

**ОТЗЫВ ОППОНЕНТА**  
**на диссертацию**  
**Лаврехи Виктории Вадимовны**

**«КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ  
ПРОЦЕССОВ ФОРМИРОВАНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ СТРУКТУРЫ  
АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ КОРНЯ *ARABIDOPSIS THALIANA* L.»**,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических  
наук по специальности 03.01.09 – математическая биология и  
биоинформатика.

Одной из основных фундаментальных проблем биологии развития растений является исследование образовательных тканей – меристем, включающих стволовые клетки, которые определяют судьбу развития клеток, тканей и органов. Меристемы корня хорошо изучены. В них выделяют три группы клеток: клетки покоящегося центра и окружающие его инициали, которые и относят к стволовым клеткам. Потомки стволовых клеток производят транзитно-амплифицирующиеся клетки, пул которых до сих пор остается слабо изученным. Остается непонятным, как обеспечивается выход клеток из клеточного цикла на границе меристемы и какова роль фитогормонов в этом процессе. Исследование таких процессов требует привлечения математических моделей.

Поэтому представленная работа, направленная на изучение апикальной меристемы корня, выявление роли фитогормонов (ауксина и цитокинина) в прохождении клеточного цикла, в регуляции баланса между процессами пролиферации и дифференцировки очень актуальна для изучения закономерностей роста корня и в целом проведении исследований в области биологии развития.

В соответствии с целью работы Виктория Вадимовна разрабатывала математическую модель формирования и поддержания структуры апикальной меристемы корня *A. thaliana*, проводила экспериментальную проверку предсказанной модели и осуществляла компьютерный анализ экспериментальных данных распределения митоза и репликации ДНК в корне *A. thaliana*.

Автором впервые был предложен минимальный регуляторный контроль клеточного цикла фитогормонами (особенно ауксина, функция которого в клеточном цикле до сих пор оставалась неизвестной). Ею впервые было показано, что переход G1/S разрешен при низких концентрациях ауксина, а при высоких концентрациях ингибируется; а переход G2/M разрешен при низких концентрациях цитокинина, а при высоких концентрациях ингибируется. Такие данные в литературе отсутствуют. О правильности высказанных данных свидетельствует авторская математическая модель о распределении пула транзитно-

амплифицирующихся клеток в меристеме корня. Созданная модель впервые позволяет объяснить распределение ауксина и цитокинина в тканях корня и регуляцию клеточного цикла этими фитогормонами. На основании численных расчетов модели предсказаны различия пролиферационной активности клеток разных тканей корня. Впервые получены трехмерные карты распределения событий митоза и репликации ДНК в меристеме корня у диких растений *A. thaliana* и мутантах по синтезу цитокининов.

Для реализации модели автором успешно был применен системный подход, который включал методы математического моделирования с использованием решения обратной задачи на основе минимального регуляторного контура контроля клеточного цикла фитогормонами и экспериментальной верификации предсказаний модели, основанной на разработке схемы экспериментов по исследованию пролиферационной активности. Кроме того, использовались современные методы окрашивания ДНК, количественный анализ трехмерных изображений корней и визуализаций ядер. На основании полученных данных была составлена трехмерная карта распределения клеток в фазах митоза и репликации ДНК.

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора 3 глав, обсуждения результатов, выводов, списка используемой литературы из 127 наименований.

В главе 1, изложенной на 55 стр., приводятся литературные данные по стволовым клеткам растений – сходстве и различии их со стволовыми клетками животных. Рассматриваются способы деления стволовых клеток и образование транзитно-амплифицирующихся клеток. Отмечается, что растения в отличие от животных имеют ниши стволовых клеток в течении всей жизни, в то время как животные производят такие клетки только в эмбриогенезе. Поэтому для растений можно адаптировать концепцию ниши стволовых клеток, которые находятся в меристемах.

Далее рассматривается структура апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana*, которая состоит из покоящегося центра (ПЦ), включающей всего 4 клетки, клеток-инициалей и транзитно-амплифицирующихся клеток. Однако указывается, что граница меристемы корня у *A. thaliana*, до сих пор конкретно не установлена. Поэтому автор придерживается терминологии Иванова и Дубровского, которые выделили в меристеме пролиферационный и транзитный домен. Первый образован инициалами, а второй транзитно-амплифицирующимися клетками.

Автор подробно рассматривает клеточный цикл растений, выделяет в нем хорошо известные четыре классические фазы и рассматривает циклинзависимые протеинкиназы (СДК), регулирующие фазы перехода клеточного цикла. Заслуживает внимания тот факт, что фазу G1/S регулируют не только цитокинины (как принято считать, Лутова и др., 2010), но и ауксины, которые автор относит к CYCD клеточного цикла. Отмечается,

что и другие фитогормоны могут регулировать клеточный цикл. Автор рассматривает экспериментальные методики изучения клеточного цикла корня.

Классическими параметрами при изучении структуры корневой меристемы является длина меристемы и количество клеток вдоль оси корня. Как правило, подсчет клеток корня проводится по длине кортекса. Однако использование методов флуоресцентной микроскопии, радиоактивного тимидина вдоль клеток корня, применение репортерных конструкций *CYCB1::GUS* и использование трехмерного анализа структуры корня позволили изучить структуру корня в трехмерном пространстве. Рассматривается роль ауксина и цитокинина в развитии корня растений, как ключевых регуляторов, обеспечивающих баланс между скоростью деления клеток и их дифференцировкой. Литературные данные об экзогенном влиянии ауксина и цитокинина разных концентраций на растяжение и деление клеток противоречивы (см. рис. 1.11).

Рассматривая данные о локализации ауксина в корне растения, автор пишет о его неравномерном распределении. Максимум концентрации ауксина сосредоточен в ПЦ, ствольных клетках, колумелле, перицикле протоксилемы, зоне дифференцировки при инициации боковых корней. Этот максимум содержания ауксина происходит не за счет его синтеза, а благодаря перемещению - диффузии и активному транспорту, регулируемым белками переносчиками *AUX/ IAA* и семейства *PIN*. К сожалению, транспорт цитокинина мало изучен и идет в основном пассивно по флоэме.

Рассматривая взаимодействие ауксина и цитокинина, автор выясняет по каким генным путям проходит регуляция структуры меристемы корня ауксином и цитокинином, что хорошо изображено на рис. 1.16. Сложная сеть взаимосвязей между ауксином и цитокинином, а также их опосредованное влияние на формирование корня через клеточный цикл может быть предпрешено через математическое моделирование, которое позволит изучить динамику процессов в пространстве и времени. Однако существующие модели недостаточно описывали контроль клеточного цикла, либо учитывали гипотетические регуляторы. Поэтому в данной работе актуальной являлась задача развития математической модели для исследования контроля клеточного цикла корня фитогормонами ауксином и цитокинином, а также генерация тестируемых в экспериментах гипотез и их последующая проверка.

В главе 2 (стр. 56-92) приводится математическое моделирование формирования и поддержания структуры меристемы корня. В построении модели автор учитывает важную роль ауксина и цитокинина в развитии корня. Однако остается неясным, какие из этих фитогормонов являются ключевыми в меристеме корня. Прежде всего, автором была сформулирована и решена обратная логическая задача по поиску

минимального регуляторного контура. Была выдвинута гипотеза, что граница меристемы связана с распределением концентраций ауксина и цитокинина в ткани и влиянием их концентраций на клеточный цикл. Прежде всего, необходимо было подобрать минимальный контур клеточного цикла, при котором можно поддержать пролиферационный домен меристемы корня в градиентах концентрации ауксина и цитокинина. При этом было принято четыре допущения: концентрация ауксина и цитокинина усреднены для трех зон кончика корня, низкие концентрации ауксина и цитокинина имеют противоположное действие, рассмотрена регуляция G1/S и G2/M, и упрощенные профили пролиферационной активности. На основании принятых допущений была построена логическая модель регуляторного контура клеточного цикла под контролем ауксина и цитокинина. Таким образом, было получено 8 комбинаций вариантов регуляции клеточного цикла ауксином и цитокинином. Выявлены зоны с делящимися клетками в зоне, соответствующей пролиферационному домену.

Создана гибридная модель, в которой деление клеток происходит под управлением этого минимального контура, что достаточно для формирования и поддержания трех зон кончика корня с различной пролиферативной активностью (колумеллы, пролиферационного и транзитного доменов). Пролиферационный домен поддерживался между максимумом ауксина в ПЦ и максимумом цитокинина в транзитном домене.

Показано, что варьирование константы пороговой концентрации клеточного цикла происходит без прямого влияния ауксина на пролиферационный домен, а только через изменение дистального максимума цитокинина. В данной работе показано, что закладка бокового корня может регулироваться не только на уровне управления потока ауксина, но и на уровне управления клеточным циклом. Уменьшение пороговой концентрации цитокинина для перехода G2/M и снижение чувствительности клетки к цитокинину приводит к уменьшению длины пролиферационного домена.

Заключение, сделанное автором с использованием обратной модели, свидетельствует о том, что высокие концентрации ауксина в клетке ингибируют прохождение перехода G1/S, а высокие концентрации цитокинина в клетке ингибируют прохождение G2/M. Таким образом, согласно модели, деление клетки происходит под управлением минимального регуляторного контура. Этого контура достаточно для поддержания трех зон кончика корня с различной пролиферационной активностью: колумеллы, пролиферационного и транзитного доменов. Пролиферационный домен формировался между максимумом ауксина в ПЦ и максимумом цитокинина в транзитном домене. На основе варьирования параметров математической модели было сформулировано 3 предсказания:

(1) увеличение потока ауксина со стороны побега приведет к сокращению событий репликации ДНК; (2) увеличение потока цитокинина со стороны побега приведет к сокращению пролиферационного домена; (3) снижение концентрации цитокинина в транзитном домене или снижение чувствительности клеток растения к цитокинину приведет к увеличению длины пролиферационного домена.

В главе 3 (стр. 93-124) производится проверка предложенных автором трех предсказаний по содержанию ауксина и цитокинина в различных доменах корня и о событиях, происходящих в этих доменах, на основании компьютерного анализа распределения митозов в корне.

Принимая во внимание большие различия в концентрации ауксина в сосудистых тканях по сравнению с прокамбием, автор провела детальную аннотацию сосудистой системы и посчитала расстояние от ПЦ до последней клетки в S – фазе для каждой ткани из сосудистой системы. На основании этих данных было показано, что сначала заканчивается репликация ДНК во флоэме, а позже всех в прокамбии (рис. 3.5). Далее шла проверка второго предсказания по влиянию цитокининов. Цитокинины текут от побега по флоэме и в сосудистых пучках наблюдается повышенный уровень цитокинина, который согласно второму предсказанию, должен привести к прекращению митозов в сосудистых тканях. Автор пишет, что протофлоэма заканчивает пролиферативную активность уже после нескольких делений. Митозы в прокамбии заканчиваются на самом дальнем расстоянии от ПЦ. Третье предсказание модели основано на снижении концентрации цитокинина, которое может увеличить длину пролиферации в сторону побега во всех тканях корня. Об этом свидетельствуют результаты анализа митозов в корнях мутантных растений по цитокинину.

Общие замечания по диссертации.

Корневую меристему принято называть КАМ, а не АМК (Лутова и др., 2010).

Природные цитокинины в растениях следующие: зеатин, цис.-транс формы, зеатинрибозид, изопентиниладенин, изопентиниладенозин. Поэтому желательно было бы называть их не в общем цитокинины, а хотя бы зеатин.

Это же касается и ауксинов. Природный ауксин один – ИУК.

Основные положения и выводы диссертации являются обоснованными и достоверными.

Достоверность полученных результатов обусловлена использованием современных методов исследования, а также статистической обработки результатов эксперимента.

Обсуждение полученных результатов проведено логично и корректно. Не вызывает сомнений и возражений обоснованность выводов, определяемая глубиной и объемом исследования.

Оценивая работу в целом можно отметить, что диссертантом проведено большое исследование по изучению процессов формирования и поддержания структуры апикальной меристемы корня и его регуляции под воздействием гормонов. Проведенное исследование окажет неоценимую помощь исследователям, работающими с культурой ткани. Ауксины и цитокинины основные регуляторы пролиферации клеточного цикла, широко используются в культуре тканей. Подбор правильных концентраций и длительности обработки фитогормонами позволит более грамотно использовать ауксины и цитокинины в индукции пролиферативных процессов в культуре *in vitro* и особенно при индукции и поддержании соматического эмбриогенеза. Согласно созданной математической модели для пролиферации клеточного цикла хвойных видов можно рекомендовать использование более низких концентраций ауксина и цитокинина, чем использовалось ранее.

Автореферат и работы, опубликованные по теме диссертации, достаточно полно отображают ее содержание. По уровню теоретических обобщений проблемы, количеству и проработке ценного экспериментального материала и практическим результатам, работа «Компьютерный анализ и моделирование процессов формирования и поддержания структуры апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana* L.» отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям по специальности 03.01.09 – математическая биология и биоинформатика, а ее автор Лавреха Виктория Вадимовна заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук.

Ведущий научный  
сотрудник лаборатории  
лесной генетики и селекции,  
ФГБНУ ФИЦ КНЦ Института леса  
им. В.Н. Сукачева СО РАН  
д.б.н., проф.

Почтовый адрес: 660036, г. Красноярск,  
Академгородок №50, стр.28  
раб. телефон: 2 49 46 25  
culture@ksc.krasn.ru

03.05.2018

*И.И. Третьякова*



И.И. Третьякова

*Лавреха В.В.*  
Заведующий сектором