо было отсканировать 20-30 корней дикого типа в меньшем разрешении для проверки качества карт.

3.1.2. Обработка изображений

Для обработки полученных с микроскопа изображений в формате .ism (Wilhelm et al., 2003) с помощью программы ImageJ (plugin LOCI) переводились в формат данных .h5 (<http://www.hdfgroup.org>). Изображения кончиков корня состояли из двух или более частично перекрывающихся (~8%) частей (tiles), т.к. целиком исследуемая область корня не помещается в заданный угол обзора объектива микроскопа; для их соединения использовалась программа XuvTools (Emmenlauer et al., 2009). Последующий анализ проводился в программе intrinsic Root Coordinate System – iRoCS Toolbox (Schmidt et al. 2014). Программа iRoCS позволяет аннотировать изображения в автоматическом или полуавтоматическом режиме с получением трехмерных координат всех ядер, в том числе и находящихся в митозе.

Обработка изображений в программе iRoCS осуществлялась по следующему сценарию.

- 1) Автоматическое нахождение всех видимых ядер (канал «nucleus») – функция «Plugins->01-Detect Nuclei». Результатом работы функции является список ядер в декартовой системе координат, записанной в канал «/annotation/detector».
- 2) Определение вручную пространственного расположения покоящегося центра с использованием функции программы «Channel->New Annotation Channel», в результате получаем канал «QC», который содержит только одну точку – ПЦ.
- 3) Ручное определение необходимого количества (20-60) клеток эпидермиса вдоль всего кончика корня.

- 4) Автоматический расчёт цилиндрических координат ядер исходя из положения ПЦ (канал QC) и клеток эпидермиса, определённых на шаге (3), с помощью функции «Plugins->03-Attach iRoCS». Если оси корня определились не точно, то необходимо доопределить большее число клеток эпидермиса и повторить выполнение функции.
- 5) Автоматическое определение типов всех клеток кончика корня с помощью функции «Plugins->04-Assign Layers» с использованием уже определенных каналов и модели корня дикого типа (layerAssignment_svmModel.h5), предоставляемой вместе с программой iRoCS. Также во время запуска функции можно выделить клетки, находящиеся в митозе («Re-classify mitotic state»).
- б) Корректировка неверно определенных типов клеток и их нахождения в состоянии митоза, а также удаление несуществующих, но определенных клеток.
- 7) Завершающим этапом является экспорт данных в формате .csv, которые подвергаются дальнейшему анализу в программах работы с таблицами (Microsoft Excel).

Была решена задача аннотации клеток сосудистого цилиндра, разные ткани которого хорошо определяются при окраске стенок, но не при окраске ядер. Мы решили использовать специфическую особенность клеток протофлоэмы: в меристеме корня по мере дифференцировки клетки протофлоэмы теряют ядро (Truernit et al., 2012). Поэтому эти ряды можно идентифицировать на картах, клетки протоксилемы и метаксилемы определялись на центральной плоскости, идущей перпендикулярно плоскости протофлоэмных полюсов.

3.1.3. Компьютерный и статистический анализ

При обработке данных использовались следующие характеристики для анализа пролиферационной активности.

МИ – митотический индекс, процент митозов к общему числу клеток. Берется на каждый интервал в 50 микрон исследуемой ткани АМК.

МР – распределение митозов в ткани, которое вычисляется как процент митозов на каждом интервале в 50 микрон к общему числу митозов в исследуемой ткани АМК.

ДНКИ – процент событий репликации ДНК к общему числу клеток. Берется на интервале в 50 микрон исследуемой ткани АМК, по аналогии с МИ.

МДНК – распределение событий репликации ДНК в ткани, которое вычисляется как процент митозов на интервале 50 микрон к общему числу событий репликации ДНК апикальной меристемы корня. По аналогии с МР.

Статистическая достоверность различий между выборками определялась согласно тесту Уэлча (Welch's *t*-test). В качестве значений выборки принимались расстояния от ПЦ до последнего события митоза или репликации ДНК в отдельной ткани или ряду клеток. Проверка значений выборок на соответствие нормальному распределению осуществлялась согласно критериям Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилка и построением нормально-вероятностных графиков (Q-Q plot). При множественном сравнении использовалась поправка Бонферрони. Для обозначения вариабельности данных были рассчитаны доверительные интервалы с 95% надежностью и стандартное отклонение от среднего.

3.2. Трехмерный компьютерный анализ распределения митозов и событий репликации ДНК в кончике корня

На рис. 3.1 А-Г представлены изображения продольных и поперечных проекций кончика корня в EdU и DAPI каналах. Корни сканировались до 500 микрон от кончика корня в связи с тем, что события репликации ДНК и митозы не наблюдались дальше чем 500 микрон от кончика корня.

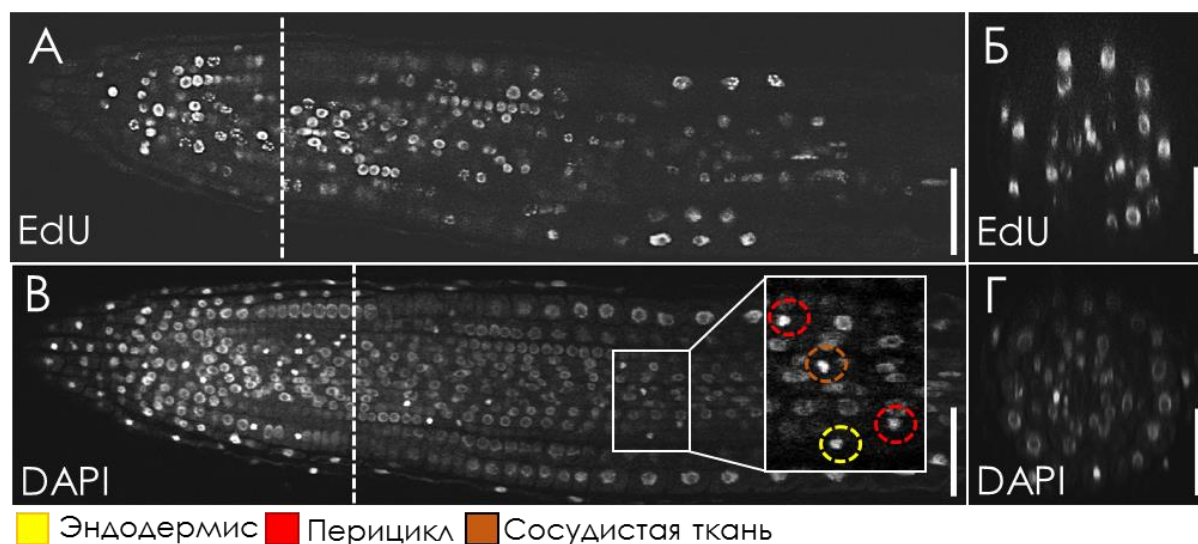


Рисунок 3.1. Проекции кончика корня в EdU и DAPI каналах с конфокального микроскопа. А,Б – Продольная (А) и поперечная (Б), расположенная на уровне пунктирной белой линии на рисунке (А), проекции кончика корня *A. thaliana* с окрашенными ядрами, в которых зафиксированы события репликации ДНК (сигнал EdU). В,Г – Продольная (В) и поперечная (Г), расположенная на уровне пунктирной белой линии на рисунке (В), проекции кончика корня *A. thaliana* с окрашенными ядрами (сигнал DAPI после обработки корней колхицином). На (В) увеличен фрагмент, на котором хорошо видны митозы в разных тканях корня, ткани корня помечены в соответствии с цветовой картой внизу рисунка.

Реконструированные трехмерные изображения кончиков корней с конфокального микроскопа обрабатывались с помощью программы iRoCS Toolbox (Schmidt et al. 2014) как описано выше. При анализе данных из канала DAPI ядра были определены и классифицированы в полуавтоматическом режиме на эпидермис кортекс, эндодермис, перицикл и сосудистую ткань. На следующем шаге мы определяли ядра в фазе репликации ДНК и фазе митоза по флуоресцирующим маркерам EdU и DAPI. Программа iRoCS автоматически рассчитывает цилиндрические координаты ядер относительно ПЦ и центральной оси корня. Цилиндрические координаты позволяют анализировать корень слой за слоем (рис. 3.2 А,Б). На рис 3.2 В,Г представлены графики для ядер клеток слоя кортекса и эндодермиса, построенные по двум из трех координат: по расстоянию от ПЦ (z) и по углу разворота (φ). В каждом корне распределения клеток в фазе репликации ДНК

и митоза были аккуратно проанализированы с помощью таких развернутых слоев.

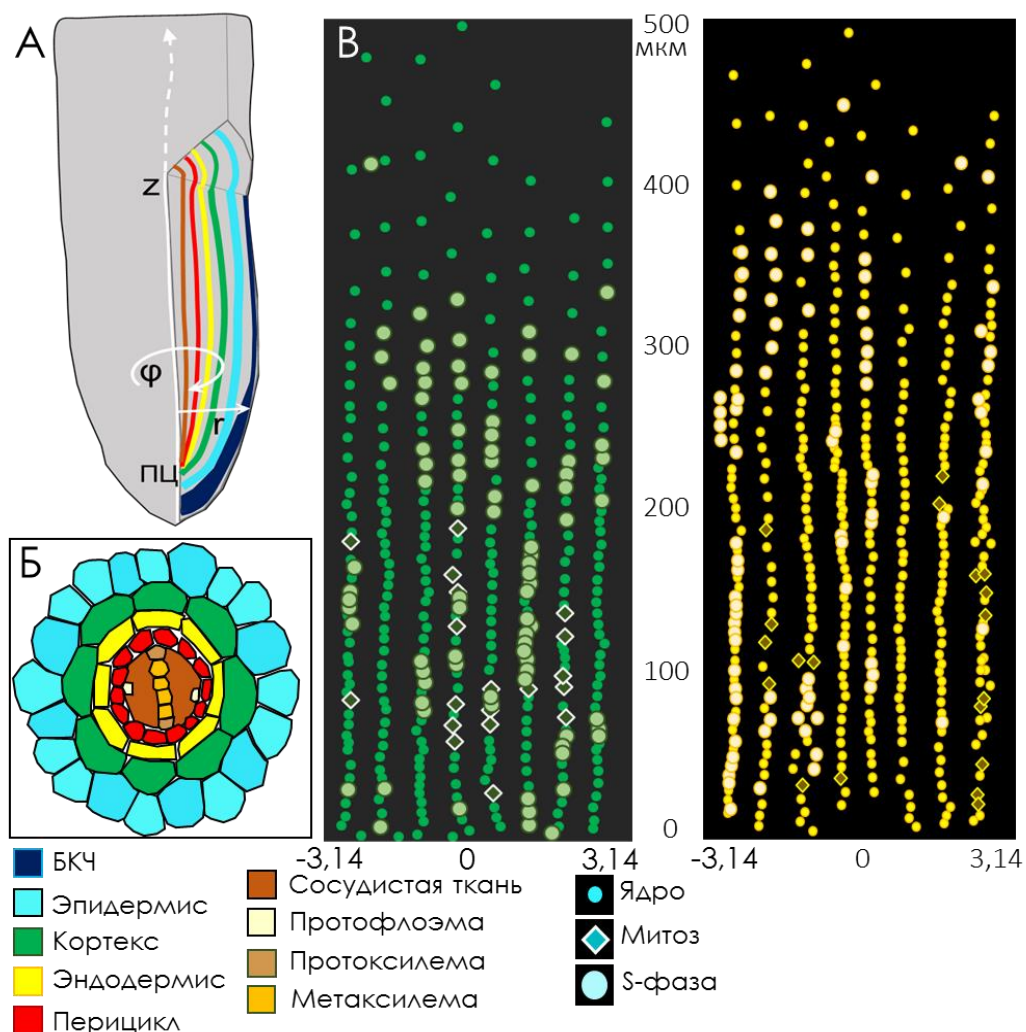


Рисунок 3.2. Аннотирование событий ДНК репликации и митозов в кончике корня *A. thaliana* с использованием программы iRoCS Toolbox. А. Наложение цилиндрической системы координат на кончик корня, используемое в программе iRoCS Toolbox. Б – поперечная проекция кончика корня *A. thaliana* с указанием различных тканей корня. В. «Развернутый» слой кортекса по двум цилиндрическим координатам: углу поворота (φ) и расстоянию от ПЦ (z). Г. «Развернутый» слой эндодермиса по двум цилиндрическим координатам: углу поворота (φ) и расстоянию от ПЦ (z). На В,Г ядра клеток обозначены точками, ядра в стадии митоза обозначены ромбами, события репликации ДНК обозначены кругами.

В результате получены трехмерные реконструкции распределения ядер клеток, находящихся в фазах репликации ДНК и митоза в кончиках корней пятидневных проростков в норме и в мутантах *ipt3ipt5ipt7*, *arr12*. Трехмерные

реконструкции позволили верифицировать предсказания модели и получить новые знания о билатеральной симметрии пролиферационной активности в тканях эпидермиса и перицикла и диархной симметрии пролиферационной активности в сосудистых тканях, а также определить границы транзитного и пролиферационного доменов не только по распределению митозов, но и по морфологии бокового корневого чехлика.

3.2.1. Проверка адекватности трехмерных реконструкций кончиков корней

Для верификации карт распределения митозов мы проверили пролиферационную активность в эпидермисе, которая изучалась ранее (например, Berger et al., 1998). В эпидермисе мы обнаружили радиальную симметрию в распределении митозов, а именно были найдены отличия между рядами клеток трихобластов (Т) и атрихобластов (АТ) (рис 3.3). В норме корень имеет восемь рядов клеток трихобластов, из которых развиваются корневые волоски в зоне дифференцировки, остальные ряды клеток относятся к атрихобластам, из них корневые волоски не развиваются, и их число варьируется от корня к корню. Ранее было показано, что ряды клеток эпидермиса имеющие непосредственный контакт с продольной стенкой, разделяющей клетки кортекса, становятся клетками трихобластами благодаря позиционной информации (Berger et al., 1998). Мы использовали эту особенность развития эпидермальной ткани для аннотирования Т/АТ ядер клеток (рис. 3.3А). Значимых отличий в количестве митозов или расстоянии до последнего митоза в Т/АТ обнаружено не было (рис. 3.3В,Г), но количество клеток до последнего митоза в рядах Т клеток было в 1,5 раза больше чем в АТ клетках (рис. 3.3Б), что подтверждает ранее полученный результат (Berger et al., 1998) и позволяет нам быть уверенными в применяемой методике исследований.

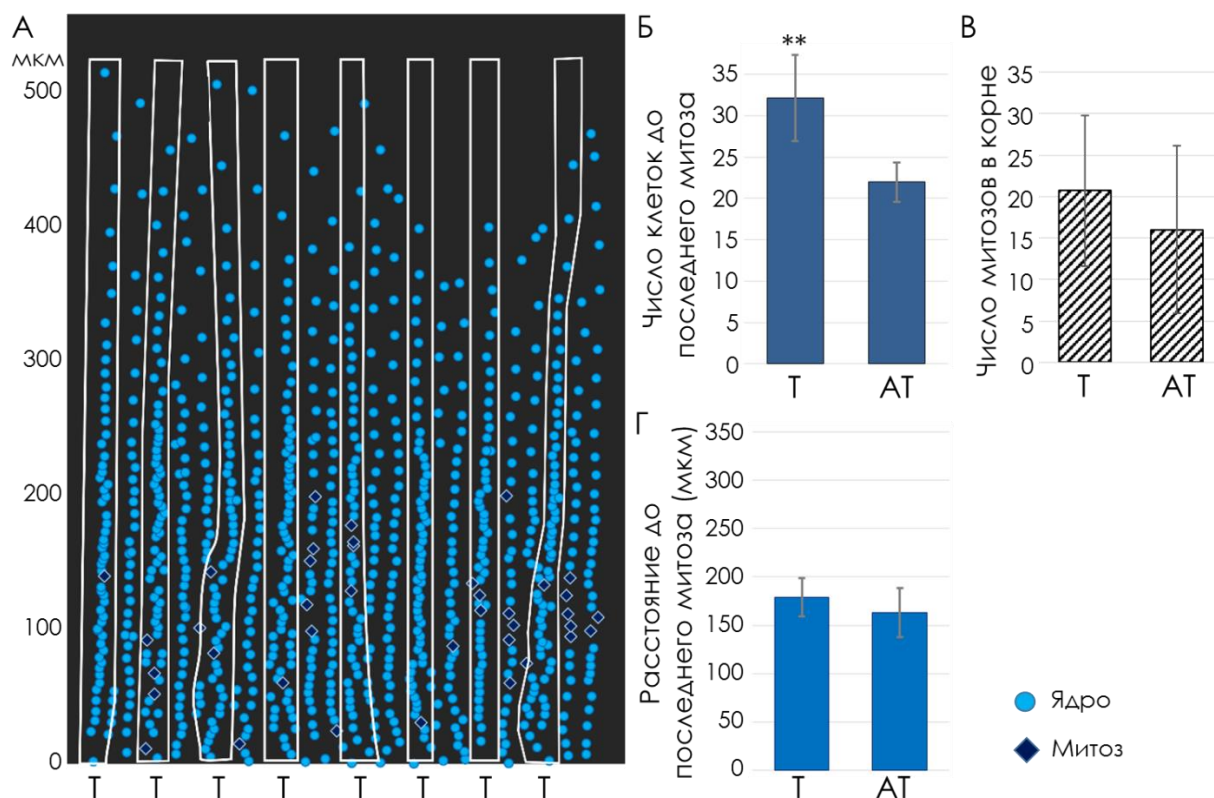


Рисунок 3.3. Пролиферационная активность в эпидермисе. А. «Развернутый» слой эпидермиса по двум цилиндрическим координатам: углу поворота (φ) и расстоянию от ПЦ (z). Белыми многоугольниками выделены ядра клеток рядов трихобластов. Б. Среднее число клеток до последнего митоза среди клеток трихобластов и атрихобластов. В. Среднее число митозов в корне в трихобластах и атрихобластах. Г. Расстояние от ПЦ до последнего митоза среди клеток трихобластов и атрихобластов в мкм. На гистограммах Б-Г обозначено стандартное отклонение. $n=10$. Статистические различия определены согласно Уэлч t-тесту, $** p < 0,01$. Т – трихобласты, АТ – атрихобласты.

3.2.2. Оценка распределения событий митозов и репликации ДНК в разных тканях кончика корня

Используя трехмерные карты распределения митозов и окрашенных EdU клеток, полученные с помощью программы iRoCS, можно оценить относительные распределения этих событий в разных тканях корня.

Митозы

Для каждого исследуемого корня мы отдельно посчитали относительное распределение митозов (MP) как пропорцию митотических

ядер в ткани на каждые 50 мкм вдоль центральной оси к общему числу митотических ядер в ткани (рис. 3.4А).

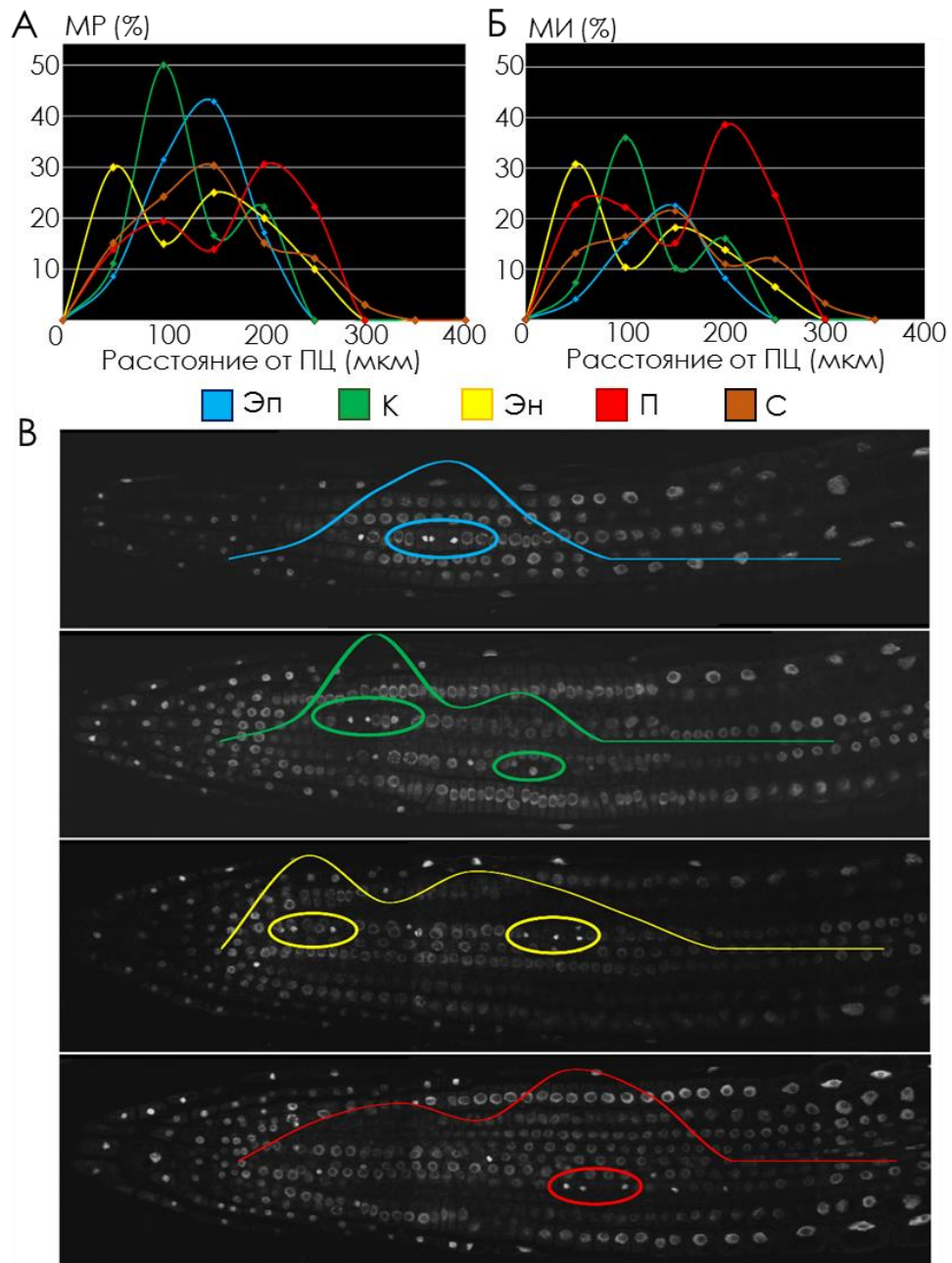


Рисунок 3.4. Анализ митотической активности в индивидуальном корне. А. Распределение митозов (MP) по тканям корня. Б. Митотический индекс, посчитанный для каждой ткани корня отдельно. По горизонтали отложено расстояние от ПЦ вдоль центральной оси корня (координата z) в мкм, по вертикали MP(A) и МИ(B) в %. Где «Эп» – эпидермис; «К» – кортекс; «Эн» – эндодермис; «П» – перицикл; «С» – сосудистая ткань. В. Кластеризация митозов внутри одной скани.

Мы использовали МР вместо классического митотического индекса (МИ) (рис. 3.4Б) для упрощения анализа, так как в случае МР нам не требовалось подсчитывать все клетки корня в пределах исследуемых интервалов. Видно, что положение максимумов пролиферационной активности в каждой из тканей совпадают для каждого из расчетов (рис. 3.4А,Б). Наличие максимумов на индивидуальных графиках МИ и МР можно объяснить тем, что в корне, как правило, расположены кластеры митозов (рис. 3.4В).

Усреднение этих распределений для большого количества корней сглаживает общий профиль, что позволяет выявить наличие максимума пролиферационной активности в районе 100 мкм для всех типов клеток (рис. 3.5). Далее наблюдается падение частоты делений – в кортексе и эпидермисе оно прекращается на расстоянии до 200 мкм, в остальных типах клеток прекращение делений происходит на расстоянии 250-300 мкм.

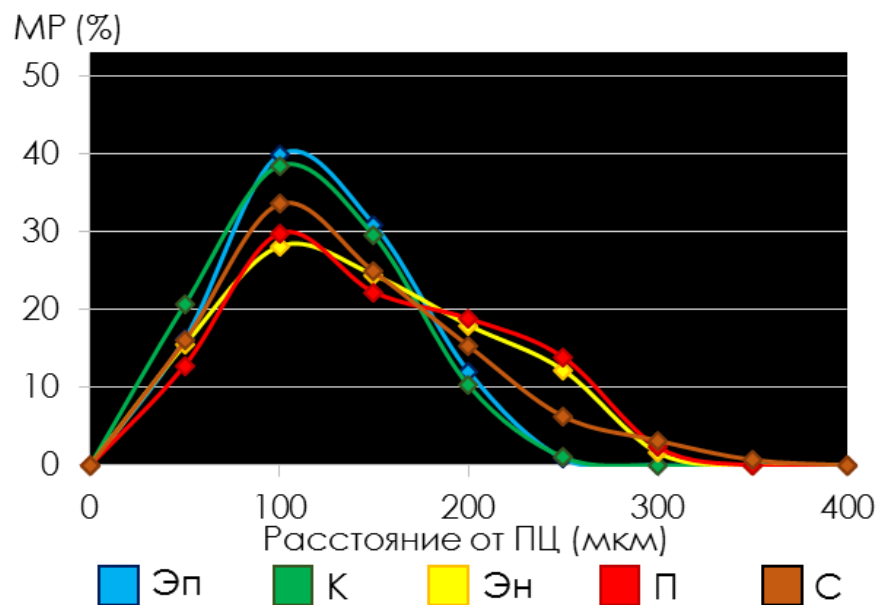


Рисунок 3.5. Распределения митозов по тканям кончика корня. По горизонтали отложено расстояние от ПЦ вдоль центральной оси корня (координата z) в мкм, по вертикали МР в %. Где «Эп» – эпидермис; «К» – кортекс; «Эн» – эндодермис; «П» – перицикл; «С» – сосудистая ткань.

События репликации ДНК

Компьютерный анализ окрашенных EdU клеток проводился по аналогичной процедуре, как и для митозов. Для анализа событий репликации ДНК было посчитано количество этих событий на каждые 50 микрон в каждой ткани корня по отношению к общему числу событий репликации ДНК в ткани (ДНКР). Усредняя распределение событий репликации ДНК по 10 корням, мы обнаружили, что в отличие от митотической активности у ДНКР нет «общего» максимума для всех тканей. Но, как и в случае с митозами, наблюдается неравномерное распределение событий репликации ДНК по различным тканям кончика корня (рис. 3.6).

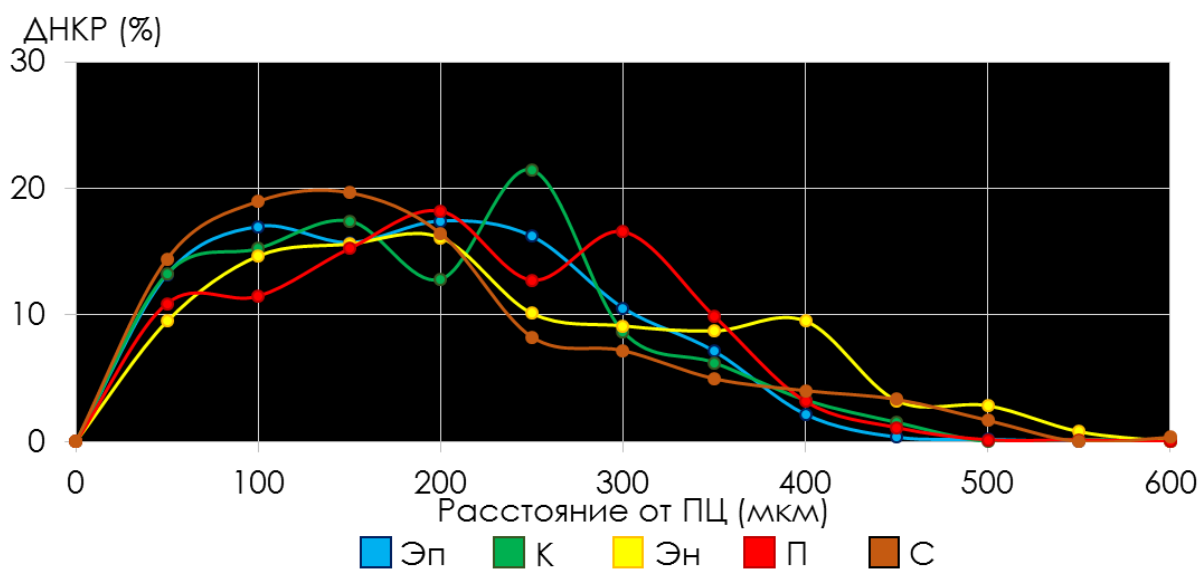


Рисунок 3.6. Распределения событий репликации ДНК по ткани. По горизонтали отложено расстояние от ПЦ вдоль центральной оси корня (координата z) в мкм, по вертикали ДНКР в %. Где «Эп» – эпидермис; «К» – кортекс; «Эн» – эндодермис; «П» – перицикл; «С» – сосудистая ткань. $n=4$.

Кроме распределения событий митоза и репликации ДНК по тканям, мы посчитали расстояние от ПЦ до последней клетки, окрашенной EdU в разных тканях. В результате были выявлены значимые отличия в клетках эндодермиса и сосудистой ткани. В этих тканях длины доменов, в которых клетки способны к репликации ДНК увеличены по сравнению с эпидермисом и кортексом (рис. 3.7А). Кроме того, мы показали, что выход клеток из цикла в транзитном домене, или эндоредупликация, описанная в работе Hayashi et al.

(2013) для клеток кортекса и эпидермиса, характерен для всех тканей корня. Мы показали, что во всех тканях корня события репликации ДНК наблюдаются после окончания митозов – последнее событие репликации ДНК расположены более чем на 150мкм дальше последнего митоза для каждой ткани (рис. 3.7Б).

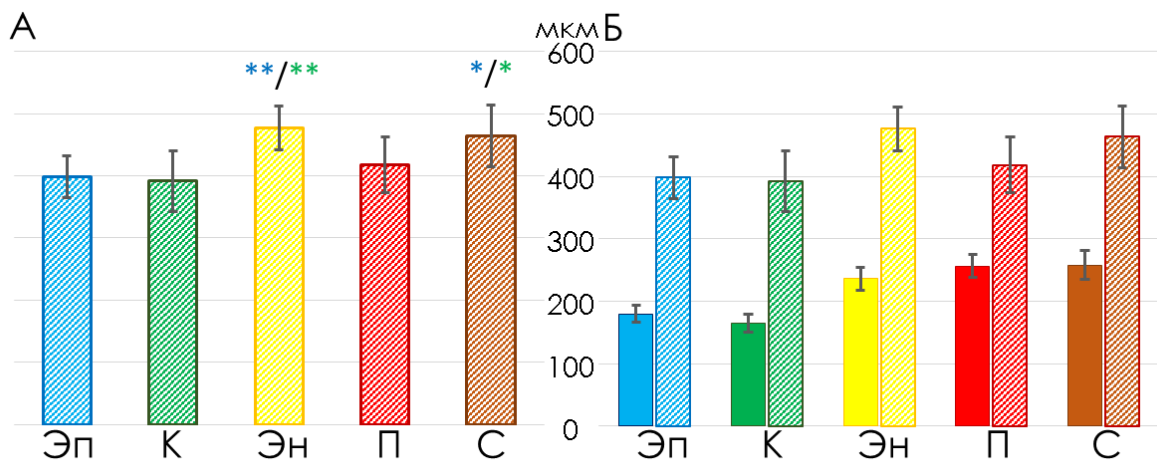


Рисунок 3.7. Длина зон событий репликации ДНК в различных тканях корня.

А. По вертикали отложено расстояние от ПЦ до последнего события репликации ДНК в ткани в мкм. Статистические различия определены согласно Уэлч *t*-тесту, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Б. Эндоредупликация во всех тканях корня – последние события репликации ДНК (штриховка) располагаются более чем на 150мкм дальше последнего митоза в каждой ткани. На гистограммах обозначены доверительные интервалы с 95% надежностью. $n=10$. По горизонтали на гистограммах представлены ткани корня: «Эп» – эпидермис; «К» – кортекс; «Эн» – эндодермис; «П» – перицикл; «С» – сосудистая ткань.

Таким образом, первичный компьютерный анализ показал, что и митозы, и события репликации ДНК действительно распределены неравномерно по различным тканям кончика корня, что может свидетельствовать об адекватности предсказаний модели. Этот вопрос будет исследован подробнее в следующих разделах.

3.3. Верификация предсказаний модели

Для оценки статистической достоверности наблюдаемых различий в разных тканях корня мы посчитали расстояние от ПЦ до последнего митоза и последней окрашенной EdU клетки в каждой из исследуемых тканей. Имея полное трехмерное сканирование корня, мы можем корректно определить такое расстояние, в отличие от ситуации, когда исследуют двумерные изображения. Система iRoCS, в которой мы аннотируем корни, позволяет оценивать такие расстояния очень точно, даже для сильно изогнутых корней, как проекции на центральную ось корня, которая автоматически строится программой.

В ходе компьютерного анализа экспериментальных данных о пролиферационной активности в тканях кончика корня пятидневных проростков *Arabidopsis thaliana* были найдены подтверждения всех предсказаний модели (предсказания см. в разделе 2.6).

3.3.1. Проверка предсказания 1. Увеличение потока ауксина со стороны побега приведёт к сокращению размеров домена событий репликации ДНК

Известно, что распределению ауксина в тканях проксимальной меристемы и градиенты концентраций ауксина в разных тканях корня отличаются (раздел 1.4, Liao et al., 2015).

Модель предсказывает, что неравномерное распределения потоков ауксина со стороны побега должно вызвать неравномерное окончание событий репликации ДНК (см. раздел 2.5.1). В сосудистом цилиндре наибольший поток и наибольшая концентрация ауксина наблюдаются в протофлоэме, клетки которой, дифференцируясь, образуют флоэму. Кроме того, показано, что большие различия в концентрации ауксина наблюдаются в метаксилеме и протоксилеме по сравнению с прокамбием (Bishop et al., 2011), поэтому мы решили провести детальную аннотацию этих тканей. Сосудистый цилиндр *Arabidopsis thaliana* имеет диархное строение, даже в меристеме

можно увидеть специализацию тканей протофлоэмы и протоксилемы, метаксилемы и прокамбия (рис. 3.8А). Используя характерную особенность клеток протофлоэмы (по мере дифференцировки клетки протофлоэмы теряют ядро (Truernit et al., 2012)), мы смогли идентифицировать на карте все ткани сосудистого пучка (см. раздел 3.1.2.).

Мы посчитали расстояние от ПЦ до последней клетки в S-фазе в каждой из тканей сосудистой системы (рис. 3.8В). И обнаружили, что действительно в протофлоэме первой прекращаются события репликации ДНК, затем они завершаются в протоксилеме, затем в метаксилеме. Самые дальние от ПЦ события репликации ДНК наблюдаются в прокамбии.

Как описано в главе 1, ауксин от побега к корню течет по флоэме вместе с питательными веществами и по ксилемной паренхиме с помощью активного транспорта. Таким образом, во флоэмных и ксилемных пучках должен наблюдаться повышенный уровень ауксина, а значит, согласно модели, в связи с тем, что повышенный уровень концентрации ауксина ингибирует G1/S переход, в инициалах этих пучков длина доменов S-фаз должна быть меньше, чем в соседних тканях (рис. 3.8Б). Полученные нами экспериментальные данные подтверждают первое предсказание модели. Экспериментально найденные различия в длине зон событий ДНК у арабидопсиса показаны нами впервые.

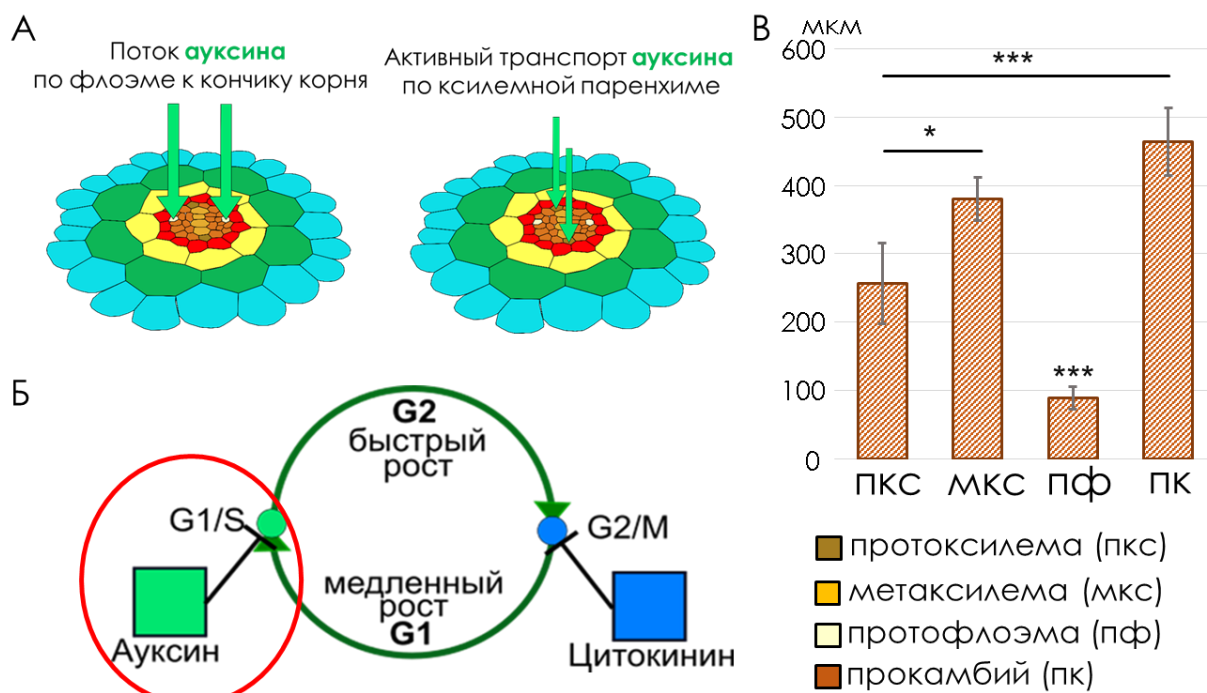


Рисунок 3.8. Различия в дальности появления последних событий репликации ДНК клеток сосудистой ткани – подтверждение первого предсказания модели. А. Потоки ауксина в сосудистой ткани. Б. Регуляция G1/S перехода согласно модели. В. Расстояние до последнего события репликации ДНК с сосудистой ткани в мкм. По вертикали отложено расстояние от ПЦ до последнего события репликации ДНК в ткани в мкм. По горизонтали представлены подтипы сосудистой ткани корня: «пкс» – протоксилема; «мкс» – метаксилема; «пф» – протофлоэма; «пк» – прокамбий. На гистограмме обозначены доверительные интервалы с 95% надежностью. $n=10$. Статистические различия определены согласно Уэлч t -тесту, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, с поправкой Бонферрони на множественное сравнение.

3.3.2. Проверка предсказания 2. Увеличение потока цитокинина со стороны побега приведёт к сокращению размера пролиферационного домена

Согласно предсказанию модели, неравномерное распределение цитокинина на границе меристемы должно привести к различиям в расстояниях до последнего митоза в разных тканях. Используя опубликованные данные о механизмах синтеза и транспорта цитокинина, мы можем предположить в каких именно тканях расстояние до последнего митоза будет максимальным, а в каких минимальным.

3.3.2.1. Внешние слои корня заканчивают делиться раньше внутренних

Цитокинин-чувствительная репортерная конструкция высоко экспрессируется в транзитном домене эпидермиса (рис. 3.9, Zurcher, Muller, 2016), что свидетельствует о том, что на границе меристемы концентрация цитокинина во внешних слоях выше, чем во внутренних.



Рисунок 3.9. Схема сигнала цитокинин-чувствительной репортерной конструкции TCSn (Zurcher, Muller, 2016).

Мы сравнили расстояния до последнего митоза в радиальных слоях корня и сосудистом цилиндре. В результате были выявлены значимые отличия: в клетках эндодермиса, перидермы, сосудистой ткани расстояние до последнего митоза было более чем на 25% больше, чем в эпидермисе и кортексе (рис. 3.10). В соответствии с моделью неравномерность распределения цитокинина действительно приводит к неравномерному распределению митозов и к неодинаковым верхним границам зон пролиферационной активности.

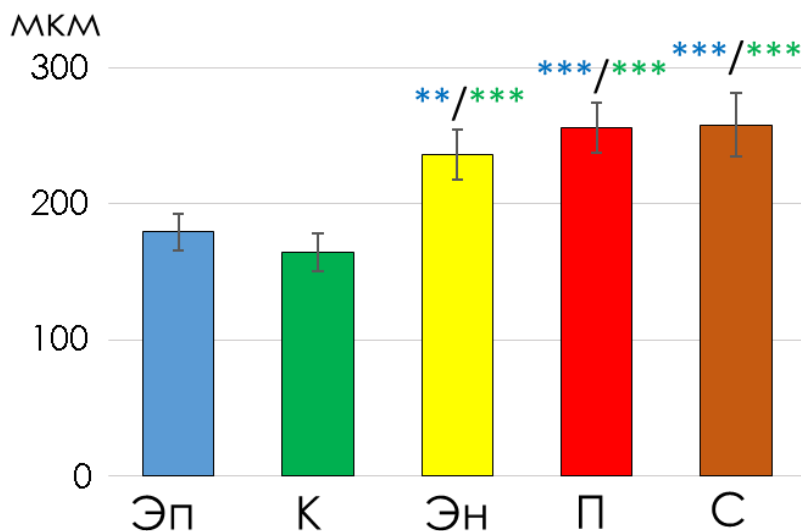


Рисунок 3.10. Длина зон митотической активности в различных тканях корня. По горизонтали представлены ткани корня: «Эп» – эпидермис; «К» –

кортекс; «Эн» – эндодермис; «П» – перицикл; «С» – сосудистая ткань. По вертикали отложено расстояние до последнего митоза в ткани в мкм. На гистограмме обозначены доверительные интервалы с 95% надежностью. $n=10$. Статистические различия определены согласно Уэлч t-тесту, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, с поправкой Бонферрони на множественное сравнение.

3.3.2.2. Особенности транспорта и синтеза цитокинина в сосудистой системе влияют на распределение митозов

Цитокинин от побега к корню течет по флоэме вместе с питательными веществами и синтезируется на протоксилемных полюсах и метаксилеме (Bishopp et al., 2011) (рис. 3.13А). То есть во флоэмных, ксилемных пучках и в метаксилеме должен наблюдаться повышенный уровень цитокинина, а значит, в этих пучках митозы должны заканчиваться раньше, чем в прокамбии (рис. 3.11Б). Это подтвердил наш анализ экспериментальных данных, в котором мы посчитали расстояние от ПЦ до последнего митоза в протофлоэме, протоксилеме, метаксилеме и прокамбии (рис. 3.11В).

Оказалось, что протофлоэма заканчивает пролиферационную активность уже после нескольких делений. Протоксилема и метаксилема поддерживают свою пролиферативную активность немного дольше, на всё же меньше, чем это делают эпидермис и кортекс. В свою очередь митозы 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 митозов у арабидопсиса показаны нами впервые.

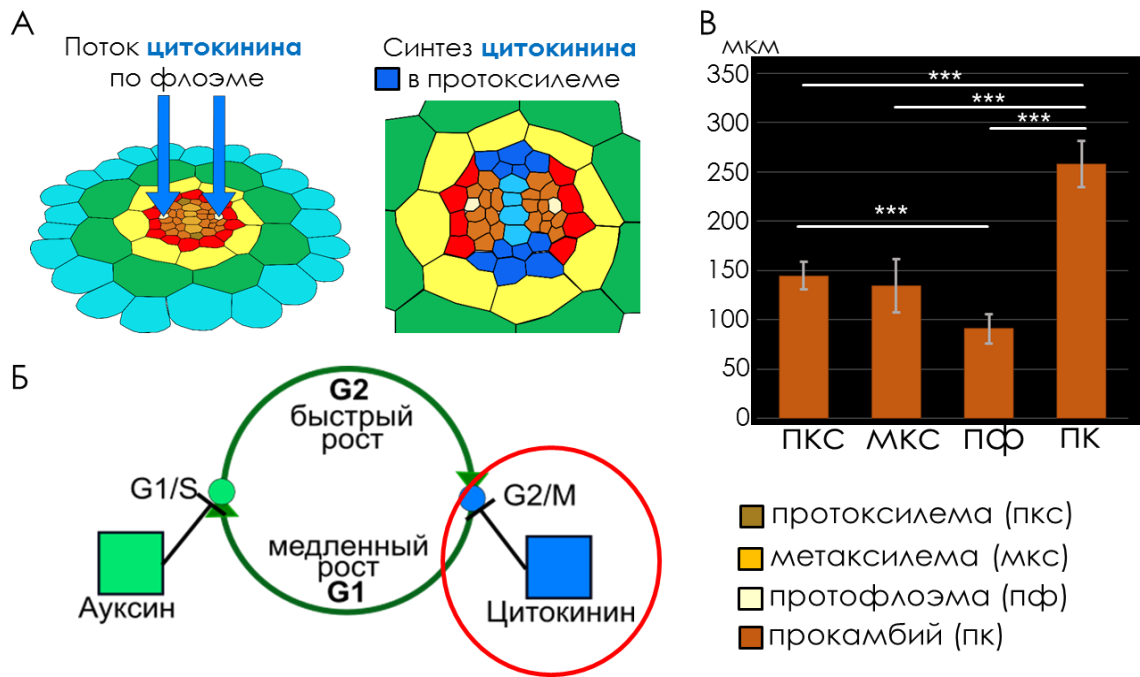


Рисунок 3.11. Различия в распределении митозов в сосудистой ткани – подтверждение второго предсказания модели. А. Поток цитокинина по флоэме и его синтез в сосудистой ткани. Б. Регуляция G2/M перехода согласно модели. В. Длины зон митозов в сосудистой ткани. По вертикали отложено расстояние от ПЦ до последнего митоза в ткани в мкм. По горизонтали представлены подтипы сосудистой ткани корня: «пкс» – протоксилема; «мкс» – метаксилема; «пф» – протофлоэма; «пк» – прокамбий. На гистограмме обозначены доверительные интервалы с 95% надежностью. $n=10$. Статистические различия определены согласно Уэлч t-тесту, $*** p < 0,001$, с поправкой Бонферрони на множественное сравнение.

3.3.3. Проверка предсказания 3. Формирование меристемы у мутантов с дефицитом цитокинина и нарушениями передачи сигнала цитокинина

Модель предсказала, что снижение концентрации цитокинина, вызванное снижением его синтеза, 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 (см. раздел 2.5.3). Для проверки этого предположения модели было предложено проанализировать мутантов арабидопсиса с пониженным синтезом цитокинина *ipt3ipt5ipt7* (Miyawaki et al., 2006) и мутантов с нарушениями в

передаче сигнала цитокинина *arr12-1* (Mason et al., 2004). Известно, что гены синтеза цитокинина *ipt3*, *ipt5*, *ipt7* (Miyawaki et al., 2004) и ответа на цитокинин *arr12* (Mason et al., 2004) экспрессируются в корне (рис. 3.13).

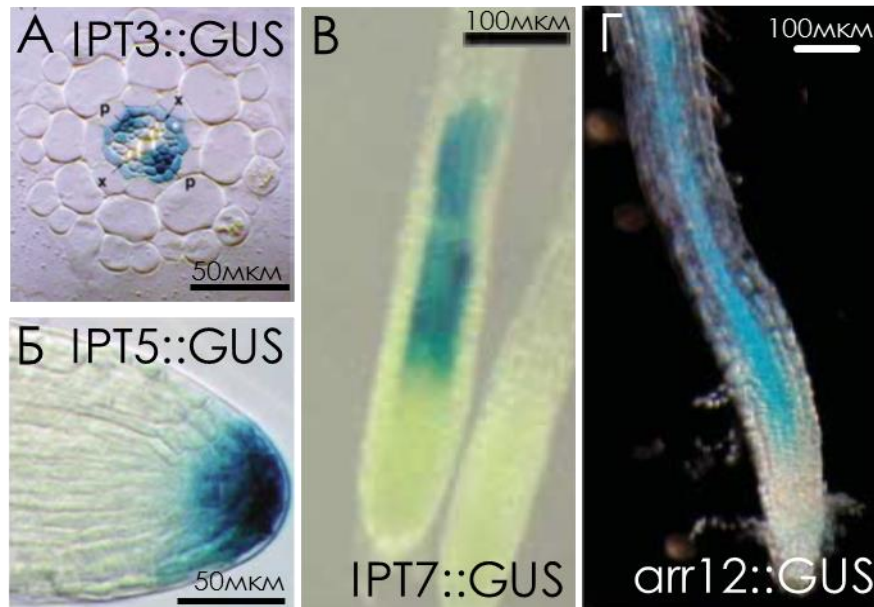


Рисунок 3.13. Экспрессия генов синтеза цитокинина и ответа на цитокинин. А. Экспрессия *ipt3* в клетках протофлоэмы. Б. Экспрессия *ipt5* в клетках колумеллы и бокового корневого чехлика. В. Экспрессия *ipt7* в клетках эндодермиса в зоне растяжения. Г. Экспрессия *arr12* в зоне растяжения.

Аналогично корням дикого типа, изображения с конфокального микроскопа были проаннотированы в программе iRoCs, вычислены расстояния от клеток ПЦ до последних событий репликации ДНК и митозов. Проведено сравнение этих расстояний между группами корней дикого типа и мутантами. Результаты анализа распределения митозов в корнях мутантных растений *ipt3ipt5ipt7* и *arr12-1* показали значимое увеличение длины пролиферационного домена (рис. 3.14). На рисунке представлена гистограмма увеличения расстояния до последнего митоза в процентах относительно контроля (дикого типа арабидопсиса). Мы показали, что почти во всех тканях произошло значимое увеличение пролиферационного домена.

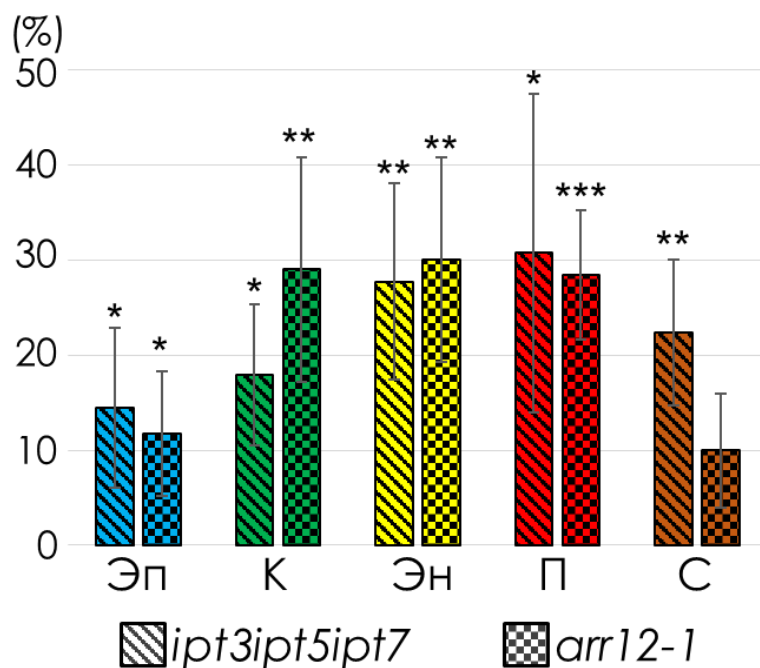


Рисунок 3.14. Верификация третьего предсказания модели – значимое увеличение длины домена пролиферации в сторону побега в корнях мутантных растений *ipt3ipt5ipt7* и *arr12-1*. По горизонтали представлены ткани корня: «Эп» – эпидермис; «К» – кортекс; «Эн» – эндодермис; «П» – перицикл; «С» – сосудистая ткань. По вертикали процент увеличения длины домена пролиферации по отношению к дикому типу. На гистограмме обозначены доверительные интервалы с 95% надежностью. $n=10$, $m=4$, $m=4$. Статистические различия определены согласно Уэлч t-тесту, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

3.4. Новые знания о пролиферационной активности в тканях корня *A. thaliana*.

Помимо подтверждения предсказаний модели, в результате анализа распределения митозов в корнях пятидневных проростков *Arabidopsis thaliana* были получены новые знания о дифференцировке различных тканей меристемы корня.

3.4.1. Билатеральная симметрия пролиферационной активности в эндодермисе и перицикле.

Наблюдая диархную симметрию пролиферационной активности в сосудистой ткани корня, мы предположили, что окружающий её перицикл

тоже может обладать симметрией. В работе Parizot et al. (2008) было показано, что клетки перицикла на протоксилемном полюсе сохраняют способность к делению в зоне дифференцировки корня, тогда как клетки перицикла на протофлоэмном полюсе такой способностью не обладают. В их работе была использована репортёрная линия Rm1007, в которой три ряда клеток перицикла в кончике корня, окружающих протоксилему, экспрессируют GFP белок. Авторы работы продемонстрировали, что эти клетки дифференцируются очень рано в развитии корня.

Мы проаннотировали ряды клеток эндодермиса и перицикла, находящиеся на протофлоэмном (ФП) и протоксилемном (КсП) полюсах (рис. 3.15А). Анализ распределения митозов в перицикле показал раннюю специализацию клеток перицикла на протофлоэмном полюсе ($p < 0,01$ согласно тесту Уэлча), в сравнении с остальными клетками перицикла (рис. 3.15Б). Такие различия наблюдаются и у других растений, например, у пшеницы (Демченко, 1990) и у бобов (Luxova, Murin, 1973). В работе Parizot et al. (2008) не выделялись клетки перицикла, прилежащие к прокамбию, или неполюсные клетки (нП), а напротив они относились к протофлоэмным полюсам. Однако мы показали, что клетки неполюсных рядов перицикла по пролиферационной активности больше похожи на клетки перицикла на протоксилемном полюсе. Полученные нами данные могут объяснить те изменения, которые наблюдались авторами Parizot et al. (2008) при обработке ауксином: неполюсные клетки перицикла начинали делиться периклинально в зоне созревания в отличие от клеток перицикла протофлоэмного полюса.

Мы показали, что эндодермис тоже обладает билатеральной симметрией в распределении митозов. Клетки на протофлоэмных полюсах перестают делиться раньше, чем клетки как на протоксилемном полюсе, так и в рядах клеток, не относящихся к этим полюсам (рис. 3.15В). Такая симметрия пролиферационной активности нигде ранее не была описана, и была обнаружена благодаря применённым методам анализа трехмерных изображений. Такая динамика может быть объяснена экспрессией *LOG4*,

который кодирует фермент биосинтеза цитокинина, и согласно de Rybel et al. (2014) экспрессируется в клетках протоксилемы, а также прилежащим к ним клеткам перицикла и эндодермиса.

Мы не обнаружили билатеральной симметрии распределения митозов ни в кортексе, ни в эпидермисе, вероятно это связано с тем, что перераспределение гормонов от сосудистых полюсов на поперечном сечении корня достигает не всех тканей.

Суммируя, наши данные свидетельствуют о том, что ткани меристемы имеют различную симметрию. Сосудистая ткань имеет диархную симметрию, перицикл и эндодермис – билатеральную, кортекс и эпидермис – радиальную.

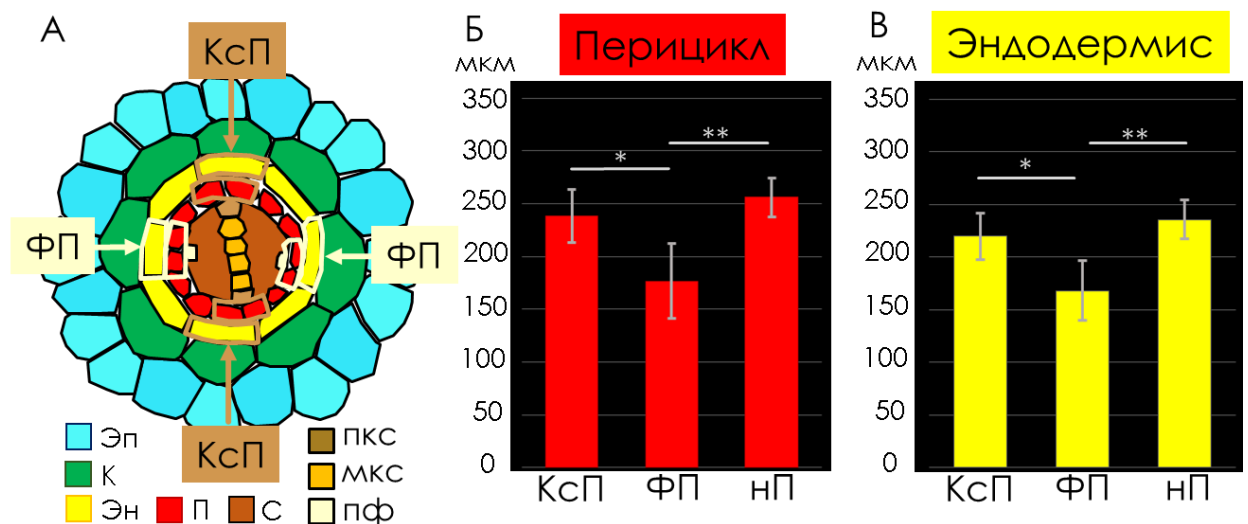


Рисунок 3.15. Билатеральная симметрия пролиферационной активности в эндодермисе и перицикле. А. Схема поперечного среза корня *A. thaliana* с обозначением протофлоэмных (ФП) и протоксилемных (КсП) полюсов в эндодермисе и перицикле. Б. Длины зон пролиферационной активности в перицикле на полюсах и неполюсных рядах клеток (НП). В. Длины зон пролиферационной активности в эндодермисе на полюсах и неполюсных рядах клеток. «Эп» – эпидермис; «К» – кортекс; «Эн» – эндодермис; «П» – перицикл; «С» – сосудистая ткань. На гистограмме обозначены доверительные интервалы с 95% надежностью. $n=10$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ согласно тесту Уэлча.

3.4.2. Проллиферационный и транзитный домены меристемы

В своей работе 2013г Иванов и Дубровский предположили, что нижняя граница транзитного домена должна быть определена в вероятностных терминах, связанных с расстоянием от ПЦ, где клетки имеют относительно низкую или нулевую вероятность вхождения в митотический цикл. Верхняя (shootward) граница транзитного домена была определена как точка перехода к быстрому удлинению, но в других исследованиях она обычно не учитывается. Имея полную карту ядер с распределением митозов, мы смогли определить обе границы непосредственно в каждом отдельном корне.

При анализе распределения митозов в кончике корня мы заметили, что клетки протофлоэмы могут делиться непосредственно перед дифференцировкой (рис. 3.16).

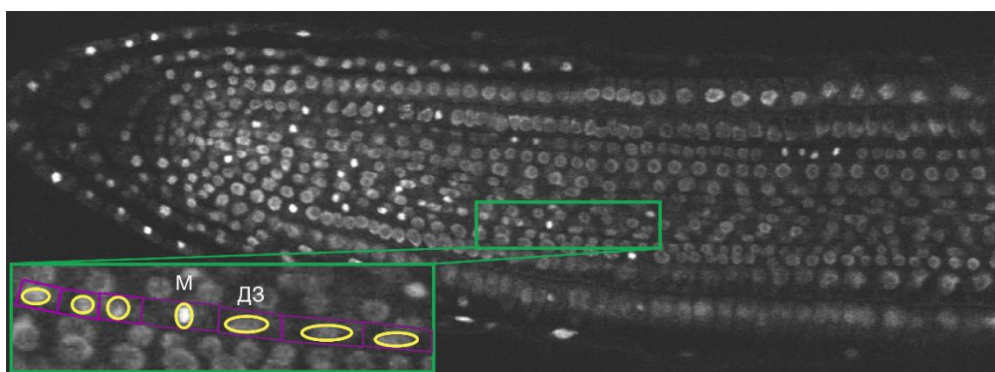


Рисунок 3.16. Дифференцировка протофлоэмы. Последний митоз (М, на увеличенном изображении) в ряду клеток протофлоэмы может происходить непосредственно перед началом дифференцировки, дезинтеграцией ядра (дз, на увеличении) (изображение предоставлено Тарасом Пастернаком).

Согласно нашему анализу клетки протофлоэмы раньше всех прекращают деления (рис. 3.11В), а значит мы можем считать клетку протофлоэмы, которая находится непосредственно клеткой, начавшей дифференцировку, последней среди делящихся клеток протофлоэмы. Именно переход протофлоэмы к дифференцировке определяет верхнюю границу пролиферационного домена и нижнюю границу транзитного домена. Нижняя граница пролиферационного домена находится в ПЦ. Верхняя граница транзитного домена определяется там, где все клетки заканчивают делиться,

т.е. самый дальний митоз от ПЦ, который находится в сосудистой ткани. Таким образом, нижнюю границу транзитного домена следует определять по протофлоэме, где её клетки приступают к дифференцировке, теряя ядро, а верхнюю границу – по самому дальнему от ПЦ митозу в центральном цилиндре. Тогда используемая в настоящее время граница меристемы, определяемая по кортексу, указывает на середину транзитного домена (рис. 3.17). Кроме того, мы показали, что верхняя и нижняя границы транзитного домена хорошо согласуются с границами первого и второго слоев бокового чехлика (рис. 3.17Б). Эти данные предоставляют ещё более простой способ определения границ транзитного домена просто по его морфологии.

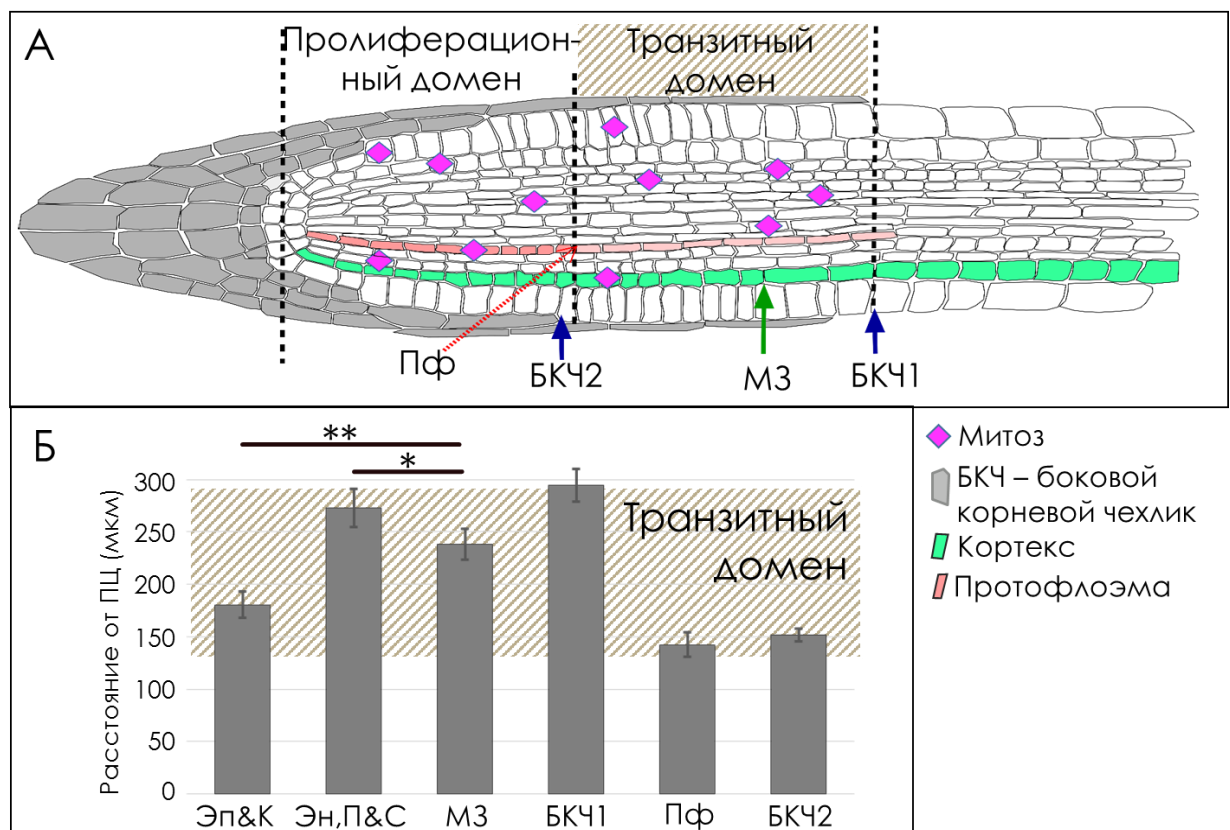


Рисунок 3.17. Определение границ доменов меристемы корня *Arabidopsis thaliana*. А. Схема зонирования корня. Пролиферационный домен заканчивается с началом дифференцировки клеток протофлоэмы. Транзитный домен определяется окончанием делений в протофлоэме и центральном цилиндре. Длина внутреннего и внешнего слоев бокового корневого чехлика совпадет с границами транзитного домена. Б. Оценка длины АМК с использованием разных маркеров. Эп & К положение последнего митоза во внешних тканях (эпидермис и кортекс); Эн, П & С, положение последнего митоза в эндодермисе, перицикле и сосудистой ткани;

МЗ, граница меристематической зоны, оцененная кортексу; БКЧ1, положение последней клетки с ядром внешнего слоя БКЧ; Пф, положение последней клетки протофлоэмы с ядром; БКЧ2, положение последней клетки с ядром внутреннего слоя БКЧ. На гистограмме обозначены доверительные интервалы с 95% надежностью. $n=10$. Статистические различия определены согласно Уэлч t -тесту, * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

3.5. Заключение по анализу экспериментальных данных

Во второй главе настоящей работы сделаны предсказания о различиях в пролиферационной активности отдельных тканей корня. Для проверки этих гипотез нами был спланирован эксперимент, проводилось его экспертное сопровождение и компьютерный анализ результатов с применением новейших технологий. До 1990 года митотическая активность в АМК была описана у многих видов растений (Ivanov, Dubrovsky, 2013). Несмотря на то, что арабидопсис является модельным объектом в генетике растений, детальный анализ пролиферационной активности в его меристеме корня ранее не проводился. Считалось, что меристема арабидопсиса имеет очень простое строение и клетки разных тканей заканчивают в ней деления и приступают к дифференцировке случайным образом.

В большинстве работ по митотической активности в АМК ключевые фазы клеточного цикла изучались с использованием двумерных изображений. Такой подход был основным препятствием для исследования трехмерной структуры корня растения. Применение программы iRoCS Toolbox (Schmidt et al., 2014) вместе с улучшенным экспериментальным протоколом для обнаружения митозов в тканях (Pasternak et al., 2015) позволило нам подтвердить предсказания модели, при этом получив новые знания о структуре меристемы корня.

В результате работы получены трёхмерные реконструкции распределения ядер клеток, находящихся в фазах репликации ДНК и митоза в кончиках корней пятидневных проростков в норме и в мутантах *ipt3ipt5ipt7*, *arr12*. Трёхмерные реконструкции позволили верифицировать предсказания

модели и получить новые знания о билатеральной симметрии пролиферационной активности в тканях эндодермиса и перицикла и диархной симметрии пролиферационной активности в сосудистых тканях. Кроме того, предложено определять границы транзитного и пролиферационного доменов как по распределению митозов, так и по морфологии бокового корневого чехлика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая диссертационная работа представляет результаты системного анализа данных по механизмам регуляции поддержания ниши стволовых клеток в меристеме корня фитогормонами ауксином и цитокинином (см. главу 1). Первый этап работы состоял в логическом анализе многообразия опубликованных данных и решения обратной логической задачи о минимальном регуляторном контуре, контролирующем клеточный цикл в меристеме корня (см. главу 2). На втором этапе проводился анализ достаточности и непротиворечивости выявленного регуляторного контура с помощью математического моделирования (см. главу 2). В процессе работы с математической моделью были сформулированы гипотезы и численные прогнозы, которые были проверены с использованием новых экспериментальных данных, сгенерированных группой под руководством Клауса Пальме (Германия) по предложенным нами схемам (см. главу 3).

В качестве отправной точки мы использовали имеющиеся в литературе данные о динамике структуры меристемы с одной стороны и о роли фитогормонов в регуляции клеточного цикла с другой стороны. Это позволило нам сформулировать обратную задачу (рис. 2.1): выбрать входные и выходные данные, принять ряд допущений для уменьшения комбинаторной сложности задачи. В результате опираясь на данные о распределении фитогормонов в корне, мы смогли подобрать минимальный контур регуляции клеточного цикла фитогормонами, который хорошо согласовывался с данными о клеточной динамике в меристеме корня (рис. 2.3А).

На следующем этапе с помощью математического моделирования, в работе было протестировано как этот контур реализуется в динамической системе, где клетки растут и делятся в зависимости от перераспределения фитогормонов. Сначала мы провели моделирование самоорганизации распределений ауксина и цитокинина вдоль (не растущего) корня, имеющего постоянное число клеток, и выбрали значения параметров, при которых наблюдается распределение ауксина в корне, аналогично описанному ранее

(Grieneisen et al., 2007; Mironova et al., 2010), а также экспериментально наблюдаемое распределение цитокинина (Zürcher et al., 2013) (рис. 2.5).

Далее мы исследовали достаточность механизма гормональной регуляции клеточного цикла для зонирования АМК, в соответствии с экспериментальными данными. В численном расчете модели растущего корня мы наблюдали формирование в градиентах концентрации ауксина и цитокинина трех доменов клеток с принципиально-различающейся клеточной динамикой. Из расчетов модели следует, что пролиферационный домен формируется и сохраняется на всем протяжении моделирования между максимумом концентрации ауксина с одной стороны и максимумом концентрации цитокинина с другой (рис. 2.10). Такой механизм формирования пролиферационного домена во времени показан нами впервые.

Исследование математической модели при варьировании параметров позволило нам сделать три предсказания, которые можно было проверить экспериментально. С этой целью мы спланировали эксперимент, проведение которого на *Arabidopsis thaliana* взяли на себя наши коллеги из Университета Фрайбурга. Мы также проводили его экспертное сопровождение, компьютерный и статистический анализ экспериментальных данных. Для проверки первого предсказания модели о сокращении размера домена событий репликации ДНК вследствие увеличения потока ауксина со стороны побега были получены трехмерные реконструкции распределения окрашенных EdU ядер клеток в кончиках корней *A. thaliana*. Компьютерный анализ экспериментальных изображений показал значимые различия в размерах доменов событий репликации ДНК в тканях сосудистой системы: минимальным был домен в протофлоэме, а максимальный в прокамбии.

Для проверки второго предсказания модели о сокращении размера пролиферационного домена вследствие увеличения потока цитокинина со стороны побега были получены трехмерные реконструкции распределения ядер клеток в фазе митоза в кончиках корней *A. thaliana*. Компьютерный анализ экспериментальных изображений показал значимые различия в расстояниях

до последнего митоза между внутренними (энтодермис, центральный цилиндр) и внешними тканями корня (эпидермис, кортекс). Значимые различия были обнаружены в тканях сосудистой системы: оказалось, что протофлоэма заканчивает пролиферационную активность раньше других тканей, затем протоксилема и метаксилема, и позже всех других тканей заканчивает деления прокамбий. Результаты, полученные нами на *A.thaliana* для распределения митозов и событий репликации ДНК, были качественно подтверждены на табаке (Pasternak et al., 2017).

Для проверки третьего предсказания модели об увеличении пролиферационного домена меристемы вследствие снижения концентрации цитокинина в корне или снижения чувствительности клеток к цитокинину, было проведено исследование митотической активности в кончиках корней мутантных растений *ipt3ipt5ipt7*, *arr12*. Сравнительный анализ карт распределений митозов в кончиках корней дикого типа и мутантов подтвердил увеличение длины пролиферационного домена меристемы в последних.

В результате компьютерного анализа данных, были получены новые знания о структуре меристемы *A.thaliana*. Так было обнаружено, что пролиферационная активность в сосудистом цилиндре имеет диархную симметрию, в перицикле и энтодермисе билатеральную, а в эпидермисе и кортексе радиальную. Кроме того, полученные данные позволили впервые определить верхнюю и нижнюю границы транзитного домена меристемы корня как по распределению митозов в тканях сосудистой системы, так и по морфологии бокового корневого чехлика.

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; пролиферационный 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 корня, ранее показанное в экспериментах, должно приводить к различиям в распределении событий репликации ДНК. Предсказание подтверждено экспериментально: репликация ДНК заканчивается сначала в клетках протофлоэмы, затем протоксилемы, метаксилемы и, наконец, прокамбия.
- 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.

б) Модель предсказала увеличение длины пролиферационного домена меристемы корня при снижении синтеза цитокинина или снижении чувствительности клеток к цитокинину. Предсказание подтверждено экспериментально при анализе кончиков корней мутантов *ipt3ipt5ipt7* и *arr12* у *A. thaliana*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демченко Н.П. Зависимость последовательности ингибирования переходов клеток перицикла и ксилемы к синтезу ДНК и делению от их локализации в корне пшеницы // Цитология. 1990. Т. 32(3). С. 209–219.
2. Доброчаев А.Е., Иванов В.Б. Стохастическая модель пролиферации клеток в одном продольном ряду клеток // Онтогенез. 1999. Т. 30. С. 192–204.
3. Додуева И.Е., Творогова В.Е., Азарахш М., Лебедева М.А., Лутова Л.А. Стволовые клетки растений: единство и многообразие // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20(4). С. 441–458.
4. Зубаирова У.С., Голушко С.К., Пененко А.В., Николаев С.В. L-система для моделирования плоских одномерно растущих растительных тканей // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18(4/2). С. 945–952.
5. Иванов В.Б. Проблема стволовых клеток у растений // Онтогенез. 2003. Т. 34. С. 253–261.
6. 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). С. 797–806.
7. Медведев С.С. Физиология растений. – СПб., БХВ-Петербург, 2013.
8. Миронова В.В. Компьютерное исследование роли ауксина в молекулярно-генетической регуляции развития корня растений: дис. ...канд./д-ра биол. наук. ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, 2010.
9. Николаев С.В., Зубаирова У.С., Фадеев С.И., Мйолснесс Э., Колчанов Н.А. Исследование одномерной модели регуляции размеров возобновительной зоны в биологической ткани с учетом деления клеток // СибЖИМ. 2010. Т. 13(4). С. 70–82.
10. Новикова Г.В., Носов А.В., Степанченко Н.С., Фоменков А.А., Мамаева А.С., Мошков И.Е. Пролиферация клеток растений и её регуляторы // Физиология растений. 2013. Т. 60(4). С. 1–8.

11. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов // М.: Медицина, 1996. 544 с.
12. Adachi S., Minamisawa K., Okushima Y., Inagaki S., Yoshiyama K. et al. Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011. V. 108. P. 10004–10009.
13. Baluska F., Kubica S., Hauskrecht M. Postmitotic 'isodiametric' cell growth in the maize root apex // Planta. 1990. V. 181. P. 269–274.
14. Baluska F., Mancuso S., Volkmann D., Barlow P.W. Root apex transition zone as oscillatory zone // Trends in plant science. 2010. V. 15(7). P. 402–408.
15. Barlow P.W. Stem cells and founder zones in plants, particularly their roots // In Stem Cells / Ed. C.S. Potten. L.: Acad. Press, 1997. P. 29–57.
16. Barrio R.A., Romero-Arias J.R., Noguez M.A., Azpeitia E., Ortiz-Gutiérrez E. et al. Cell patterns emerge from coupled chemical and physical fields with cell proliferation dynamics: the *Arabidopsis thaliana* root as a study system // PLoS computational biology. 2013. V. 9(5). e1003026.
17. Beemster G.T.S., Baskin T.I. *STUNTED PLANT 1* mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2000. V. 124(4). P. 1718–1727.
18. Benfey P.N., Scheres B. Root development // Current Biology. 2000. V. 10(22). P. 813–815.
19. Berger F., Hung C.-Y., Dolan L., Schiefelbein J. Control of Cell Division in the Root Epidermis of *Arabidopsis thaliana* // Dev. Biol. 1998. V. 194. P. 235–245.
20. Bishopp A., Lehesranta, S., Vaten, A., Help H., El-Showk S et al. Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem // Curr. Biol. 2011. V. 21. P. 927–932.
21. Bhalerao R.P., Eklöf J., Ljung K., Marchant A., Bennett M., Sandberg G. Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings // The Plant Journal. 2002. V. 29(3). P. 325–332.

22. Blakeslee A.F., Avery A.G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants: by treatment with colchicine // *Journal of Heredity*. 1937. V. 28(12). P. 393–411.
23. Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I. et al. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots // *Nature*. 2005. V. 433(7021). P. 39–44.
24. Boruc J., van den Daele H., Hollunder J., Rombauts S., Mylle E. et al. Functional Modules in the *Arabidopsis* Core Cell Cycle Binary Protein–Protein Interaction Network // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 1264–1280.
25. Brunoud G., Wells D.M., Oliva M., Larrieu A., Mirabet V. et al. A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution // *Nature*. 2012. V. 482. P. 103–106.
26. Burkhardt D.L., Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene // *Nat. Rev. Cancer*. 2008. V. 8(9). P. 671–682.
27. Burstrom H.G. Tissue tensions during cell elongation in Wheat roots and a comparison with contractile roots // *Physiologia Plantarum*. 1971. V. 25. P. 509–513.
28. Campanoni P., Nick P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways // *Plant Physiol*. 2005. V. 137. P. 939–948.
29. Casamitjana-Martinez E., Hofhuis H.F., Xu J., Liu C.M., Heidstra R., Scheres B. Root-specific CLE19 overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of *Arabidopsis* root meristem maintenance // *Current Biology*. 2003. V. 13(16). P. 1435–1441.
30. Cho H.-J., Kwon H.-K., Wang M.-H. Expression of Kip-Related Protein 4 gene (KRP4) in response to auxin and cytokinin during growth of *Arabidopsis thaliana* // *BMB Rep*. 2010. V. 43. P. 273–278.
31. Colon-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T., Doerner P. Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein // *Plant J*. 1999. V. 20(4). P. 503–508.

32. Dello Ioio R., Linhares F.S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R. et al. Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. P. 678–682.
33. Dello Ioio R., Nakamura K., Moubayidin L., Perilli S., Taniguchi M. et al. A Genetic Framework for the Control of Cell Division and differentiation in the Root Meristem // *Science*. 2008. V. 322. P. 1380–1384.
34. de Rybel B., Adibi M., Breda A.S., Wendrich J.R., Smit M.E. et al. Integration of growth and patterning during vascular tissue formation in Arabidopsis // *Science*. 2014. V. 345(6197). P. 1255215.
35. de Smet I., Tetsumura T., de Rybel B., Frey N.F., Laplaze L. et al. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis // *Development*. 2007. V. 134(4). P. 681–690.
36. Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S. et al. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root // *Development*. 1993. V. 119. P. 71–84.
37. Dubrovsky J.G., Ivanov V.B. Celebrating 50 years of the cell cycle // *Nature*. V. 426. P. 759.
38. Dubrovsky J.G., Napsucialy-Mendivil S., Duclercq J., Cheng Y. et al. Auxin minimum defines a developmental window for lateral root initiation // *New Phytol.* 2011. V. 191. V. 970–983.
39. Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. // *Nature*. 2005. V. 435(7041). P. 441–445.
40. Emmenlauer M., Ronneberger O., Ponti A., Schwarb P., Griffa A. et al. XuvTools: free, fast and reliable stitching of large 3D datasets // *J. Microsc.* 2009. V. 233. P. 42–60.
41. 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. V. 426(6963). P. 147–153.

42. Goh T., Joi S., Mimura T., Fukaki H. The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins // *Development*. 2012. V. 139. P. 883–893.
43. Grafi G., Florentin A., Ransbotyn V., Morgenstern Y. The stem cell state in plant development and in response to stress // *Frontiers in plant science*. 2011. V. 2. P. 53.
44. Gray W.M., Östin A., Sandberg G., Romano C.P., Estelle M. High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. V. 95(12). P. 7197–7202.
45. Grieneisen V.A., Xu J., Marée A.F., Hogeweg P., Scheres B. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth // *Nature*. 2007. V. 449 (7165). P. 1008–1013.
46. Hayashi K., Hasegawa J., Matsunaga S. The boundary of the meristematic and elongation zones in roots: endoreduplication precedes rapid cell expansion // *Sci. Rep.* 2013. V.3. P. 2723.
47. Heidstra R, Sabatini S. Plant and animal stem cells: similar yet different // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014. V. 15(5). P. 301–312.
48. Howard A., Pelc S.R. Synthesis of Deoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage // *Heredity*. 1953. V. 6. P. 261–273.
49. Hutchison C.E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E. et al. The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 3073–3087.
50. Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression // *The Plant Cell*. 2013. V. 25(9). P. 3159–3173.
51. Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M. et al. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis // *Nature*. 2001. V. 409. P. 1060–1063.
52. Inze D., de Veylder L. Cell Cycle Regulation in Plant Development // *Annu. Rev. Genet.* 2006. V. 4. P. 77–105.

53. Ivanov V.B., Dubrovsky I.G. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions // *Trends in Plant Science*. 2013. V. 18. P. 237–242.
54. Ivanov V.B., Filin A.N. Cytokinins regulate root growth through its action on meristematic cell proliferation but not on the transition to differentiation // *Functional Plant Biology*. 2017. doi.org/10.1071/FP16340.
55. Jones B., Gunnerås S.A., Petersson S.V., Tarkowski P., Graham N. et al. Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 2956–2969.
56. Jonsson H., Heisler M.G., Shapiro B.E., Meyerowitz E.M., Mjolsness E. An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. V. 103(5). P. 1633–1638.
57. Kakimoto T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases // *Plant Cell Physiol*. 2001. V. 42. P. 677–685.
58. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe // *Biotech. Histochem.* 1995. V.70 (5). P. 220–233.
59. Laplaze L., Benkova E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S. et al. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation // *Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 3889–3900.
60. Laux T., Mayer K.F.X., Berger J., Jürgens G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis* // *Development*. 1996. V. 122 P. 87–96.
61. Liao C.-Y., Smet W., Brunoud G., Yoshida S., Vernoux T., Weijers D. Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response // *Nature Methods* 2015. V. 12. P. 207–210.
62. Ljung K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development // *Development*. 2013. V. 140(5). P. 943–950.
63. Luxova Má., Murín A. The extent and differences in mitotic activity of the root tip of *Vicia faba* L. // *Biol. Plant*. 1973. V. 15. P. 37–43.

64. Mähönen A.P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K.M., Kinoshita K. et al. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development // *Science*. 2006. V. 311(5757). P. 94–98.
65. Matsumoto-Kitano M., Kusumoto T., Tarkowski P., Kinoshita-Tsujimura K., Václavíková K. et al. Cytokinins are central regulators of cambial activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 20027–20031.
66. Mason M.G., Li J., Mathews D.E., Kieber J.J., Schaller G.E. Type-B response regulators display overlapping expression patterns in Arabidopsis // *Plant Physiol*. 2004. V. 135. P. 927–937.
67. Merks R.M., Guravage M., Inzé D., Beemster G.T. VirtualLeaf: An open-source framework for cell-based modeling of plant tissue growth and development // *Plant Physiol*. 2011. V.155. P. 656–666.
68. Miller C.O. A kinetin-like compound in maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1961. V. 47. P. 170–174.
69. Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M. Kinetin, a cell division factor from DNA // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. V. 77. P. 1392.
70. Miller C.O., Skoog F., Okumura F.S., Von Saltza M.H., Strong F.M. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division // *J. Am. Chem. Soc.* 1956. V. 78. P. 1375–1380.
71. Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Yosiphon G., Fadeev S.I., Kolchanov N.A., Mjolsness E., Likhoshvai V.A. A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root // *BMC Systems Biology*. 2010. V. 4(98).
72. Mironova V.V., Novoselova E.S., Doroshkov A.V., Kazantsev F.V., Omelyanchuk N.A. 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 (2). P. 349–360.
73. Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate // *Plant J*. 2004. V. 37. P. 128–138.

74. Moubayidin L., Perilli S., Dello Ioio R., Di Mambro R., Costantino P., Sabatini S. The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase // *Curr. Biol.* 2010. V. 20. P. 1138–1143.
75. Mok D.W., Mok M.C. Cytokinin metabolism and action // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. V. 52. P. 89–118.
76. Müller B. Generic signal-specific responses: cytokinin and context-dependent cellular responses // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 3273–3288.
77. Muller B., Sheen J. Cytokinin and auxin interaction in root stem cell specification during early embryogenesis // *Nature.* 2008. V. 453. P. 1094–1097.
78. Muraro D., Wilson M., Bennett M.J. Root Development: Cytokinin Transport Matters, Too! // *Current Biology.* 2011. V. 21(11). P. 423–425.
79. Muraro D., Byrne H., King J., Bennett M. The role of auxin and cytokinin signalling in specifying the root architecture of *Arabidopsis thaliana* // *Journal of theoretical biology.* 2012. V. 317. P. 71–86.
80. Muraro D., Mellor N., Pound M.P., Lucas M., Chopard J. et al. Integration of hormonal signaling networks and mobile microRNAs is required for vascular patterning in *Arabidopsis* roots // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014. V. 111(2). P. 857–862.
81. Novák D., Kuchařová A., Ovečka M., Komis G., Šamaj J. Developmental nuclear localization and quantification of GFP-tagged EB1c in *Arabidopsis* root using light-sheet microscopy // *Frontiers in plant science.* 2016. V. 6. P. 1187.
82. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase // *Nature.* 1990. V. 344(6266). P. 503–508.
83. 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(1). P. 1–12.
84. Orchard C.B., Siciliano I., Sorrell D.A., Marchbank A., Hilary J. et al. Tobacco BY-2 cells expressing fission yeast *cdc25* bypass a G2/M block on the cell cycle // *Plant J.* 2005. V. 44. P. 290–299.
85. Pavlović M, Radotić K. *Animal and Plant Stem Cells.* Springer. 2017. p. 237.

86. 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. V. 146. P. 140–148.
87. Pasternak T., Otvos K., Domoki M., Feher A. Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin // *Plant Growth Regul.* 2007. V. 51. P. 109–117.
88. Pasternak T., Tietz O., Rapp K., Begheldo M., Nitschke R., Ruperti B., Palme K. Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant methods.* 2015. V. 11. P. 1.
89. Pasternak T., Haser T., Falk T., Ronneberger O., Palme K., Otten L. A 3D digital atlas of the *Nicotiana tabacum* root tip and its use to investigate changes in the root apical meristem induced by the *Agrobacterium* 6b oncogene // *The Plant Journal.* 2017. V. 92(1). P. 31–42.
90. Perilli S., Perez-Perez J.M., Di Mambro R., Peris C.L., Díaz-Triviño S. et al. RETINOBLASTOMA-RELATED protein stimulates cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem by interacting with cytokinin signaling // *The Plant Cell.* 2013. V. 25(11). P. 4469–4478.
91. Pils B., Heyl A. Unraveling the evolution of cytokinin signaling // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 782–791.
92. Potten C.S., Loeffler M. Stem cells and cellular pedigrees-conceptual introduction // *Stem Cells* / Ed. C.S. Potten, L.: Acad. Press, 1997. P. 1–27.
93. Prusinkiewicz P., Hammel M., Mjolsness E. Animation of plant development // *Proc. Of SIGGRAPH 93*, Anaheim, California (1–6 Agosto, 1993). P. 351-360. (Computer Graphics Proceedings, Annual Conference Series, 1993)
94. Rahman A., Bannigan A., Sulaman W., Pechter P., Blancaflor E.B., Baskin T.I. Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root // *The Plant Journal.* 2007. V. 50(3). P. 514–528.

95. Reinhardt D., Frenz M., Mandel T., Kuhlemeier C. Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem // *Development*. 2003. V. 130(17). P. 4073–4083.
96. Ruzicka K., Ljung K., Vanneste S., Podhorská R., Beeckman T. et al. Ethylene Regulates Root Growth through Effects on Auxin Biosynthesis and Transport-Dependent Auxin Distribution // *Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 2197–2212.
97. Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T. et al. An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the Arabidopsis Root // *Cell*. 1999. V. 99(5). P. 463–472.
98. Sablowski R., Dornelas M.C. Interplay between cell growth and cell cycle in plants // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 65(10). P. 2703–2714.
99. Salic A., Mitchison T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo // *PNAS*. 2008. V. 105(7). P. 2415–2420.
100. Schaller G.E., Bishopp A., Kieber J.J. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development // *The Plant Cell*. 2015. V. 27(1). P. 44–63.
101. Scheres B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8(5). P. 345–354.
102. Scheres B., Berleth, T. Root development: new meanings for root canals? // *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998. V.1. P. 32–36.
103. Schmidt T., Pasternak T., Liu K., Blein T., Aubry-Hivet D. et al. The iRoCS Toolbox–3D analysis of the plant root apical meristem at cellular resolution // *Plant J.* 2014. V. 77(5). P. 806–814.
104. Sliwinska E., Mathur J., Bewley J.D. Synchronously developing collet hairs in *Arabidopsis thaliana* provide an easily accessible system for studying nuclear movement and endoreduplication // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 4165–4178.
105. Somorjai I.M., Somorjai R.L., Garcia-Fernández J., Escrivà H. Vertebrate-like regeneration in the invertebrate chordate amphioxus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. V. 109. P. 517–522.

106. Stahl Y., Simon R. Plant stem cell niches // *International Journal of Developmental Biology*. 2005. V. 49(5-6). P. 479–489.
107. Sugimoto K., Jiao Y., Meyerowitz E.M. Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway // *Dev Cell*. 2010. V. 18. P. 463–471.
108. Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. V. 279(40). P. 41866–41872.
109. Takahashi N., Kajihara T., Okamura C., Kim Y., Katagiri Y., et al. Cytokinins control endocycle onset by promoting the expression of an APC/C activator in *Arabidopsis* roots // *Current Biology*. 2013. V. 23. P. 1812–1817.
110. To J.P.C., Haberer G., Ferreira F.J., Deruère J., Mason M.G. et al. Type-A ARRs are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 658–671.
111. Truernit E., Bauby H., Belcram K., Barthélémy J, Palauqui J.-C. OCTOPUS, a polarly localised membrane-associated protein, regulates phloem differentiation entry in *Arabidopsis thaliana* // *Development*. 2012. V. 139. P. 1306–1315.
112. Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J. Activation and repression of transcription by auxin-response factors // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. V. 96. P. 5844–5849.
113. Vandepoele K., Raes, J., de Veylder L., Rouze P., Rombauts S., Inze D. Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2002. V. 14. P. 903–916.
114. Vanneste S., Friml J. Auxin: a trigger for change in plant development // *Cell*. 2009. V. 136(6). P. 1005–1016.
115. von Sachs J. Vorlesungen u̇ber Pflanzen-Physiologie // Wilhelm Engelmann. 1882 (на немецком).
116. Vyplelová P., Ovečka M., Šamaj J. Alfalfa root growth rate correlates with progression of microtubules during mitosis and cytokinesis as revealed by

- environmental light-sheet microscopy // *Frontiers in plant science*. 2017. V. 8. P. 1870.
117. Wang H., Qi Q., Schorr P., Cutler A., Crosby W.L., Fowke L.C. ICK1, a Cyclin-Dependent Protein Kinase Inhibitor from *Arabidopsis thaliana* Interacts with Both Cdc2a and CycD3, and Its Expression Is Induced by Abscisic Acid // *Plant J*. 1998. V. 15. P. 501–510.
118. Weigel D., Jurgens G. Stem cells that make stems // *Nature*. 2002. V. 415. P. 751–754.
119. Werner T., Schmulling T. Cytokinin action in plant development // *Current Opinion in Plant Biology*. 2009. V. 12. P. 527–538.
120. Wildwater M., Campilho A., Perez-Perez J. M., Heidstra R., Blilou I. et al. The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots // *Cell*. 2005. V. 123(7) P. 1337–1349.
121. Wilhelm S., Grobler d., Gluch M., Heinz H. Confocal Laser Scanning Microscopy Principles. 2003 (<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/referencelibrary/pdfs/ZeissConfocalPrinciples.pdf>)
122. Xu J., Hofhuis H., Heidstra R., Sauer M., Friml J. et al. A molecular framework for plant regeneration // *Science*. 2006. V. 311(5759). P. 385–388.
123. Yosiphon G., Mjolsness E. Plenum. 2007. available at <http://computableplant.ics.uci.edu/theses/guy/Plenum.html>
124. Zažímalová E., Murphy A. S., Yang H., Hoyerová K., Hošek P. Auxin transporters—why so many? // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010. V. 2(3). a001552.
125. Zhao Y., Christensen S.K., Fankhauser C., Cashman J.R., Cohen J.D., et al. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis // *Science*. 2001. V. 291. P. 306–309.
126. Zürcher E., Tavor-Deslex D., Lituiev D., Enkerli K., Tarr P.T., Müller B. A robust and sensitive synthetic sensor to monitor the transcriptional output of the cytokinin signaling network in planta // *Plant Physiol*. 2013. V. 161(3). P. 1066–1075.

127. Zürcher E., Müller B. Cytokinin synthesis, signaling, and function – advances and new insights // International review of cell and molecular biology. 2016. V. 324. P. 1–38.