

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи

Савина Мария Сергеевна

**КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
АУКСИНА В АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЕ КОРНЯ
ARABIDOPSIS THALIANA С УЧЕТОМ АНАТОМИИ
КОРНЕВОГО ЧЕХЛИКА И НАРУШЕНИЙ В ЕГО
СТРУКТУРЕ**

Специальность 03.01.09

Математическая биология, биоинформатика

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

канд. биол. наук

Миронова Виктория Владимировна

Новосибирск

2019

Оглавление

| | |
|--|----|
| Введение..... | 5 |
| Список принятых сокращений..... | 13 |
| 1. Обзор литературы | 15 |
| 1.1. Корень растения, как объект исследования..... | 15 |
| 1.2. Апикальная меристема корня <i>Arabidopsis thaliana</i> | 15 |
| 1.3. Строение и функции корневого чехлика | 17 |
| 1.4. Ген <i>WOX5</i> – ключевой регулятор поддержания ниши стволовых клеток корня и развития колумеллы..... | 19 |
| 1.5. Ауксин, его распределение и транспорт | 20 |
| 1.5.1. Физиологические эффекты ауксина..... | 20 |
| 1.5.2. Синтез ауксина | 22 |
| 1.5.3. Распределение ауксина в корне <i>A. thaliana</i> | 22 |
| 1.5.4. Активный транспорт ауксина | 24 |
| 1.5.5. Экспрессия PIN белков в апикальной меристеме корня <i>A. thaliana</i> | 25 |
| 1.6. Исследование распределения ауксина как способ анализа механизмов действия внешних факторов на развитие корня | 27 |
| 1.7. Воздействие холода на распределение ауксина в корне | 29 |
| 1.8. Моделирование молекулярно-генетических процессов в биологии..... | 29 |
| 1.8.1. Химико-кинетический подход..... | 30 |
| 1.8.2. Метод обобщенных функций Хилла | 31 |
| 1.9. Математическое моделирование в биологии развития растений..... | 32 |
| 1.9.1. Первые математические модели распределения ауксина в тканях растения | 33 |

| | |
|--|----|
| 1.9.2. Математические модели распределения ауксина в корне с использованием прямоугольного клеточного ансамбля..... | 35 |
| 1.9.3. Математические модели распределения ауксина в корне с использованием реалистичного клеточного ансамбля | 41 |
| 1.9.4. Математические модели распределения ауксина с ростом и делением клеток | 45 |
| 1.9.5. Математические модели, описывающие процессы, происходящие в корневом чехлике..... | 47 |
| 1.10. Аналитическое заключение по обзору литературы | 49 |
| 2. Моделирование воздействия пониженных температур на морфологию колумеллы и распределение ауксина в корне <i>Arabidopsis thaliana</i> с использованием прямоугольного клеточного ансамбля | 52 |
| 2.1. Экспериментальные данные, использованные в работе | 52 |
| 2.1.1. Данные об изменении экспрессии репортеров в линиях PIN::GUS, PIN::PIN-GFP, DR5::GFP под действием холода..... | 52 |
| 2.1.2. Анатомические изменения в кончике корня под действием холодого стресса | 54 |
| 2.2. Описание математической модели корня с прямоугольным клеточным ансамблем | 55 |
| 2.2.1. Клеточный ансамбль математической модели | 55 |
| 2.2.2. Элементарные процессы, описанные в модели | 57 |
| 2.2.3. Уравнения математической модели | 58 |
| 2.2.4. Моделирование действия холода на распределение ауксина..... | 61 |
| 2.2.5. Моделирование деления ИК и гибели ДКИК | 62 |
| 2.3. Подбор параметров модели для описания действия холода на распределение ауксина | 64 |

| | |
|---|----|
| 2.4. Результаты моделирования распределения ауксина после гибели ДКИК..... | 68 |
| 2.5. Экспериментальная верификация предсказаний модели..... | 70 |
| 2.6. Выводы по главе 2..... | 72 |
| 3. Моделирование нарушений в структуре колумеллы при сверхэкспрессии и потере функции гена <i>WOX5</i> | 74 |
| 3.1. Экспериментальные данные по влиянию <i>WOX5</i> на распределение ауксина и анатомию кончика корня..... | 74 |
| 3.1.1. Материалы | 74 |
| 3.1.2. Анатомические изменения в линиях Col-0, <i>wox5-1</i> , <i>35S::WOX5-GR</i> | 75 |
| 3.1.3. Экспрессия ферментов синтеза, белков транспортеров и репортера ауксина в линиях Col-0, <i>wox5-1</i> , <i>35S::WOX5-GR</i> | 75 |
| 3.1.4. Гипотеза о роли <i>WOX5</i> в распределении ауксина | 77 |
| 3.2. Результаты численного моделирования для двумерной модели с прямоугольным клеточным ансамблем | 77 |
| 3.3. Описание одномерной компьютерной модели колумеллы корня <i>Arabidopsis thaliana</i> с ростом, делением и слущиванием клеток..... | 82 |
| 3.3.1. Описание структуры и процессов модели..... | 82 |
| 3.3.2. Уравнения математической модели | 84 |
| 3.3.3. Описание клеточной динамики в одномерной модели | 86 |
| 3.4. Начальные данные для расчета динамической модели..... | 88 |
| 3.5. Подбор параметров модели | 88 |
| 3.6. Результаты моделирования с использованием одномерной модели с ростом, делением и слущиванием клеток | 91 |

| | |
|---|-----|
| 3.7. Экспериментальная верификация предсказаний математических моделей..... | 94 |
| 3.8. Выводы по главе 3 | 97 |
| 4. Исследование влияния особенностей строения корневого чехлика на распределения ауксина в меристеме корня <i>Arabidopsis thaliana</i> в модели с реалистичным клеточным ансамблем..... | 98 |
| 4.1. Получение количественных характеристик строения тканей корня .. | 98 |
| 4.2. Описание портретной математической модели корня <i>Arabidopsis thaliana</i> | 102 |
| 4.2.1. Элементарные процессы, рассмотренные в портретной математической модели | 103 |
| 4.2.2. Уравнения портретной математической модели | 104 |
| 4.3. Подбор параметров портретной модели с пятью PIN транспортерами | 107 |
| 4.4. Результаты моделирования распределения ауксина и экспрессии белков PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7..... | 111 |
| 4.5. Варьирование по параметрам двумерной модели распределения ауксина с реалистичным клеточным ансамблем | 118 |
| 4.6. Выводы по главе 4 | 120 |
| Заключение | 122 |
| Выводы | 128 |
| Список литературы | 129 |
| Приложение 1. Варьирование по параметрам для одномерной динамической модели распределения ауксина..... | 150 |

Введение

Актуальность

Функционирование организма требует поддержания пула стволовых клеток в течение всего жизненного цикла, поэтому изучение механизмов их поддержания является одной из важнейших задач биологии развития. Ниша стволовых клеток обеспечивает формирование специфического микроокружения, в котором стволовые клетки сохраняют плюрипотентность бесконечно долгое время (Imin and Rolfe, 2007; Sugimoto et al., 2011).

Растения и животные имеют сходные принципы организации ниш стволовых клеток, однако структура ниш стволовых клеток растений гораздо проще таковых у животных (Stahl and Simon, 2005; Heidstra and Sabatini, 2014). Таким образом, знания и методы, полученные в исследованиях ниши стволовых клеток у растений, позволят в дальнейшем применить их на других биологических объектах. Апикальная меристема корня растения является одним из наиболее удобных объектов для изучения процессов самоорганизации и поддержания ниши стволовых клеток, в силу своей простой геометрической структуры.

Важную роль в развитии корня и поддержании ниши стволовых клеток меристемы корня выполняет корневой чехлик (Иванов, 1987; Медведев, 2012). Корневой чехлик реагирует на изменение условий окружающей среды по мере роста корня растения, выполняя защитную, секреторную и сигнальную функции (Иванов, 1987; Driouich et al., 2013; Fendrych et al., 2014). Кроме того, корневой чехлик участвует в передаче сигнала в ответе на грави-, хеми- и фототропизм, участвует в регуляции закладки боковых корней и поддержании целостности ниши стволовых клеток в апикальной меристеме корня (Иванов, 1987; Barlow, 2002; Kumpf, Nowack, 2015; Xuan et al., 2016).

Одним из основных регуляторов поддержания ниши стволовых клеток является ген *WOX5*, который экспрессируется в покоящемся центре (ПЦ), организационном центре ниши стволовых клеток апикальной меристемы корня (Haescker et al., 2004). Нарушения в работе этого гена (потеря функции

или сверхэкспрессия) приводят к изменениям в структуре корневого чехлика и клеточной динамики за счет изменения количества стволовых клеток (Sarkar et al., 2007, Pi et al., 2015).

Известно, что для центральной части корневого чехлика (колумеллы) характерно повышенное содержание фитогормона ауксина (van den Berg et al. 1997; Sabatini et al. 1999). Поддержание высоких концентраций ауксина в колумелле и ПЦ имеет важное значение для процессов морфогенеза в корне, поддержания целостности апикальной меристемы, в целом, и ниши стволовых клеток, в частности (Vieten 2005; Liao, 2015). Поэтому основное внимание при изучении апикальной меристемы корня уделяется распределению ауксина в тканях корня.

Молекулярные и генетические процессы, лежащие в основе передачи сигнала и транспорта ауксина, являются нелинейными и содержат петли обратной связи, что определяет повышенную сложность системы (Goh et al., 2014). Наравне с этим до сих пор не существует достаточно точных методов, позволяющих измерить внутриклеточную концентрацию ауксина (Sabatini et al., 1999; Brunoud et al., 2012; Band L., 2014; Liao et al., 2015). Ауксин является определяющим фактором во многих морфогенетических процессах, поскольку в зависимости от концентрации он по-разному влияет на процессы роста, деления и дифференцировки клеток (Campanoni and Nick, 2005; Медведев, 2004). Кроме того, процессы развития необходимо исследовать в динамике и в пространстве. Поэтому, исследование механизмов действия фитогормона ауксина требует привлечения методов математического моделирования.

На данный момент созданы математические модели, описывающие процессы поддержания ниши стволовых клеток в меристеме корня под действием ауксина (Grieneisen et al., 2007; Kramer et al., 2008; Muraro et al., 2013; Grieneisen et al., 2012), в том числе, выполненные в Институте Цитологии и Генетики СО РАН (Likhoshvai et al., 2007; Mironova et al., 2010; Mironova et al., 2012). В отличие от аналогов, группа моделей, разработанная в ИЦиГ СО

РАН, хорошо приспособлена к исследованию процессов самоорганизации ниш ствольных клеток, поскольку учитывает ауксин-зависимую регуляцию экспрессии белков семейства PIN, а значит, эти модели могут формировать сложные распределения из равномерных начальных данных, в которых потоки ауксина не заданы изначально.

Несмотря на то, что уже были созданы математические модели распределения ауксина, воспроизводящие анатомическое строение двумерного продольного среза кончика корня (Muraro et al., 2013; Grieneisen et al., 2012), влияние структуры корневого чехлика на распределение ауксина в нише ствольных клеток апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana* подробно не исследовалось.

Как правило, в математических и компьютерных моделях процессы распределения ауксина исследуются в норме. Немногие примеры анализа развития ниши ствольных клеток в аномальных условиях включают лазерную абляцию клеток (Grieneisen et al., 2007) или отрезание кончика корня (Mironova et al., 2012), а также исследование явления галотропизма (van den Berg et al., 2016). Аномалии в развитии колумеллы с применением методов математического и компьютерного моделирования ранее не исследовались.

Цель и задачи диссертационной работы

Цель:

Исследование роли корневого чехлика корня в поддержании ниши ствольных клеток апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana* с помощью методов компьютерного моделирования.

Задачи:

1) Разработка компьютерных моделей распределения ауксина в апикальной меристеме корня *Arabidopsis thaliana* с различной степенью детализации исследуемых процессов: двумерная модель с прямоугольным клеточным ансамблем, гибридная одномерная модель с ростом и делением клеток, двумерная модель с реалистичным клеточным ансамблем.

2) Проведение численных экспериментов по исследованию распределения ауксина в апикальной меристеме корня *Arabidopsis thaliana*:

а) при аномальном развитии колумеллы под воздействием низких положительных температур.

б) при аномальном развитии корневого чехлика в растениях со сверхэкспрессией гена *WOX5* и в мутанте с потерей функции этого гена.

в) с учетом анатомических особенностей строения корневого чехлика в корне *Arabidopsis thaliana*.

Научная новизна

Впервые был описан механизм адаптации корневой апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana* к воздействию низких положительных температур, который заключается в селективной индуцированной холодом гибели дочерних клеток инициалей колумеллы. С помощью компьютерного моделирования было показано, что гибели дочерних клеток инициалей колумеллы приводит к восстановлению максимума концентрации ауксина в ПЦ и способствует защите ниши стволовых клеток. Данный механизм был назван «Жертва ради спасения».

Впервые была создана гибридная компьютерная модель, описывающая процессы развития колумеллы корня *A. thaliana* в динамике для исследования роли *WOX5* в регуляции ниши стволовых клеток. С помощью модели показано, что основной функцией *WOX5* является регуляция TAA1-зависимого синтеза ауксина в нише стволовых клеток. Нарушения экспрессии гена *WOX5* приводят к фенотипическим аномалиям корневого чехлика и меристемы корня, через изменение уровня TAA1-зависимого синтеза ауксина.

Впервые в Институте Цитологии и Генетики СО РАН была создана программа «Создание двумерных моделей тканей растений» (PlantLayout) для создания структурной модели двумерного среза тканей растения, готовой к внедрению в математические и компьютерные модели, в полуавтоматическом режиме.

Впервые была построена компьютерная модель распределения ауксина в корне растения с реалистичной клеточной структурой, учитывающая регуляцию ауксином своих белков-транспортеров семейства PIN. С помощью этой модели впервые были выявлены механизмы формирования билатеральной асимметрии в меристеме корня, естественно возникающей в развитии корня, в следствие делений клеток в корневом чехлике.

Положения, выносимые на защиту

1) Гибель дочерних клеток инициалей колумеллы корня, наблюдаемая у *Arabidopsis thaliana* после суток выращивания при низких положительных температурах (4°C), является частью защитного адаптивного механизма, позволяющего сохранить нишу стволовых клеток при неблагоприятных условиях среды.

2) Важной ролью гена *WOX5* для поддержания ниши стволовых клеток меристемы корня *Arabidopsis thaliana* является активация и поддержание *TAA1*-зависимого синтеза ауксина.

Теоретическая и практическая значимость

Разработанные подходы к исследованию механизмов морфогенеза корня и созданная серия математических моделей могут быть с успехом адаптированы для решения других исследовательских задач. Например, разработанный подход к моделированию учета воздействия холода на распределение ауксина может успешно применяться для исследования распределения ауксина при воздействии других факторов окружающей среды или обработки корней растений различными биологически активными веществами. Разработанное программное средство «PlantLayout» может с успехом применяться при создании математических моделей мутантных корней с известными аномалиями в анатомической структуре, а также других органов и тканей, для которых характерно явление полярного активного транспорта.

Личный вклад

Основные результаты работы получены автором самостоятельно. Автором разработаны и реализованы три различные компьютерные математические модели распределения ауксина в программе MatLab, проведен анализ результатов численных экспериментов и литературных данных, сформулированы предсказания модели и проведен анализ экспериментов по верификации полученных предсказаний модели. Автором разработана программа PlantLayout на языке MatLab для создания двумерных структурных моделей тканей растений.

Апробация работы

Результаты работы вошли в отчёты по грантам Президента Российской Федерации (МК-1297.2017.4, руководитель Миронова В.В.), Российского Научного Фонда (№ 14-14-00734, руководитель Афонников Д.А.; №17-74-10102, руководитель Коврижных В.В.) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№18-34-00485 мол_а, Руководитель Савина М.С.). Результаты работы были доложены на 9 конференциях в виде устных и стендовых докладов. Также было получено 1 авторское свидетельство.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации было опубликовано 9 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Публикации в журналах:

1. Ощепкова, Е. А., Омельянчук, Н. А., **Савина, М. С.**, Пастернак, Т., Колчанов, Н. А., Землянская, Е. В. // Системно-биологический анализ гена WOX5 и его функций в нише стволовых клеток корня. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Том 5. – № 4. – Стр. 459-474.

2. Jing Han Hong, **Maria Savina**, Jing Du, Ajay Devendran, Karthikbabu Kannivadi Ramakanth, Xin Tian, Wei Shi Sim, Victoria V. Mironova, and Jian Xu. // A Sacrifice-for-Survival Mechanism Protects Root Stem Cell Niche from Chilling Stress // Cell. – 2017. – V. 170. – P. 102-113.

Тезисы в сборниках конференций:

1. **Савина М.С.**, Казанцев Ф.В., Миронова В.В. // Моделирование воздействия холода на физиологическое распределение ауксина в корне *A. thaliana* // Материалы XXIII международной конференции "Математика. Компьютер. Образование". Дубна, Россия, 25-30 января, 2016, стр. 130.
2. **M.S. Savina**, F.V. Kazantsev, V.V. Mironova. // Mathematical modeling of active substances and factors influence on functioning of plant root meristem // In proceedings of the eighth international young scientists school 'System Biology and Bioinformatics'. Novosibirsk, Russia, 22-25 August 2016, p. 65.
3. **M.S. Savina**, F.V. Kazantsev, V.V. Mironova. // Mathematical modeling of active substances and factors influence on functioning of plant root meristem // In proceedings of the 2nd International Conference 'Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology'. Novosibirsk, Russia, 29 August – 2 September 2016, p. 92.
4. **Maria Savina**, Jing Han Hong, Jian Xu, Victoria Mironova // Mathematical modeling of the effects of chilling stress on *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche // In proceedings of the International Symposium "Auxins and Cytokinins in Plant Development and Interactions with Other Phytohormones". Prague, Czech Republic, 1–5 July 2018, p. 54.
5. **M.S. Savina**, J.H. Hong, Jian Xu, V.V. Mironova // Mathematical modeling of chilling stress induced changes in *Arabidopsis thaliana* root meristem // In proceedings of the Eleventh International Conference "BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE\systems biology". Novosibirsk, Russia, 20-25 August 2018, p. 181.
6. **Maria Savina**, Jing Han Hong, Jian Xu, Victoria Mironova // MATHEMATICAL MODELING OF CHILLING STRESS EFFECT ON THE PLANT ROOT MERISTEM // In proceedings of the first international Plant Systems Biology meeting. Roskoff, France, 10-14 September 2018, p. 24.
7. **Savina M.S.**, Kazantsev F.V. and Mironova V.V. // What can we learn about stress-induced root growth by mathematical modeling of auxin distribution?

// In proceedings of Plant Organ Growth Symposium 2019. Bordeaux, France, 24-26 April 2019, p. 23.

8. **Савина М.С.**, Миронова В.В. // Моделирование распределения ауксина при регенерации меристемы корня *Arabidopsis thaliana* // Материалы VII съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Санкт-Петербург, Россия, 18-22 июня 2019, стр. 133.

9. **Savina M.S.**, Lavrekha V.V., Pasternak T., Mironova V.V. // Systems biology study on the WOX5 role in the distal part of the root meristem in *Arabidopsis thaliana* // In proceedings of the 5th International Scientific Conference “Plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology” (PlantGen2019). Novosibirsk, Russia, 24-29 June 2019, p. 175.

Авторские свидетельства

Савина М.С., Миронова В.В., Создание двумерных моделей тканей растений (PlantLayout), Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2018661009 от 30 июля 2018 года.

Объем и структура диссертации

Материал диссертационного исследования изложен на 153 страницах, содержит 40 рисунков и 7 таблиц. Список литератур включает 182 российских и зарубежных источников. Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, описания результатов работы в трех главах, заключения, выводов, списка литературных источников, приложения.

Список принятых сокращений

КЧ – корневой чехлик

БКЧ – боковой корневой чехлик

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

ИК – инициали колумеллы

ДКИК – дочерние клетки инициалей колумеллы

ДКК – дифференцированные клетки колумеллы

ИУК – индолил-3-уксусная кислота, наиболее распространенная активная форма ауксина

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

AUX1 – Auxin resistant 1, трансмембранный белок транспортер ауксина, обеспечивающий активный приток ауксина в клетку

AUX/LAX – AUXIN1/LIKE-AUX1 семейство трансмембранных белков транспортеров ауксина, обеспечивающий активный приток ауксина в клетку

ABCВ - В подсемейство ABC трансмембранных белков транспортеров, обеспечивающих активный отток и приток ауксина в клетку

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

GR – лиганд-связывающий домен глюкокортикоидного рецептора крысы

DEX – дексаметазон, глюкокортикоид

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

DI1-VENUS – репортёрная ауксин-чувствительная конструкция, состоящая из нескольких последовательностей кодирующих домен II Aux/IAA белков сшитых с 35S промотором

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

WOX5 – WUSCHEL-related homeobox 5, транскрипционный фактор ствольности апикальной меристемы корня

wox5-1 – мутантная линия с потерей функции гена *WOX5*

35S::WOX5-GR – трансгенная линия, содержащая белок *WOX5* сшитый с лиганд-связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора крысы (GR) под минимальным промотором

TAA1 – триптофан-аминотрансфераза, фермент участвующий в синтезе ауксина из триптофана.

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

GFP – green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок

GUS – бета-глюкуронидаза

PlantLayout – пайплайн для создания структурных моделей тканей растений и внедрения их в математические модели в качестве клеточного ансамбля

MATLAB – высокоуровневый язык и интерактивная среда для программирования, численных расчетов и визуализации результатов

iRoCS Toolbox – программа для трехмерного аннотирования организации кончика корня

1. Обзор литературы

1.1. Корень растения, как объект исследования

Современные растения в ходе эволюции приобрели множество специализированных тканей и органов. Важным событием для наземных растений являлось возникновение корня, который стал выполнять ряд важных функций, таких как, закрепление растения в грунте, взаимодействие с другими организмами, находящимися в почве (грибы, микроорганизмы, корни других растений), поглощение воды и минеральных веществ из окружающей среды, образование продуктов первичного и вторичного метаболизма, синтез алкалоидов и некоторых фитогормонов, необходимых для роста и развития растения в целом, таких как, ауксины, цитокинины и гиббереллины (Медведев, 2004). Корень растения, за исключением видоизмененных корней (корнеплоды, корни-прицепки, воздушные корни и др.), обладает простым строением с радиальной симметрией, схожей для большинства растений.

Так, независимо от типа, все корни обладают осевой симметрией и состоят из сосудистого пучка, окруженного несколькими концентрическими слоями: эпидермис, кортекс, эндодермис, перицикл и сосудистый пучок (Dolan et al., 1993). На терминальном конце корня располагается особая ткань, состоящая из нескольких слоев, называемая корневым чехликом (КЧ). Вслед за корневым чехликом располагается меристематическая зона, в которой клетки активно делятся. За меристематической зоной следует зона растяжения, в которой для клеток характерен активный однонаправленный рост (von Sachs, 1882; Медведев, 2004). Дальше зоны растяжения располагается зона дифференцировки, здесь специализируется флоэма, ксилема, корневые волоски, образуются зачатки боковых корней и откладываются питательные вещества.

1.2. Апикальная меристема корня *Arabidopsis thaliana*

Корень модельного растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*A. thaliana*) широко используется в качестве модельного объекта при изучении процессов

развития растений, начиная с 90-х годов прошлого века (Benfey, Schiefelbein, 1994). Апоикальная меристема корня *A. thaliana* является наиболее удобным объектом для изучения процессов самоорганизации и поддержания ниши стволовых клеток растений. Ниша стволовых клеток апоикальной меристемы корня представлена клетками ПЦ совместно с окружающими его плюрипотентными клетками (инициалами), которые являются предшественниками всех типов тканей корня (Иванов, 1987; Медведев, 2004). Наличие в меристеме клеток ПЦ, период деления которых составляет более 200 часов, способствует поддержанию пула стволовых клеток (van der Berg et al., 1997; Jiang and Feldman, 2005). Ниже ПЦ располагаются инициали двух типов, центральные дают начало колумелле, а латеральные – эпидермису и боковому корневоу чехлику (Dolan et al., 1993). По обе стороны от ПЦ расположены инициали, дающие начало эндодермису и кортексу. Слой инициалей, расположенный над ПЦ, дает начало перициклу и сосудистой ткани. Схема строения апоикальной меристемы корня *A. thaliana* приведена на Рис. 1 (Lee et al., 2012).

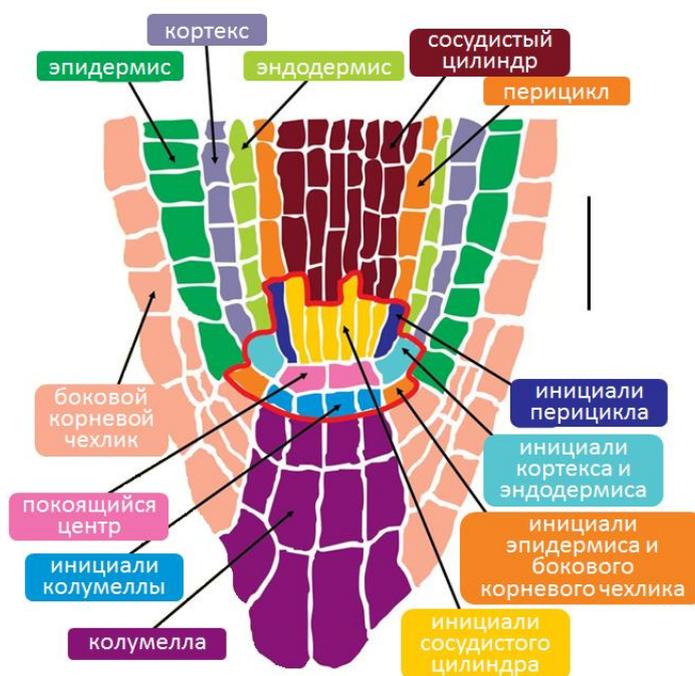


Рис. 1. Схема строения кончика корня *Arabidopsis thaliana*. Красной линией обозначена граница ниши стволовых клеток апоикальной меристемы корня (Адаптировано из Lee et al., 2012). Шкала 20 мкм.

1.3. Строение и функции корневого чехлика

До недавнего времени основной функцией КЧ считалась механическая защита ниши ствольных клеток от повреждения при продвижении корня через почву. Так как клетки КЧ обладают секреторной функцией, выделяемая ими слизь облегчает проникновение корня в почву, а также предохраняет корни растения от высыхания в условиях недостатка влаги (Иванов, 1987; Sievers et al., 2002). В растущем корне постоянно образуются новые клетки КЧ за счет пролиферации инициалей и сдувания нижних дифференцированных клеток. При этом сдушенные клетки корневого чехлика остаются живыми и продолжают выполнять секреторную функцию (Fendrych et al., 2014). Такие клетки называются «Пограничными клетками» (Border Cells), потому что они продолжают служить границей между корнем и окружающей его почвой (ризосферой), осуществляя взаимодействие корня растения с ризосферой (Hawes et al., 2000; Sievers et al., 2002; Vicre et al., 2005; Cannesan et al., 2012; Driouich et al., 2013).

Однако у КЧ есть и множество других функций. Именно благодаря КЧ корень «понимает» различные сигналы, поступающие из окружающей среды (Barlow, 2002). Так он определяет изменение скорости и направления роста всего корня под действием силы тяжести, освещения, механических условий и состава окружающей среды (Иванов, 1987; Barlow, 2002; Медведев, 2004; Kumpf, Nowack, 2015). В том числе, КЧ играет важную роль в создании специфического микроокружения для ниши ствольных клеток за счет поддержания повышенных концентраций фитогормонов, таких как ауксины и цитокинины (Sabatini et al., 1999; Brunoud et al., 2012; Zürcher et al., 2013; Band L., 2014; Liao et al., 2015). Однако для роста и развития растения важное значение имеет не только направление роста главного корня и поддержание ниши ствольных клеток, но и образование боковых корней. Хотя КЧ расположен на самом кончике корня, вдали от появляющихся боковых корней, было показано, что происходящие из корневых шапок процессы регулируют

образование боковых корней несколькими путями (Kumpf, Nowack, 2015; Xuan et al., 2016).

КЧ растения состоит из двух частей: колумеллы и бокового корневого чехлика (БКЧ), которые отличаются по выполняемым функциям (Иванов, 1987). Так основной функцией колумеллы является реакция на гравитропизм, которая осуществляется при помощи специальных гранулярных включений крахмала в этих клетках (Blancaflor et al., 1998, Morita, Tasaka, 2004). БКЧ играет важную роль в закладке боковых корней (Xuan et al., 2016; Möller et al., 2017), также есть данные о том, что границы БКЧ могут определять границы апикальной меристемы корня *A. thaliana* (Lavrekha et al., 2017). Стоит отметить, что для инициалей колумеллы (ИК) характерны только поперечные деления, в то время как для инициалей БКЧ характерны как поперечные, так и продольные деления (Иванов, 1987; Dolan et al., 1993). Число ствольных клеток в колумелле растений, как правило, ограничивается несколькими рядами, примыкающими к покоящемуся центру. Для *A. thaliana* характерно наличие только одного слоя ствольных клеток в КЧ (Dolan et al., 1993; Hong et al., 2015), в отличие от других видов растений, таких как пшеница, рис или кукуруза (Hawes, Pueppke, 1986; Иванов, 1987). Дочерние клетки инициалей колумеллы (ДКИК) сразу же после деления переходят к дифференцировке. В отличие от других потомков инициалей ДКИК у *A. thaliana* в норме не способны к повторному делению (Dolan et al., 1993). Дифференцированные клетки колумеллы (ДКК) и ИК существенно отличаются по строению, так для ДКК характерны большие размеры и наличие гранул крахмала в цитоплазме (Рис. 2), в то время как ИК отличаются маленькими размерами, однородной цитоплазмой без посторонних включений и недоразвитыми пластидами (Иванов, 1987; Hong et al., 2015). Процессы слущивания крайних клеток КЧ находятся в равновесии с процессами пролиферации инициалей КЧ, что приводит к поддержанию постоянного количества рядов клеток, например, у *A. thaliana* в норме наблюдается 4-6 рядов клеток колумеллы (Hong et al., 2015; Dubreuil et al., 2018).

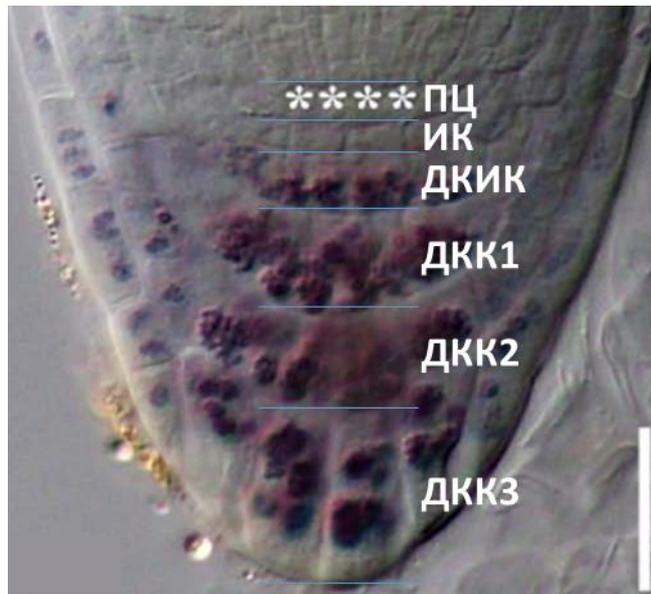


Рис. 2. Схема строения корневого чехлика *A. thaliana*. Окраска люголем кончика корня дикого типа (Адаптировано из Hong et al., 2015). Наличие гранул крахмала в ДКИК и ДКК. Звездочкой обозначено положение клеток ПЦ.

1.4. Ген *WOX5* – ключевой регулятор поддержания ниши стволовых клеток корня и развития колумеллы

Транскрипционный фактор *WOX5*, относящийся к семейству WUSCHEL related homeobox (*WOX*), играет ключевую роль в поддержании ниши стволовых клеток апикальной меристемы корня. Особенностью данного семейства транскрипционных факторов является то, что его представители встречаются только у растений и играют важную роль на различных этапах их развития (van der Graaff et al., 2009). У *A. thaliana* семейство *WOX* насчитывает 15 транскрипционных факторов. Первый открытый транскрипционный фактор этого семейства WUSCHEL (*WUS*), контролирует сохранение плюрипотентности стволовых клеток в апикальной меристеме побега (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). Он регулирует количество стволовых клеток, паттерн клеточных делений и принимает участие на первых этапах дифференцировки клеток-потомков в меристеме побега (Yadav et al., 2010). Все белки этого семейства обладают консервативным гомеодоменом с характерной структурой (Mayer et al., 1998; Haescker et al., 2004; Ощепкова и др., 2016). В структуре белков *WUS* и *WOX1–7* присутствует консервативный

домен, называемый WUS-бокс, длиной восемь аминокислотных остатков, последовательность которого представлена консенсусом TLPLFPMH (Haecker et al., 2004; Gao et al., 2014). Характерной чертой WOX5, позволяющей отличать данный транскрипционный фактор от других представителей семейства WOX, является наличие трипептида ESK (глутаминовая кислота, серин, лизин) в гомеодомене на N-конце ДНК-распознающей спирали, у остальных белков семейства этот домен представлен трипептидом EGK (глутаминовая кислота, глицин, лизин) (Nardmann, Werr, 2012; Ощепкова и др., 2016).

Ген *WOX5* у *Arabidopsis thaliana* экспрессируется только в клетках ПЦ апикальной меристемы корня (Haecker et al., 2004). Белок WOX5 способен мигрировать из клеток ПЦ в соседние окружающие его инициали всех типов тканей корня (Pi et al., 2015). Такая специфическая WOX5 определяет организующие свойства покоящегося центра. Так, мутации, приводящие к потере функции WOX5 у арабидопсиса, вызывают терминальную дифференцировку инициалей колумеллы (Sarkar et al., 2007). При том, что сверхэкспрессия WOX5 приводит к появлению расширенного пула клеток, подобных стволовым (Tian et al., 2014). Происходит это из-за того, что блокируется дифференцировка ИК (Richards et al., 2015).

Важно отметить, что домен экспрессии WOX5 совпадает с максимумом концентрации фитогормона ауксина. Такое четкое позиционирование экспрессии этого гена обеспечивается благодаря сложной сети положительных и отрицательных обратных связей между геном WOX5 и такими элементами сигнального пути ауксина, как транскрипционные факторы семейства ARF и их корепрессор IAA17 (Tian et al., 2014).

1.5. Ауксин, его распределение и транспорт

1.5.1. Физиологические эффекты ауксина

Развитие апикальной меристемы корня *A. thaliana* и поддержание пула стволовых клеток в большей степени зависит от фитогормона ауксина,

который вовлечен в различные процессы развития растений, например, регуляцию периодичности и места закладки боковых корней (Высоцкая и др., 2007), регуляцию грави- и фото-тропизма растения (Медведев, 2012), активацию удлинения корневых волосков (Блюм Я. Б. и др., 2012). Также ауксин принимает участие в формировании цветка (Чуб, Синюшин, 2012). Регуляция ауксином столь разнообразных процессов происходит, например, за счет его влияния на скорость деления и удлинения клеток, в зависимости от его концентрации в клетке. Так, типичной для большинства клеточных ответов на ауксин является кривая дозовой зависимости величины ответа от концентрации ауксина, имеющая форму колокола (Campanoni and Nick, 2005).

Многочисленные физиологические эффекты ауксина обусловлены его неравномерным распределением в тканях растения (Liao, 2015; Vieten 2005). Известно, что поддержание максимума концентрации ауксина в клетках ПЦ является ключевым фактором в процессе формирования ниши стволовых клеток в апикальной меристеме корня (van den Berg et al. 1997; Sabatini et al. 1999). В экспериментах по отсечению кончика корня было показано, что по прошествии некоторого времени формирование максимума концентрации ауксина происходит на определенном расстоянии от кончика корня (Grieneisen et al., 2007; Mironova et al., 2010). При этом регенерация меристемы и восстановление нормального функционирования меристемы возможно только после восстановления паттерна распределения ауксина (Xu et al., 2006). Наравне с важным значением поддержания максимумов концентрации ауксина, формирование минимумов содержания ауксина является важным для протекания ряда процессов. Например, поддержание минимума ауксина на верхней границе апикальной меристемы корня необходимо для перехода клеток апикальной меристемы корня к дифференцировке (Di Mambro et al., 2017), для раскрытия плодов *A. thaliana* (Sorefan et al., 2009) и во вставочных меристемах для формирования листа (Qi et al., 2014, Wang et al., 2014a,b).

Стоит также отметить, что в ответе на гравитацию основную роль играет формирование асимметричного распределения ауксина в корневом чехлике,

благодаря чему, происходит формирование изгиба кончика корня (Marchant et al., 1999; Rashotte et al., 2000; Friml et al., 2002b).

1.5.2. Синтез ауксина

Описано множество веществ, обладающих ауксиноподобным действием. Основным активным ауксином растительных организмов является индолилуксусная кислота (ИУК). Другими естественными ауксинами являются масляная и фенилуксусная кислоты (Цыганкова и др., 2005).

В настоящее время путь синтеза из L-триптофана, через индолил-3-пировиноградную кислоту (ПВК), которая под действием ферментов семейств TAA/TAR и YUCCA (YUC) превращается в ИУК, признан основным (Ljung 2013). Другие триптофан-зависимые пути синтеза осуществляются через индол-3-ацетамид, трипамин или индол-3-ацетальдоксин. В проростках *A. thaliana* синтез ауксина происходит в апексе побега, в примордиях листьев и молодых листьях, во взрослом растении синтез ауксина в наземной части растения сохраняется, хотя дополнительно может происходить и в других частях, в том числе и в корне (Ljung et al., 2005).

1.5.3. Распределение ауксина в корне *A. thaliana*

Поскольку основной синтез ауксина происходит в наземной части растения, для формирования паттерна распределения ауксина в корне большое значение имеет транспорт ауксина, включающий в себя пассивный транспорт по флоэме и диффузию внутри цитоплазмы клеток и апопласта, а также пассивный и активный полярный транспорт через мембрану клетки (Swarup et al., 2001; Zažímalová et al., 2010). Пассивный транспорт по флоэме активных и конъюгированных форм ИУК обеспечивает поддержание баланса между свободными и связанными формами ауксина в тканях растения (Swarup et al., 2001). ИУК является слабой кислотой ($pK=4,75$) (Kramer, Bennett, 2006), следовательно, в слабокислой среде апопласта около половины ауксина диссоциирует, в связи с чем не может диффундировать сквозь липофильную цитоплазматическую мембрану клетки, в то время как недиссоциированная

часть молекул проникает через мембрану в клетку по градиенту концентрации. Слабощелочная среда цитоплазмы обеспечивает диссоциацию ИУК с выделением протонов, которые выводятся из клетки H^+ -АТФазой. Оставшиеся анионы ауксина не могут проникнуть через мембрану клетки, приводя к накоплению ауксина внутри клеток. Регуляцию концентрации ауксина в клетке осуществляют специфические трансмембранные белки-транспортеры ауксина семейств PIN, AUX/LAX и ABCB (Friml et al., 2003; Blilou et al., 2005; Geisler, Murphy, 2006). Именно за счёт существования активного транспорта ауксина внутрь и наружу клетки возможно формирование столь большого разнообразия паттернов распределения ауксина, которые характерны для различных событий морфогенеза.

Уже в четырехдневных проростках *A. thaliana* наблюдается градиент концентрации ауксина, формируемый благодаря транспорту ауксина из побега в корень и биосинтезу ауксина в апикальной меристеме корня. С помощью масс-спектрометрии было показано, что концентрация ИУК в кортексе, эндодермисе и стеле в меристематической зоне в 2 раза, а в ПЦ в 5 раз выше, чем в остальных тканях корня (Petersson et.al., 2009). Однако с помощью современных экспериментальных методов невозможно напрямую измерить концентрацию этого низкомолекулярного метаболита метаболита в отдельно взятой клетке. Поэтому были созданы репортерные генетические конструкции, чувствительные к концентрации ауксина: DR5, DII-VENUS, R2D2 (Sabatini et.al., 1999; Brunoud et al., 2012; Band L., 2014; Liao et.al., 2015). Так, согласно экспрессии репортеров ауксина, наибольший уровень ауксина регистрируется в ПЦ, ИК и двух рядах ДКК, инициалах стелы и их ранних потомках и в дифференцирующихся клетках ксилемы (Рис. 3). Другие клетки в проксимальной меристеме имеют более низкий уровень с минимумом в эпидермисе и кортексе.

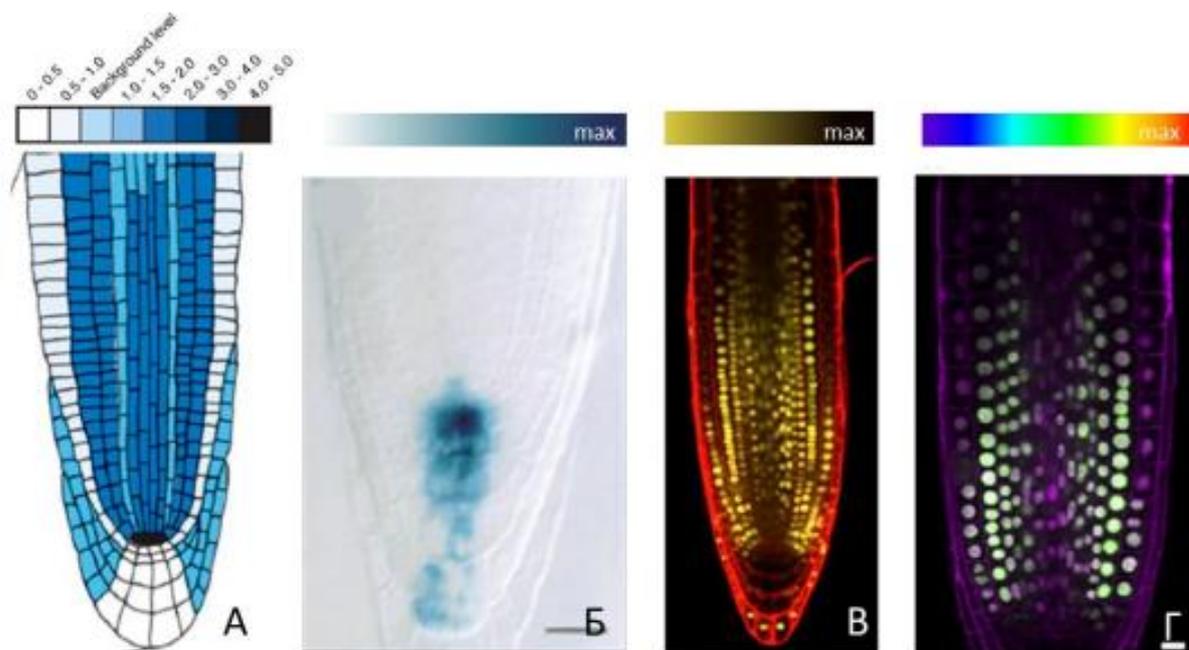


Рис. 3. Распределение ауксина в апикальной меристеме корня *A. thaliana*, выявленное с помощью методов: массспектрометрии (А), репортерных ауксин-чувствительных конструкций DR5 (Б), DII-VENUS (В), R2D2 (Г) (Иллюстрация заимствована из Коврижных, 2016).

1.5.4. Активный транспорт ауксина

Формирование неравномерного распределения ауксина происходит благодаря функционированию трех семейств белков, осуществляющих активный транспорт этого фитогормона. Семейство трансмембранных белков AUXIN-INSENSITIVE1/LIKE AUX1 (AUX/LAX) ответственно за приток ауксина в клетку из апопласта, в то время как другое семейство белков PIN-FORMED (PIN) в основном отвечает за отток ауксина из клетки наружу, а подсемейство В белков транспортеров ABC (ABCB) осуществляет как приток ауксина в клетку, так и отток ауксина наружу (Bennett et al., 1996; Blilou et al., 2005; Friml et al., 2003; Geisler, Murphy, 2006). Кроме того, недавно открытое семейство белков PIN-LIKES (PILS) транспортирует ауксин между цитоплазмой и эндоплазматическим ретикуломом внутри клетки (Barbez et al., 2012). Однако в большей степени паттерн распределения ауксина в апикальной меристеме корня опосредован различным расположением белков-транспортеров семейства PIN на мембране, которые формируют полярные

разнонаправленные потоки ауксина (Petrásek et al., 2006; Wisniewska et al., 2006, Коврижных В.В. и др., 2014). Все белки семейства PIN у *A. thaliana* можно разделить на два подсемейства (Krecek et al., 2009). К первому подсемейству можно отнести белки PIN1 – PIN4 и PIN7, благодаря которым осуществляется транспорт из клетки, ко второму подсемейству относят белки PIN5, PIN6 и PIN8, которые участвуют в поддержании гомеостаза ауксина внутри клетки (Mravec et al., 2009).

1.5.5. Экспрессия PIN белков в апикальной меристеме корня *A. thaliana*

Различные паттерны экспрессии белков PIN1 - PIN4 и PIN7 в апикальной меристеме корня определяют формирование направленных потоков ауксина, необходимых для формирования градиента концентрации ауксина с максимумом в ПЦ (Ferguson, Friml, 2008). PIN1 локализован на нижней стороне клеток сосудистого цилиндра, соответственно, он формирует поток ауксина в направлении к ПЦ (Рис. 4А) (Friml et al., 2002a; Vieten et al., 2005; Omelyanchuk et al., 2016). Поток ауксина в противоположном направлении (т.е. к побегу) в наружных слоях корня формирует белок PIN2, расположенный на верхней стороне клеток эпидермиса и бокового корневого чехлика (Рис. 4Б) (Friml et al., 2003; Vieten et al., 2005). В кортексе PIN2 локализован на нижней стороне клеток, что также создает поток ауксина к ПЦ. При этом оба PIN белка дополнительно располагаются на латеральной поверхности клеток (Friml et al., 2003; Blilou et al., 2005; Grieneisen et al, 2007). Белки PIN3, PIN4, PIN7 имеют сложный схожий паттерн экспрессии, состоящий из двух частей, расположенных в колумелле и сосудистой системе (Рис. 4В,Г). При этом все 3 белка, как правило, расположены на всех сторонах клеток в колумелле, обеспечивая перераспределение ауксина в кончике корня, а в сосудистой системе преимущественно на нижней стороне клеток, приводя к усилению потока ауксина из побега в корень (Friml et al., 2002; Friml et al., 2002b; Blilou et al., 2005).

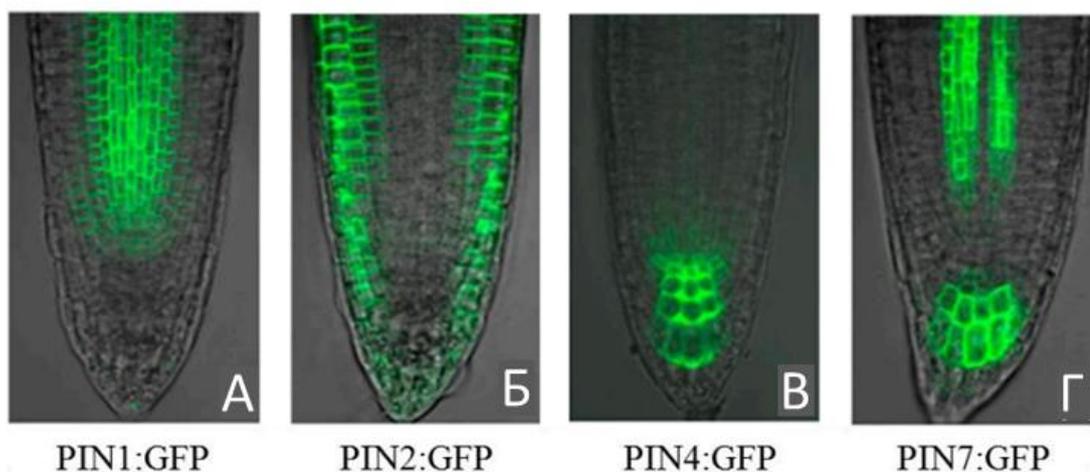


Рис. 4. Экспрессия белков PIN1 (А), PIN2 (Б), PIN4 (В), PIN7 (Г) в апикальной меристеме корня *A. thaliana* (адаптировано из Feraru, Friml, 2008).

Из экспериментов известно, что существует сложная сеть регуляции ауксином экспрессии своих белков-транспортёров семейства PIN, включающая как положительные, так и отрицательные обратные связи. Ауксин оказывает влияние на экспрессию *PIN* на транскрипционном и посттранскрипционном уровне, контролируя скорость своего потока из клетки (Friml et al., 2004; Geldner et al., 2001; Sauer et al., 2006; Vieten et al., 2005; Vieten et al., 2007). Так, например, в Институте Цитологии и Генетики СО РАН было показано, что ауксин оказывает положительный эффект на уровень экспрессии промотора *PIN1*, и в то же время является негативным регулятором на посттранскрипционном уровне (Omelyanchuk et al., 2016). Экспериментально было показано, что обработка шестидневных проростков растений *A. thaliana* дикого типа экзогенным ауксином приводит к увеличению экспрессии практически всех генов *PIN* в корне, хотя скорость ответа на ауксин у всех генов была разной (Vieten et al., 2005). Известно, что кроме активации транскрипции, высокие концентрации экзогенного ауксина активируют деградацию белков семейства PIN, причем разные дозы ауксина активируют деградацию разных белков (Vieten et al., 2005).

1.6. Исследование распределения ауксина как способ анализа механизмов действия внешних факторов на развитие корня

Несмотря на то, что рост и развитие растений, а также реакция на различные стимулы окружающей среды, регулируется посредством сложной сети гормональных взаимодействий, ауксин является общим фактором в большинстве из этих взаимодействий (Rahman, 2013). Хотя некоторые взаимодействия происходят на уровне биосинтеза (например, взаимодействие ауксин-этилен или ауксин-гиббереллины) или на уровне передачи сигнала (ауксин-брасиностероиды или ауксин-цитокинин), было показано, что регуляция процесса транспорта ауксина включена во все перекрестные взаимодействия ауксина с другими фитогормонами. Таким образом, любые изменения в паттерне распределения других гормонов приводят к изменению паттерна белков транспортеров ауксина, что, в свою очередь, оказывает влияние на паттерн распределения ауксина в ткани растения.

Например, этилен активирует экспрессию белков транспортеров ауксина AUX1 и PIN2 в зоне растяжения, что вызывает замедление роста клеток и корня в целом (Ruzicka et al., 2007). В зрелом корне этилен, наоборот, ингибирует AUX1, активируя при этом PIN3 и PIN7, что приводит к отсутствию градиента ауксина, необходимого для формирования боковых корней (Lewis et al., 2011). Цитокинин модулирует градиент ауксина посредством негативной регуляции PIN1, PIN2, PIN3 и позитивной регуляции PIN7, что было показано на основании анализа трансгенных линий PIN::PIN-GFP (Ruzicka et al., 2009). Гиббереллины также участвуют в регуляции транспорта ауксина. Было показано, что эти гормоны ингибируют экспрессию PIN1 и PIN2 и активируют деградацию PIN2, что, в свою очередь, оказывает влияние на дифференцировку семядолей и гравитропизм корня (Willige et al., 2011). В мутантных линиях арабидопсиса *dim1* и *det2*, со сниженным биосинтезом брасиностероидов, уменьшается экспрессия PIN2, PIN3, PIN4, причем было показано, что обработка экзогенными брасиностероидами приводит к расширению домена экспрессии PIN2 транспортера в зоне

растяжения корня (Li et al., 2005). Жасминовая кислота влияет на экспрессию генов семейства PIN как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне, а также может влиять на субклеточное распределение белка PIN2, ингибируя эндоцитоз (Sun et al., 2009; Sun et al., 2011). Для абсцизовой и салициловой кислот было также показано влияние на экспрессию различных PIN генов (Shkolnik-Inbar, Bar-Zvi, 2010; Pasternak et al., 2019). Причем для салициловой кислоты было показано, что описанное влияние зависит от дозы салициловой кислоты, применяемой при обработке корней растений (Pasternak et al., 2019).

Изменения в экспрессии белков-транспортеров ауксина под действием других фитогормонов непосредственно приводит к изменению распределения ауксина в ткани растения, что, в свою очередь, оказывает влияние на процессы роста и развития.

Таким образом, ауксин является важным фитогормоном, регулирующим большинство процессов развития растений, как в норме, так и при воздействии различных стрессов, взаимодействуя с путями передачи сигналов всех основных фитогормонов. Тем не менее, молекулярные и генетические процессы, лежащие в основе передачи сигнала и транспорта ауксина, являются нелинейными и содержат петли обратной связи, что определяет повышенную сложность системы (Goh et al., 2014). Наравне с этим до сих пор не существует достаточно точных методов, позволяющих отследить изменения в содержании ауксина на клеточном уровне, что имеет определяющее воздействие во многих морфогенетических процессах (Petersson et al., 2009; Sabatini et al., 1999; Brunoud et al., 2012; Band L., 2014; Liao et al., 2015). Учитывая, что процессы развития необходимо исследовать в динамике и в пространстве, а также описанную сложность систем транспорта и передачи сигнала ауксина, исследование механизмов действия ауксина требует привлечения методов математического моделирования.

1.7. Воздействие холода на распределение ауксина в корне

Впервые в работе Morris, 1979 автор показал, что температура влияет на скорость транспорта экзогенного ауксина в ряде видов: чем выше температура, тем выше скорость транспорта. Одни из первых работ по исследованию связи между ауксином и холодовым стрессом указали на изменение ответа на гравитацию и транспорта ауксина в направлении корня при обработке 4°С в течение 1-3 часов, причем при возвращении растения в комнатную температуру происходила нормализация ответа на гравитацию и транспорта ауксина в корне (Fukaki et al., 1996; Wyatt et al., 2002; Nadella et al., 2006).

В более поздней публикации 2009 года было показано, что при воздействии холодом на арабидопсис (4°С в течение 12 часов) происходит увеличение активности ауксин-чувствительного репортера DR5 во внешних тканях корня (Shibasaki et al., 2009). Также было показано, что базипетальный (по направлению к побегу) транспорт ауксина подавлялся под действием холода, за счет изменений внутриклеточного перемещения белка PIN2 (накопление в эндосомах), латеральный транспорт ауксина также нарушался за счет перераспределения белка PIN3 на мембране клетки. Другим примером изучения холодового стресса могут служить эксперименты по выращиванию арабидопсиса при температуре 16°С (Zhu et al., 2014). В данной работе было показано, что содержание ауксина в корнях арабидопсиса, выращенных при пониженной температуре, было значительно ниже, чем в контрольной группе. При этом наблюдалось снижение экспрессии белков-транспортёров ауксина PIN1, PIN3 и PIN7, что было показано на основе анализа линий PIN::PIN-GFP.

1.8. Моделирование молекулярно-генетических процессов в биологии

При создании математических моделей биологических процессов важным этапом является математическое описание исследуемых элементарных процессов, таких как деградация молекул, формирование белковых комплексов, ферментативные реакции с учетом регуляции их

активности различными факторами, а также процессы транскрипции и трансляции. Описание этих процессов необходимо как база для построения более сложных моделей, описывающих различные процессы онтогенеза живых организмов (см. раздел 1.9). Математические модели молекулярных процессов описываются в соответствии с законами действующих масс и сохранения массы (Кнорре и др., 1990). Наиболее простым примером применения этих законов является математическое описание деградации вещества:

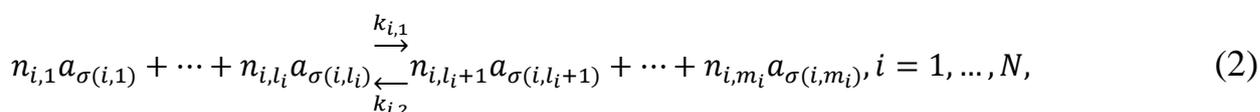
$$\frac{dx}{dt} = -kx, \quad (1)$$

где x – концентрация исследуемого вещества, t – время, а k – линейная константа скорости деградации.

Остальные элементарные процессы обычно требуют построения более сложных моделей. При определении сложности модели большую роль играет полнота сведений о структурных особенностях и механизмах функционирования рассматриваемой системы. Для построения моделей элементарных процессов используются такие методы, как химико-кинетический подход и метод обобщенных функций Хилла (Лихошвай, 2008).

1.8.1. Химико-кинетический подход

Химико-кинетический подход (Лихошвай, 2008) применяется для моделирования в том случае, когда для моделируемого процесса есть возможность написать совокупность химических реакций вида:



где N – общее количество реакций, a_1, \dots, a_M – общий список веществ, участвующих в реакциях, $n_{i,1}, \dots, n_{i,m_i}$ – стехиометрические коэффициенты, $\sigma(i, j)$ – функция специфичности вещества j -й позиции i -й реакции.

На основании данных химических реакций строится система дифференциальных уравнений следующего вида:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da_{\sigma(i,1)}}{dt} = n_{i,1} \left(-k_{i,1} \prod_{j=1}^{l_i} a_{\sigma(i,j)}^{n_{i,j}} + k_{i,2} \prod_{j=l_i+1}^{m_i} a_{\sigma(i,j)}^{n_{i,j}} \right) \\ \vdots \\ \frac{da_{\sigma(i,l_i)}}{dt} = n_{i,l_i} \left(-k_{i,1} \prod_{j=1}^{l_i} a_{\sigma(i,j)}^{n_{i,j}} + k_{i,2} \prod_{j=l_i+1}^{m_i} a_{\sigma(i,j)}^{n_{i,j}} \right) \\ \frac{da_{\sigma(i,l_i+1)}}{dt} = n_{i,l_i+1} \left(-k_{i,1} \prod_{j=1}^{l_i} a_{\sigma(i,j)}^{n_{i,j}} + k_{i,2} \prod_{j=l_i+1}^{m_i} a_{\sigma(i,j)}^{n_{i,j}} \right) \\ \vdots \\ \frac{da_{\sigma(i,m_i)}}{dt} = n_{i,m_i} \left(-k_{i,1} \prod_{j=1}^{l_i} a_{\sigma(i,j)}^{n_{i,j}} + k_{i,2} \prod_{j=l_i+1}^{m_i} a_{\sigma(i,j)}^{n_{i,j}} \right) \end{array} \right. \quad (3)$$

Для упрощения моделей при использовании химико-кинетического подхода используются предположения об избыточности содержания одних веществ по сравнению с другими, а также о существовании более быстрых и более медленных процессов (Тихонов, 1952).

Стационарный химико-кинетический подход отличается тем, что предполагается что система находится в равновесии, то есть рассматривается стационарное состояние исследуемой системы. Для описания поведения системы в данном случае используется уравнение (3), с условием что производные всех веществ равны нулю. Таким образом, из системы дифференциальных уравнений получается система алгебраических уравнений.

1.8.2. Метод обобщенных функций Хилла

Метод обобщенных функций Хилла используется для моделирования в условиях недостатка структурных данных, поскольку позволяет строить модели на основании только полученных кинетических кривых исследуемого процесса (Лихошвай, 2008). Модели, построенные в рамках данного метода, относятся к классу аппроксимирующих моделей. Тем не менее, при использовании данного метода тоже возможен учет данных о структурно-функциональной организации рассматриваемой системы. Для построения аппроксимирующих моделей можно использовать различные классы функций, однако лучше всего для этой цели подходит класс обобщенных функций Хилла (Likhoshvai, Ratushny, 2007). Данный класс функций является расширением класса рациональных полиномов, возникающих при применении стационарного химико-кинетического подхода, поэтому в их

структуре в неявном виде отражены биологические механизмы. Обобщенными функциями Хилла являются функции вида:

$$H_1(x_1, \dots, x_n) = \frac{\delta_0 + \sum_{i=1, \dots, N} \delta_i \omega_i \prod_{j \in D_i} \left(\frac{x_j}{\beta_j}\right)^{\gamma_{i,j}}}{1 + \sum_{i=1, \dots, N} \omega_i \prod_{j \in D_i} \left(\frac{x_j}{\beta_j}\right)^{\gamma_{i,j}}}, \beta_j > 0, \omega_i, \delta_0, \delta_i, \gamma_{i,j} \geq 0, \quad (4)$$

где x_j – измеряемые концентрации веществ, оказывающих влияние на данный процесс, β_j – положительная константа, имеющая размерность x_j , $\gamma_{i,j}$, ω_i , δ_0 , δ_i – неотрицательные безразмерные константы, $\gamma_{i,j}$ – хилловский коэффициент, который отражает степень нелинейности влияния веществ x_j на процесс.

Суммы и произведения обобщенных функций Хилла также являются обобщенными функциями Хилла, как и функции, полученные из обобщенной функции Хилла подстановкой вместо параметров β_j , $\gamma_{i,j}$, ω_i , δ_0 , δ_i корректных, по смыслу заменяемого параметра, обобщенных функций Хилла (Likhoshvai, Ratushny, 2007).

1.9. Математическое моделирование в биологии развития растений

В биологии развития растений процессы, связанные с синтезом, транспортом и передачей сигнала ауксина, стали точками приложения методов математической и системной биологии (Rudge, Haseloff, 2005; Prusinkiewicz, Runions 2012; Goh et al., 2014; Mosca et al., 2018). Это связано с тем, что с одной стороны, есть много количественных экспериментальных данных, а с другой стороны, за наблюдаемыми в исследованиях изменениями стоят сложные механизмы, изучение которых невозможно без применения современных вычислительных методов. Начиная с 2006 года, в этой области опубликованы десятки работ, в которых главными методами исследования были методы математического моделирования. С помощью компьютерных моделей исследователям удалось изучить некоторые динамические особенности механизмов транспорта и клеточного ответа на ауксин. Компьютерные модели упрощают анализ уже известных механизмов, а также позволяют глубже разобраться в определенных биологических процессах,

также компьютерное моделирование может быть использовано для анализа существующих гипотез и отбора тех из них, что приводят к более правдоподобным результатам с точки зрения экспериментальных данных (Krupinski, Jönsson, 2010). Кроме того, методы математического моделирования успешно применяются и для исследования действия ауксина на ростовые процессы в растении, включая деление клеток (Mosca et al., 2018).

1.9.1. Первые математические модели распределения ауксина в тканях растения

В одной из первых моделей в области биологии развития растений, модели, предложенной Митчисоном (Mitchison, 1981), было сделано предположение, что поток ауксина через положительную обратную связь влияет на проницаемость мембран для ауксина. Как результат, поток ауксина между клетками усиливается и формирует полосы повышенной и пониженной концентрации вещества. В природе такое распределение ауксина можно наблюдать при формировании жилок. Автор модели показал, что паттерн распределения ауксина может образовываться на основе упрощенных представлений клеток в виде прямоугольника, одна сторона которых выступает в качестве источника ауксина, а противоположная, соответственно, стока.

Другой группой исследователей была построена модель распределения ауксина в клеточном ансамбле эллиптической формы с шестиугольными клетками. Расчет модели показал образование различных паттернов распределения ауксина в стационарных решениях, некоторые из них напоминали ветвящиеся структуры жилок листа (Feugier et al., 2005). Модель была построена на основании современных знаний о механизме регуляции экспрессии белка PIN1.

Профессор Крамер предположил, что поляризация белка PIN1 на мембране клеток происходит благодаря концентрационному градиенту ауксина в клетке, а не потоку ауксина через мембрану (Kramer, 2009). Автор показал, что модель, основанная на хемиосмотическом транспорте (Goldsmith

et al., 1981) в клеточном ансамбле в форме прямоугольника с определенными граничными условиями стоков и источников ауксина, может образовывать канал клеток с повышенной концентрацией ауксина.

Модель, разработанная де Ревиль и соавторами (de Reuille et al., 2006), предполагает, что активный транспорт ауксина посредством белка PIN1 имеет постоянную скорость, может либо присутствовать на мембране, либо полностью отсутствовать, в зависимости от порогового значения концентрации ауксина. Численный анализ модели показал образование стационарных пиков концентрации ауксина в клеточном ансамбле, в соответствие с экспериментальными данными о расположении зачатков листьев в меристеме побега (филлотаксисе). Модель также предсказывает высокий уровень ауксина на верхушке меристемы побега, который был обнаружен с использованием IAA-специфических моноклональных антител (но не обнаружен репортером DR5).

Йонсон и соавторы создали модель регулируемой ауксином циркуляции PIN1 между цитоплазмой и мембраной в клетках меристемы побега (Jönsson et al., 2006). В модели был рассмотрен динамический клеточный ансамбль сферических клеток, которые росли и делились в процессе расчета модели. Данная модель породила различные паттерны распределения ауксина в зависимости от заданных параметров, хотя и была неустойчива, в силу несовершенства описания роста клеток и пролиферации. Авторы этой работы впервые показали механизмы самоорганизации, которые могут приводить к формированию филлотаксиса.

В своей модели Салин и соавторы показали, что предлагаемый в работе (Jönsson et al., 2006) механизм обратной связи между PIN1 и ауксином, вызванной изменением концентрации ауксина, также может генерировать паттерны, соответствующие не только максимумам концентрации, наблюдаемым в меристеме побега, но и, например, полосам с повышенной концентрацией, наблюдаемым при жилковании листа (Sahlin et al., 2009).

Было создано еще несколько моделей, подтверждающих предположение о том, что обратная связь между концентрацией ауксина в клетке и поляризацией PIN1 в соседних клетках является основой механизма формирования паттернов (Smith et al., 2006; Bayer et al., 2009; Merks et al., 2007; Krupinski, Jönsson, 2010). Все эти модели приводили к формированию различных паттернов распределения ауксина, соответствующих известным экспериментальным данным. В дальнейшем это предположение было успешно использовано в математических моделях, изучающих формирование распределения ауксина в корне.

1.9.2. Математические модели распределения ауксина в корне с использованием прямоугольного клеточного ансамбля

В 2005 году вышла первая статья, сочетающая результаты экспериментального исследования и данные, полученных с помощью математического моделирования для исследования развития корня (Swarup et al., 2005). В работе была показана важность экспрессии транспортера AUX1 в эпидермисе, в проведении сигнала от кончика корня к месту перегиба корня, возникающего в ответ на гравитропизм. Моделирование транспорта ауксина базировалось на хемиосмотической теории (Goldsmith et al., 1981) с использованием параметров, полученных на основе экспериментальных данных. Модель показала, что AUX1 играет ключевую роль в сохранении паттерна распределения ауксина в эпидермальном слое, а также в поддержании асимметрии распределения ауксина в ткани в условиях гравитропизма.

В работе (Grieneisen et al., 2007) представлена первая модель формирования градиента концентрации ауксина в кончике корня. Исследователи предположили, что первостепенная роль в формировании концентрации ауксина принадлежит анатомической структуре корневой меристемы. Идея основана на концепции «обратного фонтана», предложенной в работе (Swarup, Bennett, 2003). Согласно данной концепции акропетальный, латеральный и базипетальный потоки ауксина согласованы между собой

таким образом, что в кончике корня формируются замкнутые потоки по типу обратного фонтан, которые формируют экспериментально наблюдаемое распределение ауксина с максимумом и градиентом. В 2D-компьютерной модели ткань корня представлена как прямоугольный клеточный ансамбль, состоящий из четырех типов клеток, которые различаются по расположению PIN белков на мембране (Рис. 5.). Для двух внешних слоев клеток характерно расположение PIN на верхней и боковой поверхности клетки, внутренние слои характеризуются расположением PIN на нижней и боковой поверхности клетки или только на нижней для центральных рядов клеток, а для участка клеточного ансамбля, соответствующего КЧ, белки-переносчики PIN располагаются на всех сторонах клетки. Каждая клетка представлена в виде сетки, концентрация ауксина для каждой ячейки данной сетки рассчитывается отдельно. Для описания распределения ауксина учитываются следующие процессы: синтез и деградация ауксина, диффузия внутри клетки и транспорт через мембрану.

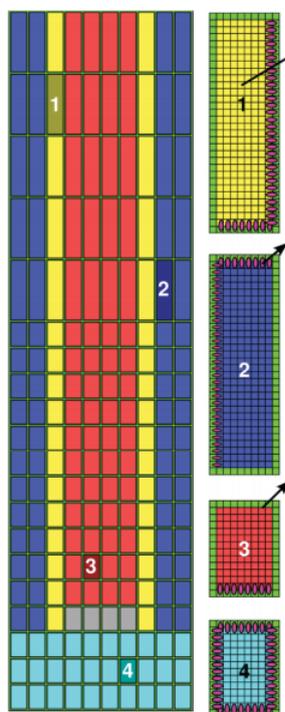


Рис. 5. Прямоугольный клеточный ансамбль, состоящий из четырех типов клеток, использованный в работе (Grieneisen et al., 2007). Разные типы клеток обозначены разными цветами. Розовыми овалами обозначено расположение PIN белков на мембранах клеток.

В общем случае дифференциальное уравнение для описания изменения концентрации ауксина в системе выглядит следующим образом:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \vec{\nabla} * \vec{J} + b - \delta_{decay} C; \quad (5)$$

$$\vec{J} = \begin{cases} -(P_{epin} \hat{n}) C_{in} + (P_i \hat{n}) C_{out}, & \text{если PIN экспрессируются} \\ -(P_{ebg} \hat{n}) C_{in} + (P_i \hat{n}) C_{out}, & \text{если PIN не экспрессируется} \end{cases}; \quad (6)$$

где C – концентрация ауксина, D – коэффициент диффузии, \vec{J} – поток ауксина через плазматическую мембрану клетки, b – константа биосинтеза ауксина, δ_{decay} – константа деградации ауксина, P_{epin} – коэффициент проницаемости мембраны, на которой есть белок PIN, P_{ebg} – коэффициент проницаемости мембраны не содержащей PIN, P_i – коэффициент проницаемости вдоль мембраны, \hat{n} – направленный внутрь единичный вектор, перпендикулярный мембране, C_{in} – концентрация ауксина в цитозоле в ячейке, граничащей с клеточной мембраной, C_{out} – концентрация ауксина в ячейке, непосредственно смежной к клеточной мембране.

Эта модель показала, что экспериментально наблюдаемого расположения транспортеров ауксина достаточно для формирования пика концентрации ауксина в кончике корня. В рамках данной модели был проанализирован рост корня. Полученные уровни концентрации ауксина в различных частях кончика корня соответствовали известным экспериментально полученным паттернам экспрессии DR5 в кончике корня.

Аналогичная модель использовалась для изучения взаимосвязи распределения ауксина с процессами формирования боковых корней (Laskowski et al., 2008). Было показано, что образование бокового корня в месте перегиба зависит от экспрессии транспортера ауксина LAX3 в клетках перицикла, лежащих в основании нового бокового корня. А также было показано, что перегиб корня может привести к локальному увеличению концентрации ауксина, чего может быть достаточно для образования боковых корней в месте перегиба. Изменение формы клеток в точке перегиба приводит

к увеличению концентрации ауксина в клетках перицикла на внешней стороне изогнутого корня, а не на внутренней, что может объяснить паттерн закладки боковых корней.

Проблема механизмов самоорганизации потоков ауксина в кончике корня исследовалась в ИЦиГ СО РАН под руководством Лихошвая В. А. (Лихошвай и др., 2007; Акбердин и др., 2009; Лихошвай и др., 2009; Mironova et al., 2010; Mironova et al., 2012).

Модель «обратного фонтана» не применима для объяснения механизмов распределения ауксина в тех случаях, когда структура корня не сформирована или была нарушена. Поэтому перед исследователями (Mironova et al., 2010) стояла задача выявить механизм самоорганизации паттерны экспрессии транспортеров ауксина, который бы в дальнейшем мог действовать параллельно с механизмом «обратного фонтана».

В работе был предложен механизм «отраженной волны», в основе которого лежат данные о том, что ауксин имеет позитивную и негативную обратную связь на экспрессию своих белков-транспортеров PIN. В модели было заложено, что при низких концентрациях активировался синтез белка PIN, в то время как при высоких концентрациях активировалась его деградация. Ауксин является активатором транскрипции семейства PIN белков через Aux/IAA-ARF сигнальный путь (Ulmasov et al., 1999). Полярное расположение белков-транспортеров на клеточной мембране тоже может регулироваться ауксином (Friml et al., 2003; Vieten et al., 2005; Blilou et al., 2005). Негативная обратная связь обеспечивается усилением деградации PIN белков, которая наблюдается при высокой концентрации ауксина (Vieten et al., 2005).

В данной работе были разработаны две математические модели для описания распределения ауксина в корне растения, одномерная и двумерная, в которых переменными является ауксин и белок PIN.

Ниже приведены уравнения только для одномерной модели:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da_1}{dt} = D(a_2 - a_1) + K_0 a_2 PIN_1 - K_d a_1 \\ \frac{dPIN_1}{dt} = \frac{k_1 \left(\frac{a_1}{q_1}\right)^{h_1}}{1 + \left(\frac{a_1}{q_2}\right)^{h_1}} - k_2 PIN_1 \left(1 + \left(\frac{a_1}{q_3}\right)^{h_2}\right) \\ \dots \\ \frac{da_i}{dt} = D(a_{i+1} + a_{i-1} - 2a_i) + K_0(a_{i+1} PIN_i - a_i PIN_i) - K_d a_i \\ \frac{dPIN_i}{dt} = \frac{k_1 \left(\frac{a_i}{q_1}\right)^{h_1}}{1 + \left(\frac{a_i}{q_2}\right)^{h_1}} - k_2 PIN_i \left(1 + \left(\frac{a_i}{q_3}\right)^{h_2}\right) \\ \dots \\ \frac{da_N}{dt} = \alpha + D(a_{N-1} - 2a_i) - K_0 a_N PIN_N - K_d a_1 \\ \frac{dPIN_N}{dt} = \frac{k_1 \left(\frac{a_N}{q_1}\right)^{h_1}}{1 + \left(\frac{a_N}{q_2}\right)^{h_1}} - k_2 PIN_N \left(1 + \left(\frac{a_N}{q_3}\right)^{h_2}\right) \end{array} \right. \quad (7)$$

где a_i и PIN_i – концентрации ауксина и белка PIN в клетке с номером i , D – константа скорости диффузии, K_0 – константа скорости активного транспорта ауксина, K_d – константа скорости деградации ауксина, k_1 – константа скорости синтеза белка PIN, q_1 – порог активации ауксин-зависимого синтеза PIN, q_2 – порог насыщения ауксин-зависимого синтеза PIN, k_2 – константа скорости деградации белка PIN, q_3 – порог активации ауксин зависимой деградации, h_1 и h_2 – коэффициенты, которые определяют степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина на скорость процессов ауксин-зависимого синтеза и деградации белка PIN на изменения внутриклеточного ауксина.

При анализе моделей было показано, что механизм «отраженной волны» не только обеспечивает самоорганизацию распределения ауксина в апикальной меристеме корня, но и может объяснить формирование в развитии других паттернов распределения ауксина в корне, например, ответственных за формирование боковых корней.

Двумерная модель (Mironova et al., 2010) позднее была разработана для учета трех обобщенных белков транспортеров PIN, различающихся по параметрам, отвечающим за ауксин зависимый синтез и деградацию белков PIN (Mironova et al., 2012) (Рис. 6).

Данная модель объединила два механизма «отраженной волны» (Mironova et al., 2010) и «обратного фонтана» (Grieneisen et al., 2007). Существование обратных связей между ауксином и его транспортерами, позволило получить из начального равномерного распределения паттерны экспрессии трех белков PIN1, PIN2, PIN3, то есть структуру «обратного фонтана», а затем паттерн распределения ауксина, качественно совпадающий с экспериментальными данными. Важно отметить, что модельные белки PIN в данной модели обобщали функции нескольких белков. Так, модельный белок PIN1 объединял все белки, обеспечивающие полярный транспорт ауксина по направлению к кончику корня, PIN2 – белки, отвечающие за полярный транспорт в сторону побега, а PIN3 – все белки, неполярно расположенные на мембранах клеток. С помощью модели были исследованы процессы регенерации, при декапитации кончика корня *A. thaliana*. В результате было показано, что регенерация апикальной меристемы корня в декапитированных корнях обеспечивается механизмом «отраженной волны», при этом в отрезанных кончиках корней локальный биосинтез ауксина, совместно с механизмом «обратного фонтана», обеспечивает поддержание апикальной меристемы корня.

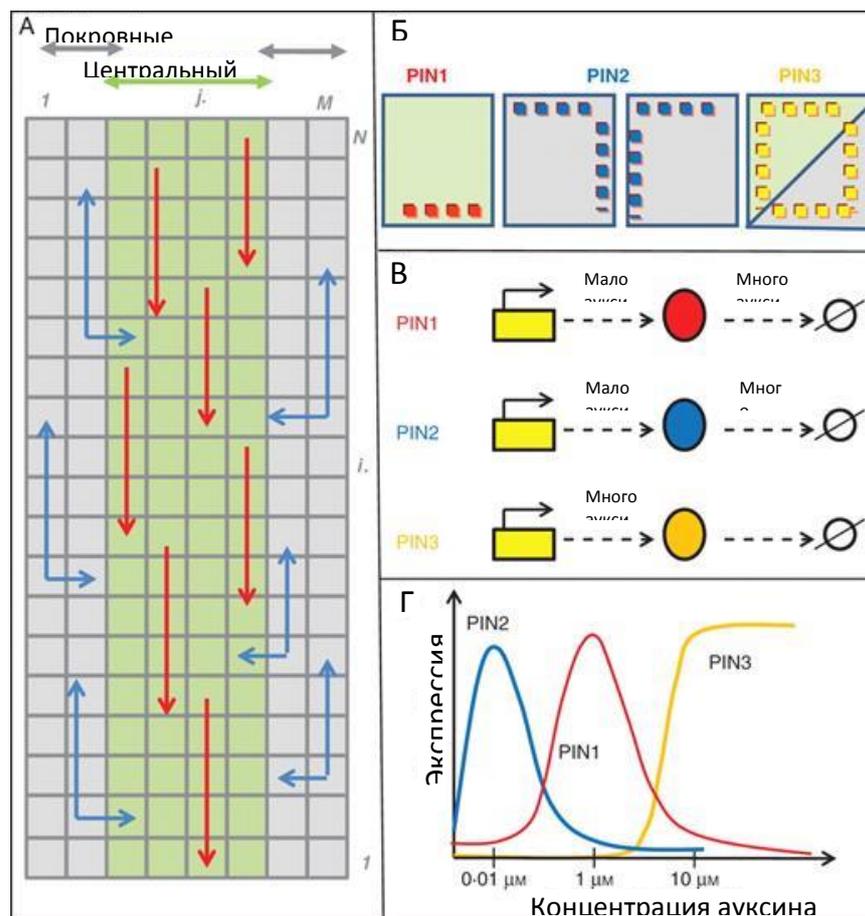


Рис. 6. Описание двумерной модели распределения ауксина из (Mironova et al., 2012). **А.** Прямоугольный клеточный ансамбль с двумя типами клеток, отображающими покровные ткани (серые) и ткани центрального цилиндра (зеленые). Стрелками обозначены потоки ауксина, формируемые белками PIN1 (красные) и PIN2 (синие). **Б.** Расположение белков PIN1, PIN2 и PIN3 на мембранах клеток. **В.** Феноменологическая модель ауксин зависимой регуляции экспрессии PIN белков. **Г.** Профили экспрессии белков транспортеров PIN в зависимости от концентрации ауксина (адаптировано из Mironova et al., 2012).

1.9.3. Математические модели распределения ауксина в корне с использованием реалистичного клеточного ансамбля

Несмотря на то, что использование прямоугольного клеточного ансамбля для моделирования корня растения позволяет решать огромное количество задач, прямоугольная форма искажает архитектуру ниши ствольных апикальной меристемы корня. При использовании в математических моделях прямоугольного клеточного ансамбля искажаются размеры клеток, и их взаимное расположение, особенно это характерно для ниши ствольных клеток и БКЧ. Так, например, в прямоугольном клеточном ансамбле невозможно

однозначно определить такие типы клеток как: инициаль кортекса и эндодермиса, инициаль перицикла, инициаль БКЧ и эпидермиса (Рис. 1). На данный момент в мире набирают популярность, так называемые портретные модели кончика корня – математические модели с ансамблем клеток, повторяющим морфологию корня (Cruz-Ramírez et al., 2012; Cruz-Ramírez et al., 2013; Band et al., 2014; Muraro et al., 2016)

Впервые для моделирования паттернов распределения ауксина и экспрессии некоторых регуляторных генов (*SCR*, *RBR*, *SHR*, *CYCD6;1*) в корне *Arabidopsis thaliana* был использован клеточный ансамбль, приближенно отражающий реальную структуру корня, в 2012 году в работе группы под руководством профессора Гринайнсен (Cruz-Ramírez et al., 2012) (Рис. 7). Описание структуры корня подобным образом позволило в явном виде представить в модели все типы инициалей корня. На основании предсказаний модели был уточнен механизм регуляции асимметричных делений инициалей кортекса и эндодермиса.

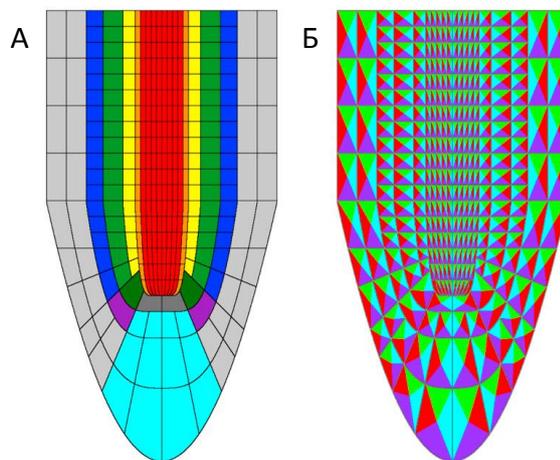


Рис. 7. Структура клеточного ансамбля (Cruz-Ramírez et al., 2012) **А.** Различные типы клеток в клеточном ансамбле корня. Красный – ткани сосудистого цилиндра, оранжевый – перицикл, желтый – эндодермис, зеленый – кортекс, темно-зеленый – инициали кортекса и эндодермиса, синий – эпидермис, светло-серый – боковой корневой чехлик, фиолетовый – инициали БКЧ и эпидермиса, темно-серый – ПЦ, голубой – колумелла. **Б.** Зоны, обозначающие восходящую (зеленую), нисходящую (пурпуровую), внутреннюю (голубую) и внешнюю (красную) часть клетки, используемые для правильного позиционирования в модели белков PIN.

В работе Бенд с соавторами (Band et al., 2014) был использован не приближенный клеточный ансамбль, а клеточный ансамбль, полностью повторяющий структуру продольного среза корня, полученный на основании экспериментальных изображений с конфокального микроскопа. В модели рассматривались следующие процессы: пассивный транспорт через мембрану клетки, активный транспорт через мембрану клетки с помощью белков семейств PIN и AUX/LAX, быстрая скорость синтеза ауксина в клетках покоящегося центра и колумеллы, медленная скорость синтеза ауксина во всех остальных клетках, деградация ауксина, диффузия ауксина через апопласт. При этом расположение белков транспортеров ауксина задавалось в модели предварительно в соответствии с экспериментальными данными (Рис. 8). В результате было показано, что неполярно расположенные транспортеры семейства AUX/LAX, поддерживают уровень ауксина в КЧ, в то время как полярно расположенные транспортеры семейства PIN контролируют направление транспорта ауксина в тканях корня.

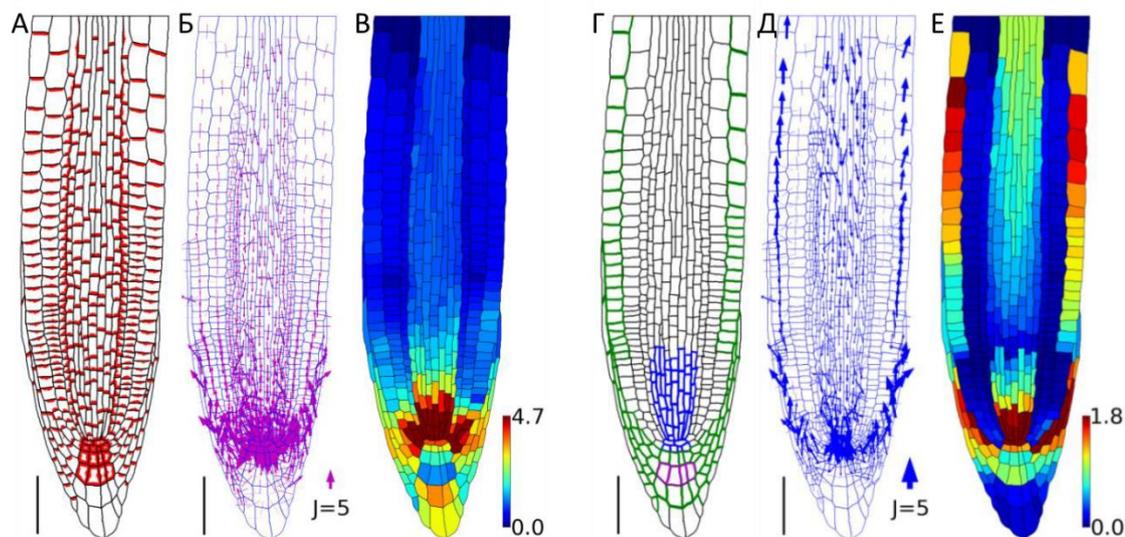


Рис. 8. Результаты моделирования распределения ауксина (Band et al., 2014). **А.** Распределение белков семейства PIN на мембранах клеток, воссозданное по экспериментальным данным. **Б.** Предсказанные потоки ауксина на основании распределения белков семейства PIN. **В.** Предсказанное распределение ауксина на основании распределения белков семейства PIN. **Г.** Распределение белков семейства AUX/LAX на мембранах клеток, воссозданное по экспериментальным данным. **Д.** Предсказанные потоки ауксина на основании распределения белков семейства

AUX/LAX и PIN. Е. Предсказанное распределение ауксина на основании распределения белков семейств AUX/LAX и PIN.

В модели, предложенной Мураро и соавторами (Muraro et al., 2016), также, как и в предыдущей модели (Band et al., 2014), был использован реалистичный клеточный ансамбль. Однако распределение ауксина моделировалось не столь детально, в модели большее внимание было уделено описанию взаимодействия ауксина с другими фитогормонами (цитокинином и гиббереллином), а также рядом регуляторных генов (*SHY2*, *ARR1*, *ARR12*, *АНК*, *RGA*). Схема математической модели представлена на Рис. 9.

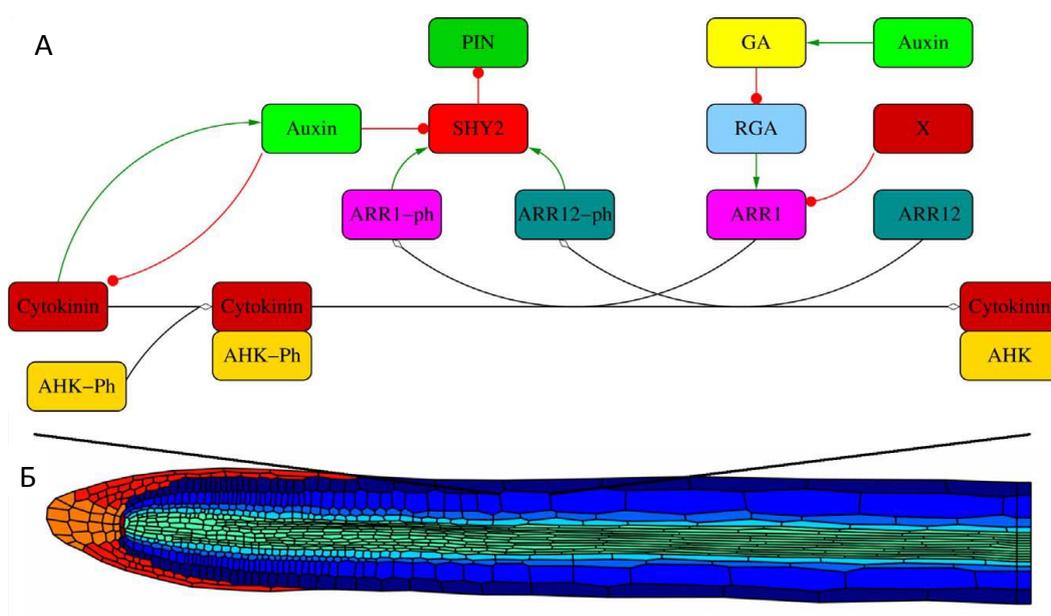


Рис. 9. Схема математической модели (Muraro et al., 2016). **А.** Регуляторный контур, описанный в модели, включает ауксин, цитокинин, гиббереллин и ключевые участники передачи сигнала этих фитогормонов. Зеленые стрелки указывают на активизацию, красные стрелки на подавление, реакции связанные с фосфорилированием и образованием комплекса Ск:АНК представлены черными стрелками. **Б.** Многоуровневая модель ткани корней. Различные цвета в корневых клетках представляют разные ткани; ткани КЧ окрашены красным и оранжевым цветом, сосудистая ткань – зеленым цветом, внешние ткани корня – синим цветом.

Стоит отметить, что все описанные модели, учитывающие реальную анатомическую структуру корня, либо не рассматривают PIN белки как самостоятельные переменные модели, оперируя понятием “проницаемость”

или “поток ауксина”, либо не учитывают сложную сеть регуляции ауксином экспрессии PIN белков.

1.9.4. Математические модели распределения ауксина с ростом и делением клеток

Важной задачей биологии развития растений является изучение процессов роста и деления клеток. Для изучения этих процессов успешно применяются методы математического моделирования. За последние 15 лет было разработано более десятка моделей с ростом и делением клеток, описывающие разные аспекты развития растений (Prusinkiewicz, Runions 2012; Goh et al., 2014; Mosca et al., 2018). Ниже рассмотрим модели, описывающие рост и деление клеток в корне растения.

В первой подобной модели использовался формализм «Cellular Potts Model» (CPM) (Grieneisen et al., 2007). Данный подход можно описать следующим образом: каждая клетка клеточного ансамбля, как и клеточные стенки, представлены в виде двумерной сетки ячеек, с индексами (i, j) для каждой ячейки. Каждой клетке задается некоторое значение индекса σ , одинаковое для каждой ячейки, из которых состоит клетка. Внешняя среда считается непрерывной структурой со значением индекса $\sigma = 0$. Таким образом значение σ изменяется в пределах от 0 до $N_{cells} + 1$ для того, чтобы учитывать внешнюю среду, клетки и клеточные стенки.

Управление динамикой формы и размера клетки производится через минимизацию свободной энергии конфигурации клетки, описанной гамильтонианом:

$$\mathcal{H} = \sum_{\langle nn \rangle} J_{\sigma_{ij}, \sigma'_{i'j'}} + \sum_{\sigma=1}^{N_{cells}} \lambda (A_{\sigma} - A_{target}(\sigma))^2. \quad (8)$$

где первый член отвечает за локальные взаимодействия между соседними клетками, J – константа энергии, зависящая от значений σ_{ij} , если $\sigma_{ij} = \sigma_{i'j'}$, то ячейки принадлежат одной клетке, при этом состояние, когда $\sigma_{ij} \neq \sigma_{i'j'}$, определяет границы клеток. Второй член выражения учитывает стерические

характеристики клетки, при этом затраты энергии клетки зависят от отклонения площади ее поверхности A_{target} от некоторого среднего значения A_{σ} . Значение A_{target} изменяется в процессе расчета модели в зависимости от концентрации ауксина в клетке. Также существуют ограничения на размер клетки в модели: $A_{min} < A_{target} < A_{max}$.

Изменение конфигурации клетки описано через вероятность Больцмана:

$$p(\sigma_{i,j} \rightarrow \sigma_{i',j'}) \begin{cases} = 1 & \text{if } \Delta\mathcal{H} \leq -Y \\ = e^{-\frac{\Delta\mathcal{H}+Y}{kT}} & \text{if } \Delta\mathcal{H} \geq -Y \end{cases} \quad (9)$$

Для роста клеток модели описано два состояния клетки: медленного роста с постоянной скоростью $T1$ и быстрого ауксин-зависимого роста $T2(a)$:

$$T2(a) = \max\left(\alpha \cdot \ln \frac{a}{a_{min}}, 0\right), \quad (10)$$

где a_{min} – пороговое значение концентрации ауксина.

После времени $T1 + T2(a)$ клетка может поделиться снова. Получается, что при низких концентрациях ауксина клетка растет, а при высоких делится.

На основании одномерной модели распределения ауксина в дифференциальных уравнениях по механизму «отраженной волны», описанной в разделе 1.9.2, была разработана модель распределения ауксина с ростом и делением клеток, учитывающая также распределение гипотетического фактора деления (Mironova et al., 2010).

Для описания роста и деления клеток в модели были введены две фазы: «фаза роста» и «фаза ожидания перед делением». Изменение размеров клетки в процессе роста были заданы следующим уравнением:

$$r = r_0 + K_{growth}\tau = const, \quad (11)$$

где r_0 – размер клетки на момент вступления в фазу роста, r – размер клетки после прохождения фазы роста, K_{growth} – константа скорости роста, τ – длительность фазы роста.

Длительность фазы роста была описана функцией:

$$f_{GP}(r) = \frac{1}{1+e^{(-10^2(r-r_{min}))}}, \quad (12)$$

где r – размер клетки после прохождения фазы роста, r_{min} – минимальный размер клетки, при котором она способна к делению.

В момент окончания фазы роста клетка тут же вступает в фазу ожидания деления. Длительность фазы ожидания деления зависит от концентрации гипотетического фактора деления:

$$f_{IP}(DivF) = \frac{\left(\frac{DivF}{k_{div,1}}\right)^{h_{div,1}}}{1+\left(\frac{DivF}{k_{div,2}}\right)^{h_{div,2}}}, \quad (13)$$

Авторам обеих моделей (Grieneisen et al., 2007; Mironova et al., 2010), несмотря на различные способы описания процессов роста и деления клеток, удалось воспроизвести характерное поведение клеток в растущем корне.

1.9.5. Математические модели, описывающие процессы, происходящие в корневом чехлике

Отдельно стоит выделить математические модели, разработанные для исследования процессов, происходящих в колумелле и БКЧ.

Исследование феномена поддержания постоянного числа клеток колумеллы в процессе последовательно происходящих делений ИК и сдушивания последней ДКК было проведено группой ученых из Швеции (Dubreuil et al., 2018). В рамках данного исследования была разработана одномерная математическая модель распределения некоторого гипотетического фактора ниши стволовых клеток, распространяющегося из ПЦ. В результате анализа математической модели ими было показано, что наличия двух пороговых значений в модели достаточно для воспроизведения последовательной смены процессов цикла, происходящего в колумелле: деление ИК, рост ИК и ДКИК, отделение последней ДКК, растяжение ДКИК (Рис. 10).

При этом деление ИК происходит при максимальной концентрации гипотетического фактора, в то время как сдушивание последней ДКК – при

минимальной концентрации. В результате анализа экспериментальных данных на роль потенциального фактора ниши стволовых клеток был предложен фитогормон ауксин, поскольку деления ИК происходят при максимуме флуоресцентного сигнала репортера ауксина, конструкции DR5::GFP, в колумелле, в то время как сдвигивание последней ДКК сопровождается наличием минимума сигнала DR5::GFP в колумелле.

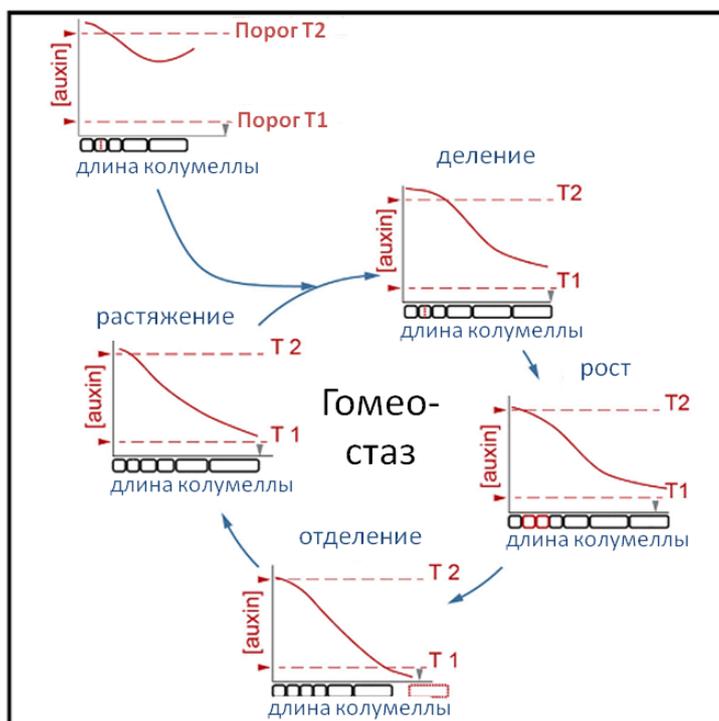


Рис. 10. Схема математической модели поддержания размеров колумеллы, отражающая последовательную смену следующих этапов: деление ИК, рост ИК и ДКИК, отделение последней ДКК, растяжение (быстрый рост ДКИК и ДКК). Поддержание гомеостаза колумеллы обеспечивается различным поведением клетки в зависимости от концентрации в ней ауксина: при концентрации ауксина в клетке ниже порога T1 клетка отделяется, при концентрации ниже T1 и выше T2 – растет, при концентрации выше T2 - делится (адаптировано из Dubreuil et al., 2018).

С другой стороны, Сюань с соавторами показали необходимость запрограммированной гибели крайних клеток БКЧ для формирования боковых корней (Xuan et al., 2016). Моделирование распределения ауксина в модели с применением реалистичного клеточного ансамбля показало формирование максимума ауксина в отмирающих клетках. В случае нарушений активного транспорта ауксина формировании максимума ауксина

в отмирающих клетках в модели не происходило. В эксперименте в мутантных линиях с потерей функции соответствующих белков транспортеров ауксина наблюдались нарушения в формировании боковых корней. В данной модели для учета активного транспорта ауксина распределение белков переносчиков ауксина задавалось на основании экспериментально полученных распределений, и было зафиксировано в модели на всем протяжении расчетов.

1.10. Аналитическое заключение по обзору литературы

Корневой чехлик играет важную роль в развитии корня растения, обеспечивая не только механическую защиту ниши ствольных клеток, но и целый ряд других важных функций воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды (Иванов, 1987). Кроме того, корневой чехлик выполняет также ряд других важных функций, в том числе регулирует направление роста корня при ответе на гравитацию, механические преграды и т.д., принимает участие в регуляции закладки боковых корней, выполняет секреторную функцию, облегчая продвижение корня сквозь почву (Иванов, 1987; Медведев 2004; Driouich et al., 2013; Fendrych et al., 2014; Xuan et al., 2016).

Поддержание ниш ствольных клеток и другие морфогенетические события обусловлены воздействием фитогормона ауксина благодаря его неравномерному распределению в тканях растения и взаимодействию с другими фитогормонами (Liao, 2015; Vieten 2005). Градиенты распределения ауксина в тканях формируются главным образом за счет активного полярного транспорта ауксина белками транспортерами семейства PIN (Swarup et al., 2001; Zažímalová et al., 2010). В то же время, существуют данные о влиянии ауксина на экспрессию белков семейства PIN на разных уровнях (Vieten et al., 2005; Omelyanchuk et al., 2016).

Несовершенство экспериментальных методов измерения распределения ауксина на клеточном уровне, а также наличие сложной сети обратных связей между сигнальным путем ауксина, экспрессией его белков транспортеров и другими фитогормонами требует применения методов математического

моделирования для исследования роли и механизмов воздействия ауксина на различные морфогенетические процессы.

Несмотря на то, что на данный момент разработано множество математических моделей, описывающих формирование распределения ауксина с учетом PIN-зависимого активного транспорта в корне *Arabidopsis thaliana* (Band et al., 2014; Cruz-Ramirez et al., 2012; Grieneisen et al., 2012; Grieneisen et al., 2007; Mahonen et al., 2014; Moore et al., 2015; Tian et al., 2014; van den Berg et al., 2016; Xuan et al., 2016), все эти модели требуют предварительного задания распределения PIN белков, в связи с чем, их трудно применить к моделированию морфогенетических событий, напрямую связанных с изменением динамики экспрессии белков семейства PIN (Goh et al., 2014). Поэтому выгодным отличием серии математических моделей распределения ауксина, разработанных в ИЦиГ СО РАН (Лихошвай и др., 2007; Акбердин и др., 2009; Лихошвай и др., 2009; Mironova et al., 2010; Mironova et al., 2012), является возможность самоорганизации паттернов распределения ауксина совместно с паттернами экспрессии PIN белков, вследствие учета существующих обратных связей между экспрессией белков PIN и сигнальным путем ауксина.

Также стоит отметить, что влияние анатомического строения корневого чехлика и нарушений в его структуре на распределение фитогормона ауксина апикальной меристеме корня *A. thaliana* и поддержание ниши стволовых клеток ранее практически не исследовалось в математических моделях, за исключением двух работ, описанных выше (Xuan et al., 2016, Dubreuil et al., 2018).

Целью данной работы было разработать серию компьютерных математических моделей, описывающих самоорганизацию паттернов распределения ауксина и его белков транспортеров семейства PIN. С помощью вновь разработанных математических моделей предполагалось учитывать анатомические особенности строения корневого чехлика и различные аномалии в его строении, возникающие вследствие воздействия холода и

нарушений в экспрессии гена *WOX5*, который наравне с ауксином является важным регулятором поддержания ниши стволовых клеток в апикальной меристеме корня.

2. Моделирование воздействия пониженных температур на морфологию колумеллы и распределение ауксина в корне *Arabidopsis thaliana* с использованием прямоугольного клеточного ансамбля

2.1. Экспериментальные данные, использованные в работе

2.1.1. Данные об изменении экспрессии репортеров в линиях PIN::GUS, PIN::PIN-GFP, DR5::GFP под действием холода

Моделирование проводилось на основании данных, предоставленных группой зарубежных коллег из Национального Университета в Сингапуре под руководством проф. Чен Ксу. Нам были предоставлены снимки с конфокального микроскопа кончиков корней 4-дневных проростков репортерных линий *A. thaliana* DR5::GFP, PIN1::PIN1-GFP, PIN2::PIN2-GFP, PIN3::PIN3-GFP, PIN4::PIN4-GFP, PIN7::PIN7-GFP, а также статистически обработанные данные об экспрессии репортеров в линиях *A. thaliana* PIN1::GUS, PIN2::GUS, PIN3::GUS, PIN4::GUS, PIN7::GUS, DR5::GFP, PIN1::PIN1-GFP, PIN2::PIN2-GFP, PIN3::PIN3-GFP, PIN4::PIN4-GFP, PIN7::PIN7-GFP при комнатной температуре и после 24 ч воздействия 4°C или 22°C (Рис. 11, Таблица 1). Растения выращивались на вертикально ориентированных чашках Петри на твердой агаризированной ½MS среде при стандартных условиях освещения и влажности. Для оценки уровня экспрессии репортеров в линиях PIN::GUS и PIN::PIN-GFP измерялась интенсивность окрашивания *x-Gluc* или интенсивность флуоресценции в зеленом канале, соответственно. При воздействии 4°C (далее по тексту: воздействие холода) экспрессия репортеров GFP и GUS в линиях PIN1::GUS, PIN3::GUS, PIN4::GUS, PIN7::GUS, DR5::GFP, PIN1::PIN1-GFP, PIN3::PIN3-GFP, PIN4::PIN4-GFP, PIN7::PIN7-GFP уменьшалась, в то время как для репортерных линий PIN2::GUS, PIN2::PIN2-GFP наблюдалось увеличение интенсивности окрашивания или флуоресценции.

Стоит отметить, что изменения интенсивности флуоресценции репортеров в линиях *PIN::PIN-GFP* соответствуют изменению содержания белков семейства PIN в клетке, в то время как изменения интенсивности окрашивания в линиях *PIN::GUS* отражают изменения содержания в клетке матричной РНК генов семейства *PIN*, так как не визуализируются процессы происходящие на посттранскрипционном уровне.

Таблица 1. Экспериментальные данные об активности репортеров в линиях *A. thaliana* *PIN1::GUS*, *PIN2::GUS*, *PIN3::GUS*, *PIN4::GUS*, *PIN7::GUS*, *PIN1::PIN1-GFP*, *PIN2::PIN2-GFP*, *PIN3::PIN3-GFP*, *PIN4::PIN4-GFP*, *PIN7::PIN7-GFP*, *DR5::GFP* после 24 часов при 4°C или при 22°C. В линиях с репортером GUS оценивалась интенсивность окрашивания *x-Gluc*, в линиях с репортеров GFP – интенсивность флуоресценции в зеленом канале.

| Название репортерной линии | Относительный уровень сигнала*, % | | | |
|----------------------------|-----------------------------------|---------------|----------------------|---------------------|
| | Меристема 22°C | Меристема 4°C | Зона растяжения 22°C | Зона растяжения 4°C |
| <i>PIN1::GUS</i> | 100±1,44** | 46,49±3,42 | 25,90±0,94 | 19,08±0,79 |
| <i>PIN2::GUS</i> | 100±21,45 | 189,96±19,29 | 116,74±11,08 | 152,31±12,20 |
| <i>PIN3::GUS</i> | 100±7,39 | 82,33±2,58 | 86,59±2,74 | 78,28±3,40 |
| <i>PIN4::GUS</i> | 100±7,13 | 81,23±5,14 | 59,47±3,48 | 46,30±2,35 |
| <i>PIN7::GUS</i> | 100±5,21 | 76,75±9,44 | 84,52±4,23 | 62,05±5,38 |
| <i>PIN1::PIN1-GFP</i> | 100±9,48 | 75,42±5,72 | 27,80±3,07 | 18,56±2,48 |
| <i>PIN2::PIN2-GFP</i> | 100±6,25 | 125,41±9,38 | 50,64±2,57 | 49,67±4,83 |
| <i>PIN3::PIN3-GFP</i> | 100±4,33 | 65,24±12,04 | 108,69±9,92 | 56,93±4,22 |
| <i>PIN4::PIN4-GFP</i> | 100±7,24 | 29,04±5,28 | 23,48±3,32 | 6,89±1,31 |
| <i>PIN7::PIN7-GFP</i> | 100±11,36 | 56,09±5,28 | 87,22±15,36 | 58,30±5,19 |
| <i>DR5::GFP</i> | 100±7,56 | 73,64±8,12 | - | - |

*за 100% принят средний уровень интенсивности окрашивания/флуоресценции в меристеме корня при 22°C

**Погрешность представлена стандартным отклонением

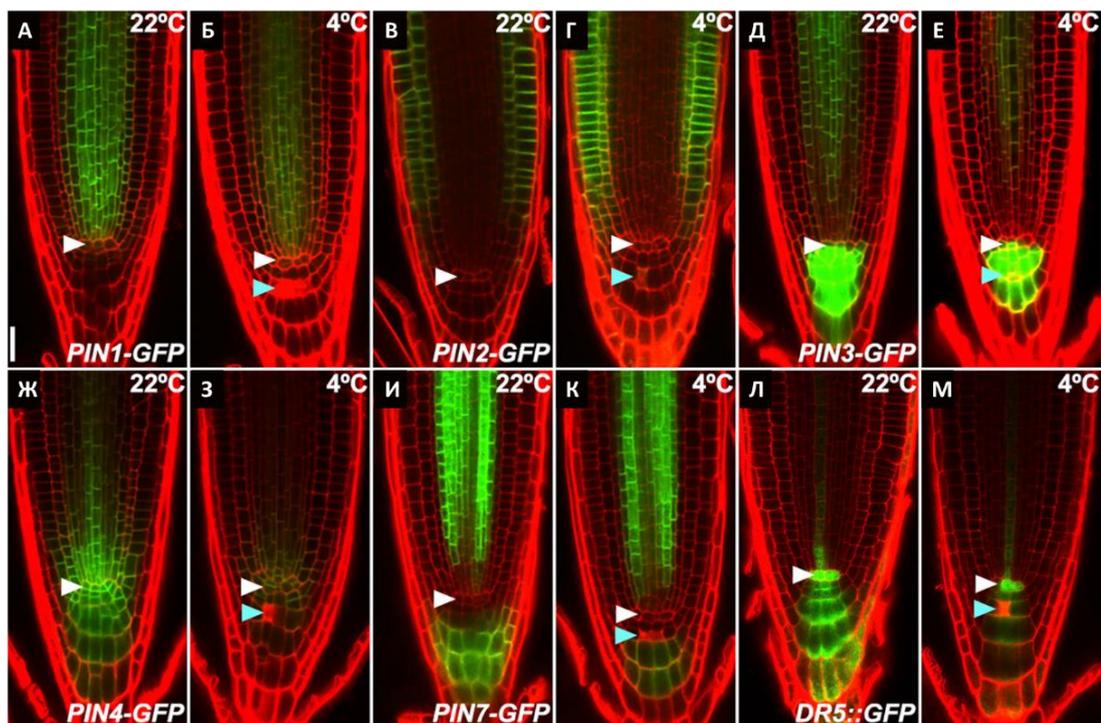


Рис. 11. Экспериментальные данные об активности репортеров в линиях *PIN1::PIN1-GFP*, *PIN2::PIN2-GFP*, *PIN3::PIN3-GFP*, *PIN4::PIN4-GFP*, *PIN7::PIN7-GFP*, *DR5::GFP* в норме (22°C) (А, В, Д, Ж, И, Л) и после длительного (24 часа) воздействия холода (4°C) (Б, Г, Е, З, К, М). Белый треугольник показывает положение ПЦ, голубой треугольник – погибшие ДКИК.

2.1.2. Анатомические изменения в кончике корня под действием холодого стресса

В экспериментах по воздействию холодого стресса (4°C, 12 – 72 часа), проведенных в Национальном Университете в Сингапуре под руководством проф. Чен Ксу, наблюдались индуцированные холодом двуцепочечные разрывы ДНК (подтверждены методом TUNEL) во всей нише стволовых клеток. Несмотря на то, что повреждения ДНК наблюдались во всех инициалах, преимущественно только вновь образованные дочерние клетки инициалей колумеллы (ДКИК) погибали (Рис. 12Б). Гибель клеток определяли по окраске пропидий иодидом (PI, propidium iodide). Уже после 16 часов воздействия холода наблюдалось около 20% корней с индуцированной холодом селективной гибелью ДКИК, а после 24 часов при температуре 4°C количество таких корней превышало 60% (Рис. 12В).

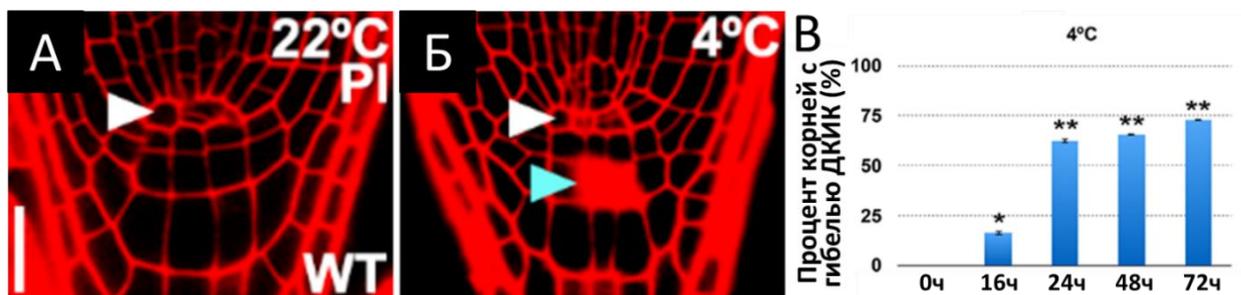


Рис. 12. Анатомические изменения в кончике корня *A. thaliana* дикого типа (Col-0) при воздействии холода. **А.** Структура ниши стволовых клеток корня в норме. Белой стрелкой обозначен ПЦ. **Б.** Структура ниши стволовых клеток корня после воздействия холода. Белой стрелкой обозначен ПЦ, голубой стрелкой обозначены погибшие ДКИК. **В.** Временная зависимость изменения количества корней с индуцированной холодом гибелью ДКИК.

Чтобы разобраться в механизмах возникновения селективной индуцированной холодом гибели ДКИК, а также выяснить какова роль ауксина в этом процессе и спрогнозировать последствия селективной гибели ДКИК было решено использовать методы математического моделирования.

2.2. Описание математической модели корня с прямоугольным клеточным ансамблем

Ранее в нашей группе была разработана математическая модель, учитывающая два механизма формирования максимума ауксина в кончике корня (Mironova et al., 2012): 1) механизм «отраженной волны» для генерации, перемещения или рассеивания максимума ауксина без необходимости предварительного указания расположения PIN белков (Mironova et al., 2010); 2) механизм «обратного фонтана» для стабилизации сгенерированного распределения ауксина (Grieneisen et al., 2007) (см. раздел 1.9.2). Разработанная ранее математическая модели была использована для исследования эффектов воздействия холода на апикальную меристему корня *A. thaliana*.

2.2.1. Клеточный ансамбль математической модели

Математическая модель была модифицирована младшим научным сотрудником ИЦиГ СО РАН Казанцевым Ф.В. для более полного описания

внешних тканей (см. раздел 2.2.1). А именно были добавлены слои: эндодермис и перицикл, которые в ранних моделях не рассматривались (Рис.13А). Итого, прямоугольный клеточный ансамбль, с которым проводилась работа состоит из 25 рядов ($i=1\dots 25$) и 10 столбцов ($j=1\dots 10$) клеток, имитируя структуру кончика корня на медиальном продольном срезе. Столбцы клеточного ансамбля определены следующим образом: эпидермис ($j=1, 10$), кортекс ($j=2, 9$), эндодермис ($j=3, 8$), перицикл ($j=4, 7$) и сосудистая ткань ($j=5, 6$). Все ряды клеток в прямоугольном клеточном ансамбле не отличаются друг от друга, за исключением нижнего ($i=1$), соответствующего последней клетке корневого чехлика, и верхнего ($i=25$), соответствующего проксимальной границе апикальной меристемы корня, где клетки заканчивают делиться и переходят к удлинению.

Клетки модельного корня различаются по набору синтезируемых PIN белков и характеру их поляризации. Поскольку домены экспрессии белков PIN перекрываются в апикальной меристеме корня, в модели описаны три типа согласованных потоков ауксина (Рис.13А):

1) В эндодермисе, перицикле и сосудистой ткани рассматривается обобщенный белок PIN1347, чей паттерн экспрессии, совпадает с паттернами экспрессии локализованных по направлению к кончику корня белков PIN1, PIN3, PIN4 и PIN7 в проксимальной меристеме. В меньшей степени PIN1347 также опосредует боковой поток ауксина;

2) В эпидермисе и кортексе рассматривается паттерн экспрессии белка PIN2, который опосредует потоки ауксина в кортексе по направлению к кончику корня и в эпидермисе по направлению к побегу, а также боковой поток в обоих типах клеток;

3) Во всех тканях клеточного ансамбля экспрессируется обобщенный белок PIN347, локализованный неполярно. Экспрессия PIN347 соответствовала экспрессии PIN3, PIN4 и PIN7 в дистальной меристеме.

Количество клеток вдоль вертикальной оси, экспрессирующих PIN1347, PIN2 и PIN347 не было predetermined заранее. Размер и форма доменов

экспрессии модельных белков определялась распределением ауксина в ходе расчетов модели.

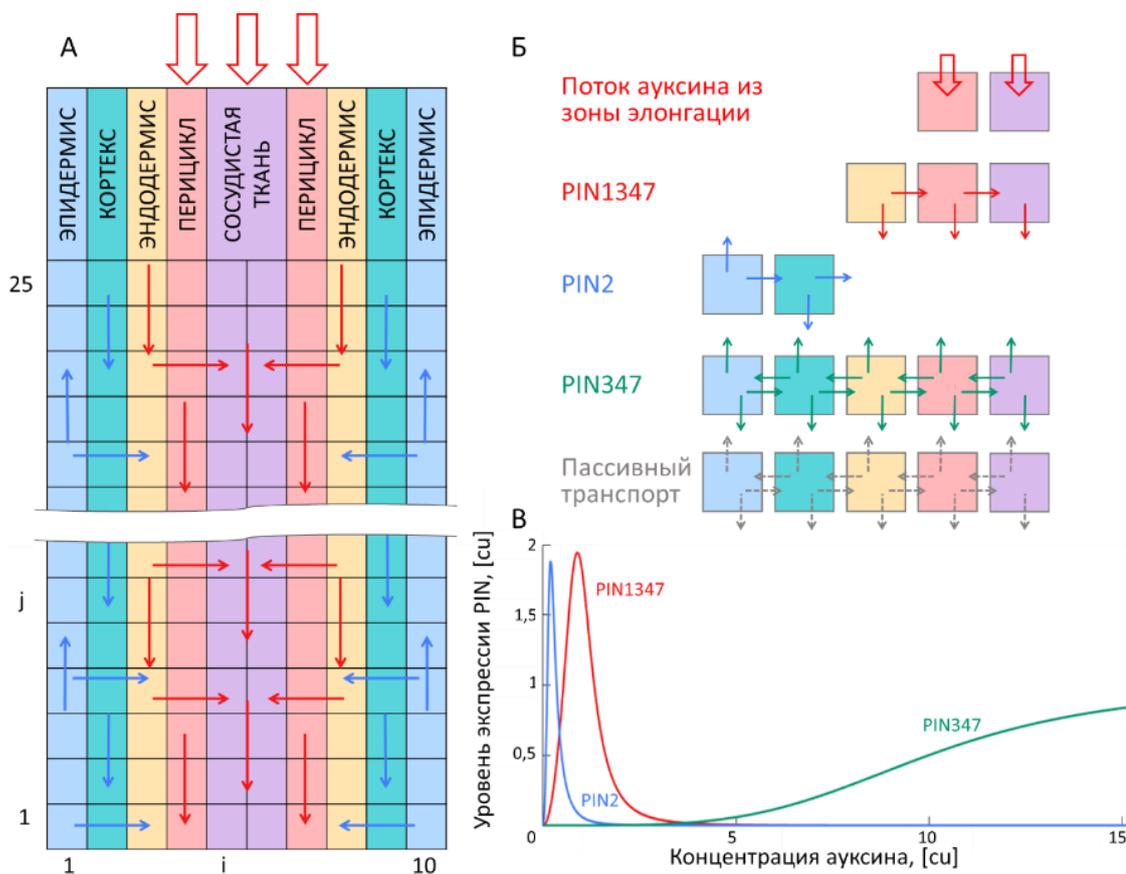


Рис. 13. А. Структура клеточного ансамбля математической модели для исследования воздействия холода. Цветные тонкие стрелки отображают направление потоков ауксина, создаваемых различными PIN транспортерами: красные стрелки соответствуют PIN1347, синие – PIN2, зеленые – PIN347. Поток ауксина из зоны растяжения в клетки 25-ого ряда обозначен красными толстыми стрелками в верхней части рисунка. **Б.** Детальная схема потоков ауксина, учитываемых в модели, включающая пассивный транспорт, поток ауксина из зоны растяжения и активный транспорт ауксина посредством PIN белков. Потоки показаны только для левой половины клеточного ансамбля. **В.** График концентрационно-зависимой экспрессии PIN белков в модели относительно уровня ауксина в клетке. Для белка PIN1347 представленный график соответствует 1/3 уровня экспрессии.

2.2.2. Элементарные процессы, описанные в модели

Как и в предыдущей модели (Mironova et al., 2012), учитывались следующие процессы: синтез ауксина, деградацию, пассивный транспорт и PIN-опосредованный активный транспорт ауксина. Хотя клетки кончика корня способны синтезировать ауксин, большая часть ауксина поступает из

побега через зону удлинения корня в клетки сосудистой ткани и перицикла ($i = 25; j = 4 \dots 7$).

Диффузия ауксина в апопласте не учитывалась в модели; вместо этого ауксин в модели перемещался непосредственно от клетки к ее соседям посредством пассивного и активного транспорта. Было принято допущение о мгновенном перемешивании ауксина внутри клетки, то есть концентрация ауксина была одинаковой во всех частях клетки. Согласованное действие активного транспорта ауксина посредством PIN белков описано в модели через PIN1347, PIN2 и PIN347 (Рис. 13Б). Полярная локализация PIN белков в модели не менялась во время расчета, однако уровни экспрессии изменялись под действием холода. Чтобы воспроизвести домены экспрессии PIN белков в модели, была описана зависимость экспрессии каждого PIN в клетке с соответствующей концентрацией ауксина. А именно, клетки с низким уровнем ауксина экспрессируют PIN2, имеют, клетки с высоким уровнем ауксина экспрессируют PIN347, а клетки с промежуточным уровнем ауксина экспрессируют PIN1347 (Рис. 13В). Основа для такого предположения была установлена ранее (Vieten et al., 2005; Mironova et al., 2010; Omelyanchuk et al., 2016).

2.2.3. Уравнения математической модели

Математическая модель представляет систему дифференциальных уравнений (1) для концентраций каждого вещества $[a]_{i,j}$, $[PIN1347]_{i,j}$, $[PIN2]_{i,j}$, $[PIN347]_{i,j}$ (ауксин, PIN1347, PIN2 и PIN347) в каждой клетке клеточного ансамбля (380 переменных). В силу зеркальной симметрии клеточного ансамбля, расчеты производились только для половины клеточного ансамбля.

$$\begin{cases} \frac{d[PIN1347]_{i,j}}{dt} = F_{s,PIN1347}([a]_{i,j}) - F_{d,PIN1347} \times ([a]_{i,j})[PIN1347]_{i,j}, j = 3,4,5 \\ \frac{d[PIN2]_{i,j}}{dt} = F_{s,PIN2}([a]_{i,j}) - F_{d,PIN2}([a]_{i,j}) \times [PIN2]_{i,j}, j = 1,2 \\ \frac{d[PIN347]_{i,j}}{dt} = F_{s,PIN347}([a]_{i,j}) - F_{d,PIN347} \times [PIN347]_{i,j} \\ \frac{d[a]_{i,j}}{dt} = k_{\alpha}(i,j) + K_{s,a} - K_{d,a}[a]_{i,j} + D \times \sum_{m \in N_{i,j}} ([a]_m - [a]_{i,j}) + \sum_{x \in P} J_x(i) \end{cases}, \quad (14)$$

где $k_\alpha(i, j)$ описывает поток ауксина из зоны растяжения; $K_{s,a}$ – константа скорости синтеза ауксина в клетке *de novo*; $K_{d,a}$ – константа скорости деградации ауксина; D – константа скорости пассивного транспорта; $N_{i,j}$ – множество соседних клеток для клетки (i, j) ; $J_x(i, j)$ – потоки ауксина, регулируемые транспортерами x , где $x = PIN1347, PIN2, PIN347$; $F_{s,x}$ – скорость ауксин-зависимого синтеза PIN белков; $F_{d,x}$ – скорость деградации PIN белков.

Ауксин-зависимый синтез (2) PIN белков описан в терминах обобщенных функций Хилла (см. раздел 1.8.2).

$$F_{s,x}([a]_{i,j}) = K_{s,x} \frac{\left(\frac{[a]_{i,j}}{q_{1,x}}\right)^{s_x}}{1 + \left(\frac{[a]_{i,j}}{q_{2,x}}\right)^{s_x}}, \quad x = PIN1347, PIN2, PIN347, \quad (15)$$

где $K_{s,x}$ описывает константу скорости синтеза для белка $x = PIN1347, PIN2, PIN347$; $q_{1,x}$ – порог активации ауксин-зависимого синтеза белка x ; $q_{2,x}$ – порог насыщения ауксин-зависимого синтеза белка x ; s_x – коэффициент Хилла, который определяет степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина $[a]_{i,j}$ на скорость синтеза белка x .

Ауксин-зависимая деградация (3) PIN белков описана полиномиальными функциями для PIN1347 и PIN2 и линейной функцией для PIN347.

$$F_{d,x}([a]_{i,j}) = \begin{cases} K_{d,x} \left(1 + \left(\frac{[a]_{i,j}}{q_{3,x}}\right)^{h_x}\right), & x = PIN1347, PIN2 \\ K_{d,x}, & x = PIN347 \end{cases}, \quad (16)$$

где $K_{d,x}$ – константа скорости деградации белка $x = PIN1347, PIN2, PIN347$; $q_{3,x}$ – порог активации ауксин-зависимой деградации белка x ; h_x – коэффициент, который определяет нелинейность ауксин-зависимого ингибирования белка x .

Полярность PIN белков на цитоплазматической мембране клеток была задана следующим образом: PIN1347 обеспечивает боковой транспорт ауксина и транспорт в направлении к кончику корня; PIN2 обеспечивает боковой транспорт ауксина и транспорт в направлении к побегу в эпидермисе и в направлении к кончику корня в кортексе; PIN347 распределен равномерно

на всех сторонах клетки (Рис. 13В). Потoki активного транспорта ауксина с помощью белков PIN были описаны уравнениями (17-24).

Суммарный активный транспорт ауксина белком PIN1347 из клетки с номером (i, j) ($J_{PIN1347}(i, j)$) состоит из бокового, направленного к центральной оси корня ($J_{lat}^{PIN1347}(i, j)$) и направленного к кончику корня ($J_{bas}^{PIN1347}(i, j)$) потоков:

$$J_{PIN1347}(i, j) = J_{bas}^{PIN1347}(i, j) + J_{lat}^{PIN1347}(i, j), \quad (17)$$

$$J_{bas}^{PIN1347}(i, j) = \begin{cases} K_{0,bas,PIN1347}([PIN1347]_{i+1,j}[a]_{i+1,j} - [PIN1347]_{i,j}[a]_{i,j}), & 1 < i < 25 \text{ and } j = 3,4,5 \\ K_{0,bas,PIN1347}[PIN1347]_{i+1,j}[a]_{i+1,j}, & i = 1 \text{ and } j = 3,4,5 \\ -K_{0,bas,PIN1347}[PIN1347]_{i,j}[a]_{i,j}, & i = 25 \text{ and } j = 3,4,5 \end{cases}, \quad (18)$$

$$J_{lat}^{PIN1347}(i, j) = \begin{cases} -K_{0,lat,PIN1347}[PIN1347]_{i,j}[a]_{i,j}, & j = 3 \\ K_{0,lat,PIN1347}([PIN1347]_{i,j-1}[a]_{i,j-1} - [PIN1347]_{i,j}[a]_{i,j}), & j = 4, \\ K_{0,lat,PIN1347}[PIN1347]_{i,j-1}[a]_{i,j-1}, & j = 5 \end{cases}, \quad (19)$$

где $K_{0,bas,PIN1347}$ – константа активного транспорта в направлении к кончику корня, $K_{0,lat,PIN1347}$ – константа активного транспорта в боковом направлении, причем $K_{0,bas,PIN1347} + K_{0,lat,PIN1347} = 1$.

Активный транспорт ауксина белком PIN2 ($J_{PIN2}(i, j)$) состоит из бокового ($J_{lat}^{PIN2}(i, j)$), апикального ($J_{apic}^{PIN2}(i, j)$), направленного к побегу, и базального ($J_{bas}^{PIN2}(i, j)$), направленного к кончику корня потоков:

$$J_{PIN2}(i, j) = J_{bas}^{PIN2}(i, j) + J_{apic}^{PIN2}(i, j) + J_{lat}^{PIN2}(i, j), \quad (20)$$

$$J_{apic}^{PIN2}(i, j) = \begin{cases} K_{0,apic,PIN2}([PIN2]_{i-1,j}[a]_{i-1,j} - [PIN2]_{i,j}[a]_{i,j}), & 1 < i \leq 25 \text{ and } j = 1 \\ -K_{0,apic,PIN2}[PIN2]_{i,j}[a]_{i,j}, & i = 1 \text{ and } j = 1 \end{cases}, \quad (21)$$

$$J_{bas}^{PIN2}(i, j) = \begin{cases} K_{0,bas,PIN2}([PIN2]_{i+1,j}[a]_{i+1,j} - [PIN2]_{i,j}[a]_{i,j}), & 1 < i < 25 \text{ and } j = 2 \\ K_{0,bas,PIN2}[PIN2]_{i+1,j}[a]_{i+1,j}, & i = 1 \text{ and } j = 2 \\ -K_{0,bas,PIN2}[PIN2]_{i,j}[a]_{i,j}, & i = 25 \text{ and } j = 2 \end{cases}, \quad (22)$$

$$J_{lat}^{PIN2}(i, j) = \begin{cases} -K_{0,lat,PIN2}[PIN2]_{i,j}[a]_{i,j}, & j = 1 \\ K_{0,lat,PIN2}([PIN2]_{i,j-1}[a]_{i,j-1} - [PIN2]_{i,j}[a]_{i,j}), & j = 2, \\ K_{0,lat,PIN2}[PIN2]_{i,j-1}[a]_{i,j-1}, & j = 3 \end{cases}, \quad (23)$$

где $K_{0,apic,PIN2}$ – константа активного транспорта в направлении к побегу, $K_{0,bas,PIN2}$ – константа активного транспорта в направлении к кончику корня,

$K_{0,lat,PIN2}$ – константа активного транспорта в боковом направлении, причем $K_{0,apic,PIN2} + K_{0,lat,PIN2} = K_{0,bas,PIN2} + K_{0,lat,PIN2} = 1$.

Поскольку белок PIN347 расположен на мембране клетки не полярно (т.е. на всех сторонах клетки), то уравнение для активного транспорта ауксина белком PIN347 ($J_{PIN347}(i, j)$) выглядит следующим образом:

$$J_{PIN347}(i, j) = K_{0,PIN347} \left(\sum_{m \in N_{i,j}} \left(\frac{1}{|N_m|} [PIN347]_m [a]_m \right) - [PIN347]_{i,j} [a]_{i,j} \right). \quad (24)$$

В модели 25 ряд клеток описан как «открытый», то есть ауксин из системы выводится за счет активного и пассивного транспорта. Поток ауксина из зоны растяжения ($k_\alpha(i, j)$) в клетки перицикла и сосудистой ткани ($i=25, j=4, 5$) был описан следующим образом:

$$k_\alpha(i, j) = \begin{cases} \alpha, & i = 25, j = 4, 5 \\ 0, & i \neq 25, j \neq 4, 5 \end{cases} \quad (25)$$

Расчеты математической модели проводились в программе MATLAB при помощи функции численного решения дифференциальных уравнений *ode15s*, использующего метод конечных разностей переменного порядка в сочетании со схемой обратного дифференцирования (метод Гира).

2.2.4. Моделирование действия холода на распределение ауксина

Для расчета контрольного варианта в модели были использованы параметры из работы Мироновой и соавторов (Mironova et al., 2012) (Таблица 2). В качестве начальных данных для расчета было взято равномерное распределение ауксина в клеточном ансамбле ($[a]_{i,j}=0,1$, для всех i, j).

В соответствии с экспериментальными данными (Таблица 1), холодовой стресс влияет на экспрессию PIN белков в кончике корня: происходит индукция экспрессии PIN2 и ингибирование экспрессии всех остальных белков (PIN1, PIN3, PIN4 и PIN7). Поскольку изменения экспрессии репортеров в линиях $PIN::PIN-GFP$ и $PIN::GUS$ были согласованными между собой, мы предположили, что холодовой стресс действует на экспрессию белков PIN преимущественно на транскрипционном уровне. Соответственно, в рамках данной диссертационной работы были модифицированы константы

синтеза PIN белков для моделирования воздействия холода с помощью дополнительных множителей, $k_{PIN1347}^{cold}$, k_{PIN2}^{cold} , k_{PIN347}^{cold} :

$$K'_{s,PIN1347} = K_{s,PIN1347} \times k_{PIN1347}^{cold}, \quad (26)$$

$$K'_{s,PIN2} = K_{s,PIN2} \times k_{PIN2}^{cold}, \quad (27)$$

$$K'_{s,PIN347} = K_{s,PIN347} \times k_{PIN347}^{cold}. \quad (28)$$

Поскольку, изменения в экспрессии репортерных линий $PIN::GUS$, вызванные воздействием холода, оказались значимы не только в меристематической зоне, но и в зоне растяжения, также была модифицирована интенсивность потока ауксина из зоны растяжения:

$$k'_{\alpha} = k_{\alpha} \times k_{\alpha}^{cold}. \quad (29)$$

Параметры $k_{PIN1347}^{cold}$, k_{PIN2}^{cold} , k_{PIN347}^{cold} , были оценены на основании экспериментальных данных по экспрессии репортеров в линиях $PIN::GUS$ в меристематической зоне, как отношение интенсивности окрашивания при обработке холодом и в контроле. Параметр k_{α}^{cold} оценивался аналогично на основании данных об экспрессии репортеров в линиях $PIN::GUS$ в зоне растяжения корня (Табл. 1).

2.2.5. Моделирование деления ИК и гибели ДКИК

Во время клеточного цикла объем ИК удваивается, а затем делится между дочерними клетками. Моделирование деления ИК (клетка (4,5)) в модели с фиксированным количеством клеток (Рис. 14А) было проведено через модификацию начальных данных модели. Так, на первом этапе нами было получено стационарное решение модели, в котором мы перед новым запуском модели изменили распределение ауксина и PIN белков в пятом столбце следующим образом:

$$\begin{cases} [\bar{x}]_{i,5} = [x]_{i,5}, & i = 1,2,3 \\ [\bar{x}]_{i,5} = \frac{[x]_{4,5}}{2}, & i = 4,5 \\ [\bar{x}]_{i,5} = [x]_{i-1,5}, & i = 6, \dots, 25 \end{cases}, \quad (30)$$

где $[\bar{x}]_{i,5}$ – концентрация вещества x после модификации, $[x]_{i,5}$ – концентрация в стационарном решении до модификации, $x \in \{a, PIN1347, PIN2, PIN347\}$.

Эта модификация была обозначена как «событие деления». После «события деления» расчет модели возобновлялся и продолжался до тех пор, пока не достигнет нового стационарного решения. Данная процедура была проведена для контроля (Таблица 2) и воздействия холода (Таблица 3) (см. раздел 2.2.3.).

Затем мы изучили влияние гибели ДКИК на распределение ауксина в кончике корня. Событие гибели ДКИК, обозначенное на рис. 14Б как «гибель клеток», было реализовано путем изменения клеточного ансамбля и системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ). Мы удалили клетки (4,4) и (4,5) из клеточного ансамбля; и модифицировали уравнения для соседних клеток, удалив все потоки пассивного и активного (с помощью PIN белков) транспорта ауксина как входящие в клетки (4,4) и (4,5), так и исходящие из них. Расчет математической модели запускался со значений концентраций ауксина и белков PIN в каждой клетке, соответствующих распределениям, полученным на этапе деления клеток в условиях воздействия холода, до достижения нового стационарного решения. (Рис. 14Б).

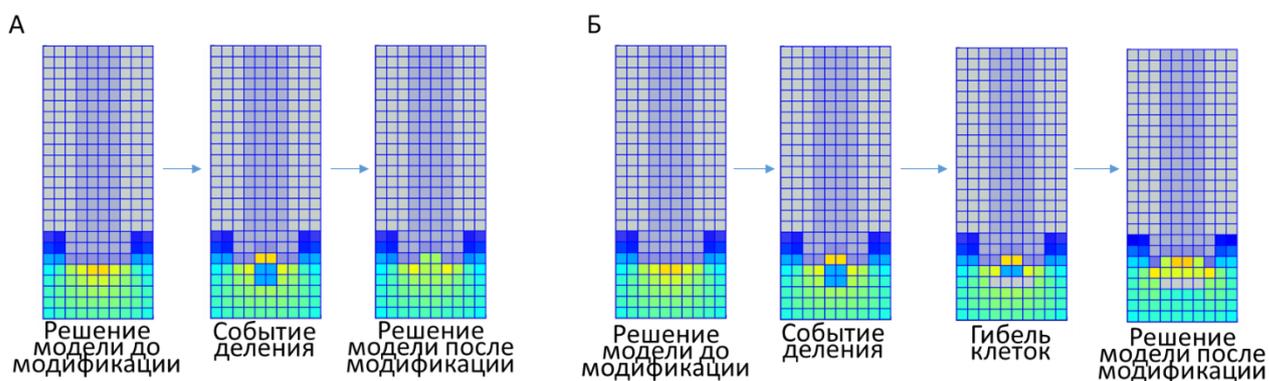


Рис. 14. Этапы модификации клеточного ансамбля для моделирования деления ИК (А) и гибели ДКИК после деления ИК (Б) на примере распределения ауксина.

2.3. Подбор параметров модели для описания действия холода на распределение ауксина

С помощью методов математического моделирования было проанализировано длительное воздействие холода на апикальную меристему корня *A. thaliana*. Было проведено варьирование значений дополнительных параметров, описывающих воздействие холода на скорость синтеза PIN белков, $k_{PIN1347}^{cold}$, k_{PIN2}^{cold} , k_{PIN347}^{cold} , (см. главу 2.2.4.) в экспериментально-наблюдаемых пределах (см. ниже), а также анализ полученных *in silico* распределений ауксина. В результате проведенного анализа было показано, что изменения скорости синтеза белков семейства PIN в меристематической зоне в экспериментально-наблюдаемых пределах (см. ниже) было недостаточно для воспроизведения в модели экспериментальных данных о снижении активности репортерной конструкции *DR5::GFP* (концентрации ауксина в модели). Было показано, что достаточный уровень снижения концентрации ауксина в модели возможен только при одновременном изменении скорости синтеза PIN белков (за что отвечают параметры: $k_{PIN1347}^{cold}$, k_{PIN2}^{cold} , k_{PIN347}^{cold}) и уменьшении потока ауксина из зоны растяжения (k_{α}).

В итоге, для оптимизации параметров модели, описывающих воздействие холода на распределение ауксина, были использованы два критерия:

1. Значения параметров в уравнениях (26-29) должны находиться в пределах интервалов экспериментально наблюдаемых изменений экспрессии *PIN::GUS* в апикальной меристеме корня (Рис. 15). А именно, мы варьировали параметр $k_{PIN1347}^{cold}$ в пределах 0,43-0,86 (Рис. 15А), где 0,86 была верхняя граница изменения экспрессии, наблюдаемого для PIN4 и 0,43 – нижняя граница, наблюдаемая для PIN1 (Таблица 1). Аналогично, параметр k_{PIN347}^{cold} варьировали от 0,67 до 0,86 (Рис.15В), по верхней границе изменения экспрессии для PIN4 и нижней границе для PIN7. k_{PIN2}^{cold} варьировали от 1,70 до 2,08 (Рис.15Б), в соответствии с изменениями в экспрессии для PIN2. Мы также проанализировали экспрессию PIN1, PIN3, PIN4 и PIN7 в зоне растяжения в контроле и после обработки холодом. На основании этих

данных, по аналогии с параметрами $k_{PIN1347}^{cold}$ и k_{PIN347}^{cold} , были определены пределы варьирования параметра k_{α}^{cold} , которые составили 0,67-0,94 (Рис. 15Г).

2. Разница между паттернами экспрессии PIN1347, PIN2, PIN347 и распределением ауксина в модели и экспериментально наблюдаемыми изменениями в экспрессии *PIN::PIN-GFP* и *DR5::GFP* (Рис. 16) должна быть минимальной.

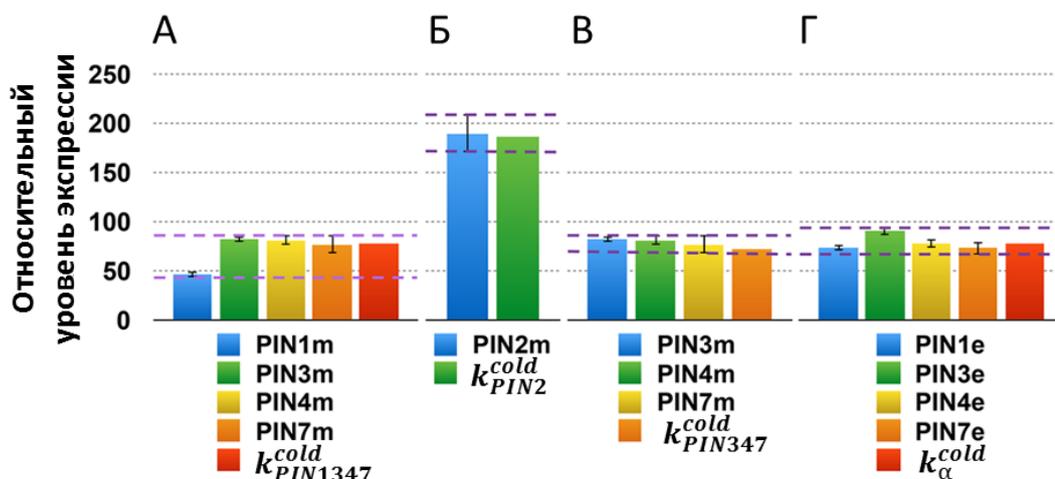


Рис. 15. Оптимизация параметров модели для симуляции воздействия холода на скорость синтеза PIN белков. **А-В.** относительная интенсивность окраски репортерных конструкций *PIN::GUS* в апикальной меристеме корня использовалась для оценки параметров $k_{PIN1347}^{cold}$, k_{PIN2}^{cold} , k_{PIN347}^{cold} . **Г.** Относительная интенсивность окраски репортерных конструкций *PIN::GUS* в зоне растяжения, на основании которых определялось значение параметра k_{α}^{cold} . Экспериментальные данные по изменению экспрессии *PIN::GUS* для белков PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 и подобранные значения параметров модели (последний столбец в каждой группе) представлены как процентное соотношение по сравнению с контролем. **m** – меристема. **e** – зона растяжения. Шкалы ошибок для экспериментальных данных представляют собой стандартное отклонение. Пунктирные линии на графиках указывают интервалы варьирования параметров: $k_{PIN1347}^{cold}$, k_{PIN2}^{cold} , k_{PIN347}^{cold} , k_{α}^{cold} .

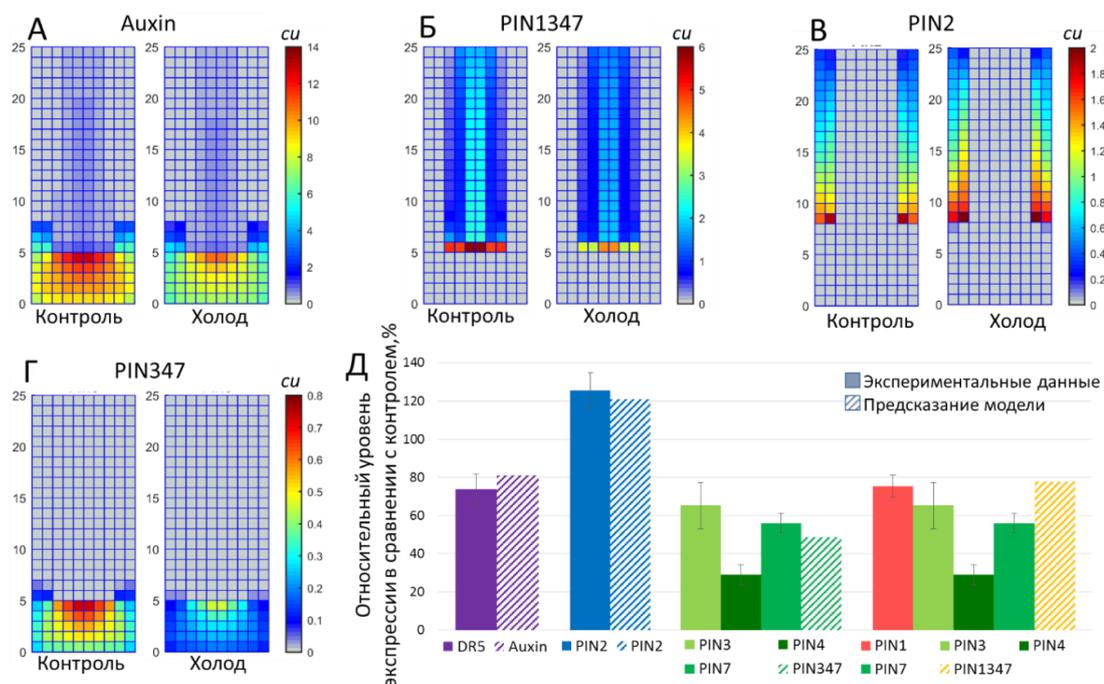


Рис. 16. Расчет воздействия холода на распределение ауксина в кончике корня *A. thaliana*. А-Г. Стационарное решение модели для контроля (слева) и холодового стресса (справа). Распределение ауксина (А) формируется за счет активного транспорта ауксина с участием белков PIN1347 (Б), PIN2 (В), PIN347 (Г). Д. Сравнение относительного (холодовой стресс/контроль) уровня светимости белка GFP (закрашенные колонки) в репортерных линиях *DR5::GFP* (Е), *PIN2::PIN2-GFP* (F), *PIN1::PIN1-GFP*, *PIN3::PIN3-GFP*, *PIN4::PIN4-GFP* и *PIN7::PIN7-GFP* (G-H) в кончике корня и относительного (холодовой стресс/контроль) *in silico* уровня (заштрихованные колонки) ауксина, PIN2, PIN347 and PIN1347. Шкалы ошибок для относительных уровней GFP представлены стандартным отклонением.

Подбор оптимальных наборов значений параметров выполнен путем полного перебора области варьирования параметров с шагом 0,001. В каждом случае запускался расчет до достижения стационарного решения. В каждом полученном решении вычислялось среднее арифметическое значений переменных $[a]_{i,j}$, $[PIN1347]_{i,j}$, $[PIN2]_{i,j}$ и $[PIN347]_{i,j}$ для контроля и холодового стресса и бралось отношение. Данные отношения сравнивались с полученным экспериментально отношением средней светимости белка GFP в образцах, подвергнутых воздействию холода, в сравнении со средней светимостью белка GFP в контрольных образцах соответствующих линий (Таблица 1). Соответственно, для моделирования холодового стресса были подобраны

значения параметров, дающие наилучшее соответствие экспериментальным данным (Таблица 3; Рис.15, 16).

Таблица 2. Значения параметров, использованные в модели с прямоугольным клеточным ансамблем для расчета контроля (до холодового стресса). *cu* – концентрационные единицы, *tu* – единицы времени, *dl* – безразмерный параметр.

| Название параметра | Символ | Единицы измерения | Значение |
|--|---------------------|-------------------|----------|
| Интенсивность поток ауксина из зоны растяжения | k_a | cu/tu | 0,65 |
| Константа скорости деградации белка PIN1347 | $K_{d,PIN1347}$ | $1/tu$ | 1000 |
| Константа скорости деградации белка PIN2 | $K_{d,PIN2}$ | $1/tu$ | 1000 |
| Константа скорости деградации белка PIN347 | $K_{d,PIN347}$ | $1/tu$ | 1000 |
| Константа скорости деградации ауксина | $K_{d,a}$ | $1/tu$ | 0,005 |
| Константа скорости синтеза белка PIN1347 | $K_{s,PIN1347}$ | cu/tu | 1000 |
| Константа скорости синтеза белка PIN2 | $K_{s,PIN2}$ | cu/tu | 1000 |
| Константа скорости синтеза белка PIN347 | $K_{s,PIN347}$ | cu/tu | 1000 |
| Константа скорости синтеза ауксина | $K_{s,a}$ | cu/tu | 0,002 |
| Константа активного транспорта в боковом направлении для белка PIN1347 | $K_{0,lat,PIN1347}$ | dl | 0,1 |
| Константа активного транспорта в боковом направлении для белка PIN2 | $K_{0,lat,PIN2}$ | dl | 0,15 |
| Константа активного транспорта в направлении к кончику корня для белка PIN1347 | $K_{0,bas,PIN1347}$ | dl | 0,9 |
| Константа активного транспорта в направлении к кончику корня для белка PIN2 | $K_{0,bas,PIN2}$ | dl | 0,85 |
| Константа активного транспорта в направлении к побегу для белка PIN2 | $K_{0,apic,PIN2}$ | dl | 0,85 |
| Константа активного транспорта для белка PIN347 | $K_{0,PIN347}$ | dl | 1 |
| Константа скорости пассивного транспорта ауксина | D | $1/tu$ | 0,08 |
| Порог активации ауксин-зависимого синтеза белка PIN1347 | $q_{1,PIN1347}$ | $1/cu$ | 0,3 |
| Порог насыщения ауксин-зависимого синтеза белка PIN1347 | $q_{2,PIN1347}$ | $1/cu$ | 10 |
| Порог активации ауксин-зависимой деградации белка PIN1347 | $q_{3,PIN1347}$ | $1/cu$ | 1 |
| Коэффициент Хилла, определяющий степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина на скорость синтеза белка PIN1347 | $s_{PIN1347}$ | dl | 2 |
| Коэффициент, который определяет нелинейность ауксин-зависимого ингибирования белка PIN1347 | $h_{PIN1347}$ | dl | 6 |
| Параметры ауксин-зависимых синтеза и деградации белка PIN2 | $q_{1,PIN2}$ | $1/cu$ | 0,1 |
| | $q_{2,PIN2}$ | $1/cu$ | 0,8 |
| | $q_{3,PIN2}$ | $1/cu$ | 0,2 |
| | s_{PIN2} | dl | 2 |
| | h_{PIN2} | dl | 4 |
| Параметры ауксин-зависимого синтеза белка PIN347 | $q_{1,PIN347}$ | $1/cu$ | 10 |
| | $q_{2,PIN347}$ | $1/cu$ | 10 |
| | s_{PIN347} | dl | 4 |

Таблица 3. Значения дополнительных параметров, использованных в модели для расчета воздействия холодового стресса на распределение ауксина в кончике корня. dl – безразмерный параметр.

| Название параметра | Символ | Единицы измерения | Значение |
|--|------------------------|-------------------|----------|
| Параметр воздействия холодового стресса на экспрессию белка PIN1347 | $k_{S,PIN1347}^{cold}$ | dl | 0,78 |
| Параметр воздействия холодового стресса на экспрессию белка PIN2 | $k_{S,PIN2}^{cold}$ | dl | 1,86 |
| Параметр воздействия холодового стресса на экспрессию белка PIN347 | $k_{S,PIN347}^{cold}$ | dl | 0,72 |
| Параметр воздействия холодового стресса на интенсивность потока ауксина из зоны растяжения | k_{α}^{cold} | dl | 0,785 |

Подробное исследование поведения математической модели распределения ауксина с прямоугольным клеточным ансамблем при варьировании по параметрам, а также методом продолжения по параметру, уже было проведено ранее в Институте Цитологии и Генетики в рамках работы Мироновой и соавторов (Mironova et al., 2012), поэтому в рамках данного диссертационного исследования подобный анализ не проводился.

2.4. Результаты моделирования распределения ауксина после гибели ДКИК

Следующий этап включал моделирование индуцированного холодом деления инициалей колумеллы (ИК) и гибели одной из дочерних клеток (ДКИК), наблюдаемых в эксперименте. В результате проведенного *in silico* эксперимента было показано, что максимальная концентрация ауксина в контроле сохраняется после деления в той же самой клетке. Этот результат указывает на то, что идентичность ПЦ сохраняется, несмотря на временное нарушение распределения ауксина, вызванное делением ИК (Рис. 17А-В). Напротив, деление ИК под действием холода приводит к потере максимума концентрации ауксина в ПЦ и его перемещению в ИК в модели (Рис. 17Г-Е,З). Этот результат свидетельствует о том, что при холодовом стрессе ПЦ может потерять свою идентичность и начать делиться, в результате, сохранение ниши стволовых клеток находится под угрозой. После гибели ДКИК

максимум концентрации ауксина в ПЦ восстанавливался (Рис. 17Ж,З). При этом расчетная концентрация ауксина в ПЦ после гибели клеток ДКИК была выше, чем в контрольных корнях после деления (Рис. 17З, вставка диаграммы), что может свидетельствовать о дополнительных адаптивных преимуществах растений, в корнях которых наблюдалась селективная клеточная гибель, по сравнению с контрольными растениями и растениями, подвергшимися воздействию холода, но в корнях, которых гибели ДКИК не происходило.

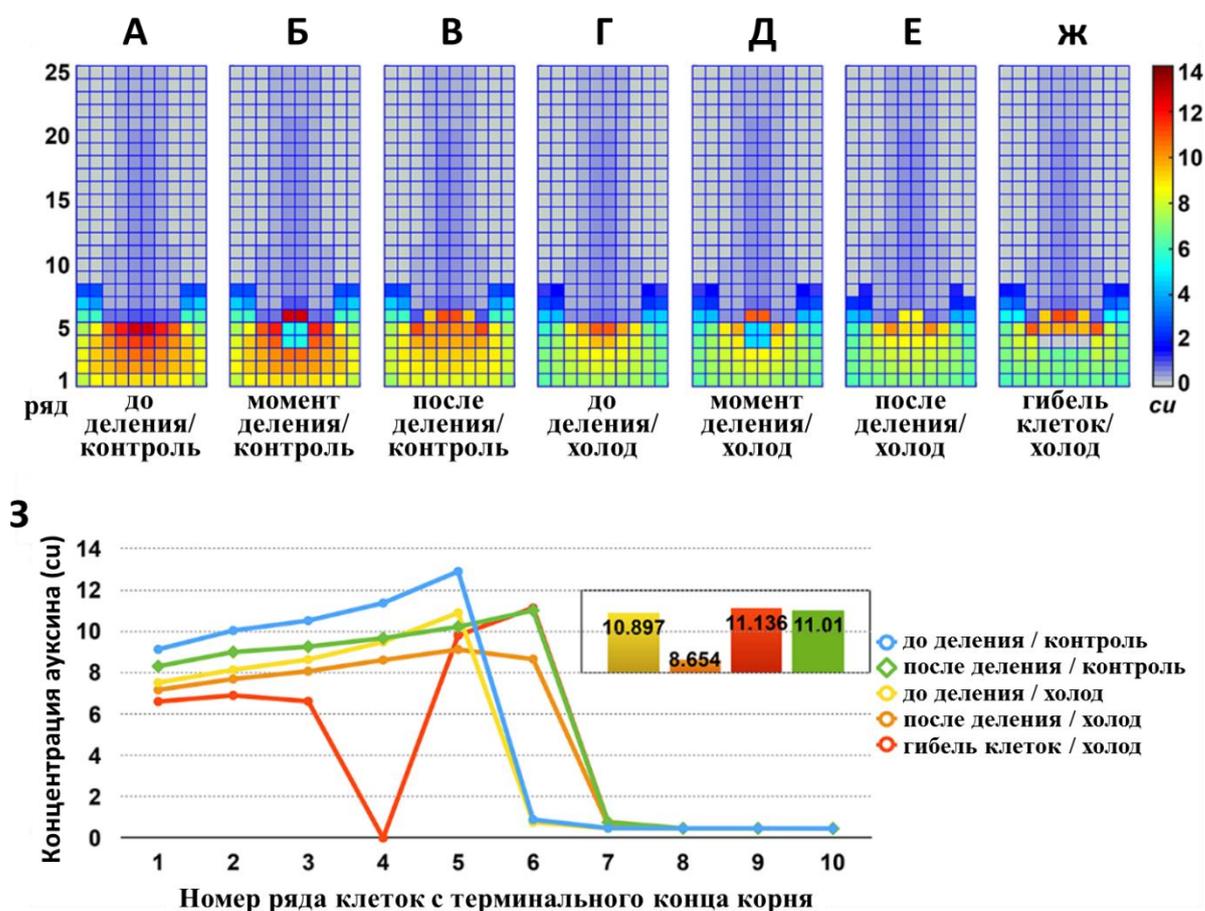


Рис.17. Воздействие деления ИК и гибели ДКИК на распределение ауксина в кончике корня. Слева на право: Распределение ауксина в корне в контроле до деления ИК (А), в момент деления (Б) и после деления (В), распределение ауксина в корне после воздействия холода до деления ИК (Г), в момент деления (Д), после деления ИК (Е) и после гибели клеток ДКИК (Ж). 2 центральные клетки в 5 ряду представляют ПЦ, а 4 клетки в 3 ряду представляют ДКИК до деления ИК. После деления 6 ряд представляет ПЦ, а 4 ряд представляет ДКИК. 3. Концентрация ауксина в первых 10 клетках

центрального слоя модельного корня. Значения взяты для стационарных решений для контроля до и после деления ИК, для холодного стресса до и после деления ИК и после гибели ДКИК. На диаграмме представлены значения модельных концентраций ауксина в ПЦ.

2.5. Экспериментальная верификация предсказаний модели

Предсказание 1. Поток ауксина из зоны растяжения при воздействии холода уменьшается.

В результате проведенного варьирования параметров, $k_{PIN1347}^{cold}$, k_{PIN2}^{cold} , k_{PIN347}^{cold} , описывающих воздействие холода на скорость синтеза PIN белков было предсказано снижение потока ауксина из зоны растяжения в кончик корня. Данное предсказание было подтверждено экспериментально группой ученых под руководством профессора Чен Ксу. Экспрессия репортеров в линиях $PIN::GUS$ и $PIN::PIN-GFP$ для всех белков (PIN1, PIN3, PIN4, PIN7), экспрессирующихся в сосудистом цилиндре в зоне растяжения корня оказалась снижена по сравнению с контролем (Таблица 1). Поскольку клетки в данной области имеют строгую полярность активного транспорта по направлению к кончику корня, обнаруженные изменения в экспрессии белков PIN1, PIN3, PIN4, PIN7, соответствуют снижению потока ауксина из зоны растяжения в модели.

Предсказание 2. Гибель ДКИК приводит к увеличению концентрации ауксина в нише стволовых клеток, защищая нишу стволовых клеток корня *A. thaliana* от губительного воздействия холода.

В эксперименте, проведенном группой Чен Ксу, наблюдалось значимое повышение частоты делений и количества событий клеточной гибели в нише стволовых клеток после холодного стресса в тех корнях, где не наблюдалось гибели ДКИК, по сравнению с корнями, где событие клеточной смерти ДКИК имело место (Рис. 18) (Hong et al., 2017). Экспрессия гена сенсора в репортерной линии $WOX5::GFP$, основного маркера ПЦ, при длительном

воздействии холода была существенно выше в корнях, для которых наблюдалась гибель ДКИК, по сравнению с корнями, в которых данное событие не наблюдалось.

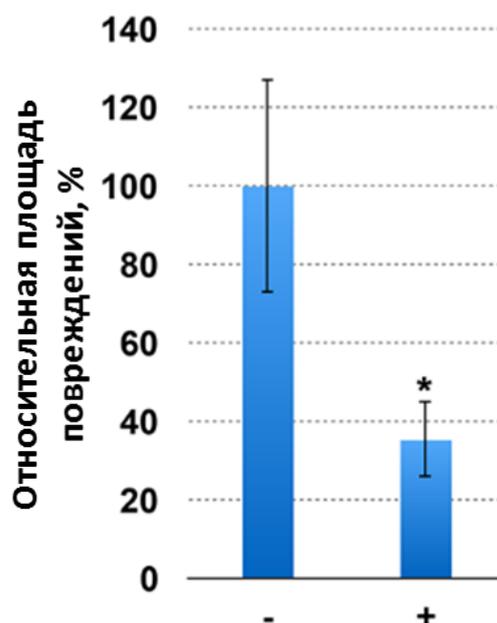


Рис. 18. Относительная площадь повреждений в нише стволовых клеток при воздействии холода. (-) – при отсутствии гибели ДКИК, (+) – в присутствии гибели ДКИК. За 100% принята средняя площадь повреждений в корнях при отсутствии гибели ДКИК. Шкалы ошибок представлены стандартным отклонением.

Предсказание 3. Гибель ДКИК дает корню дополнительные адаптивные преимущества при воздействии неблагоприятных факторов среды.

По результатам эксперимента при перемещении растений в нормальные условия после воздействия холодого стресса быстрее росли именно те корни, в которых наблюдалась гибель ДКИК, по сравнению с корнями, где гибели не наблюдалось (Hong et al., 2017). Чтобы проверить, дает ли преимущество гибель ДКИК при последующих стрессовых воздействиях окружающей среды, в группе проф. Чен Ксу (Сингапур) была проведена следующая экспериментальная работа. Была имитирована индуцированная холодом гибель ДКИК у корней из контрольной группы с помощью абляции ДКИК с использованием многофотонного лазера. Было показано, что абляция ДКИК, приводит к значительному увеличению экспрессии репортера в линии

DR5::GFP в ПЦ и лучшему восстановлению роста корней после перенесения холодового стресса. Также было показано, что подобные корни лучше переносят условия имитации засухи (обработка 20% PEG-6000 при 4°C). В таких корнях, преадаптированных к неблагоприятным условиям с помощью холодового стресса или абляции ДКИК, наблюдалось значительно меньшее количество клеточных смертей в зоне растяжения в результате обработки PEG-6000, по сравнению с контрольными корнями обработанными.

Таким образом, предсказания модели о потере идентичности ПЦ и уязвимом состоянии ниши стволовых клеток после деления ИК, а также о защитной функции гибели ДКИК, дающей преимущества при последующем стрессовом воздействии, были подтверждены экспериментально.

2.6. Выводы по главе 2

На основании предсказаний модели и их экспериментальной верификации был предложен механизм адаптации растений к действию низких положительных температур под названием «Жертва ради спасения» (Hong et al., 2017). Длительный холодовой стресс вызывает повреждения ДНК в нише стволовых клеток апикальной меристемы корня *A. thaliana*. Повреждение ДНК приводит к селективной гибели ДКИК, что обеспечивает механический барьер для потоков ауксина в меристеме и позволяет поддерживать максимум концентрации ауксина в ПЦ. Эти процессы обеспечивают сохранение целостности ниши стволовых клеток и дают адаптивные преимущества при неблагоприятных условиях окружающей среды, в том числе при последующей засухе. Схематично данный механизм описан на рис. 19.

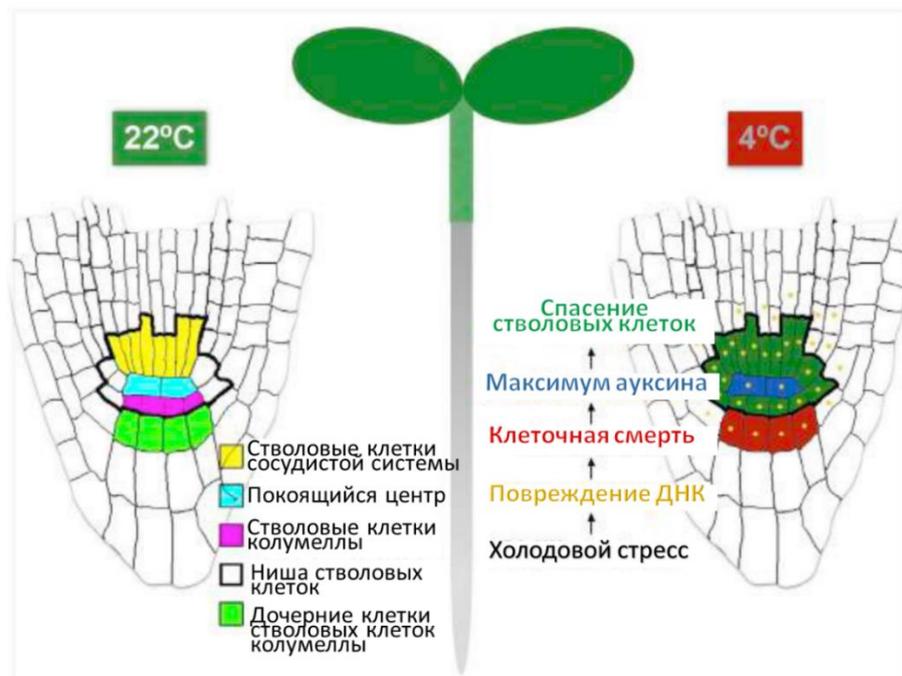


Рис. 19. Механизм «Жертва ради спасения». Новый механизм адаптации растений к действию низких положительных температур. Адаптировано из (Hong et al., 2017).

3. Моделирование нарушений в структуре колумеллы при сверхэкспрессии и потере функции гена *WOX5*

3.1. Экспериментальные данные по влиянию *WOX5* на распределение ауксина и анатомию кончика корня

3.1.1. Материалы

Экспериментальная работа была проведена в университете Фрайбурга (Германия) Тарасом Пастернаком по предложенным нами схемам. Для развития математической модели были использованы микрофотографии с конфокального микроскопа кончиков корней *A. thaliana* дикого типа (wt, Col-0, контроль), нокаута *wox5-1* и индуцированного мутанта со сверхэкспрессией *WOX5* (*35S::WOX5-GR*) (Рис. 20А), а также данные о экспрессии фермента синтеза ауксина TAA1 в линии *TAA1::TAA1-GFP*, репортера ауксина в линии *DR5::GFP* (Рис. 20Б,В). Экспрессия PIN белков в линиях Col-0, *35S::WOX5-GR*, *wox5-1* исследовалась с помощью специфических антител методом иммунолокализации (Рис. 20Г,Д). *35S::WOX5-GR* – трансгенная линия, содержащая белок WOX5 сшитый с лиганд-связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора крысы (GR) под минимальным промотором (Borghì, 2010; Pi et al., 2015). В отсутствие стероидов, то есть до обработки дексаметазоном (DEX), GR связан с закрепленными в цитоплазме комплексами, содержащими белки теплового шока 90 (HSP90), вследствие чего белок WOX5-GR не может проникать в ядро, а значит не может действовать как транскрипционных фактор. При обработке DEX происходит разрушение связи GR-HSP90 и активация транскрипционного фактора. Растения выращивались на вертикально ориентированных чашках Петри на твердой агаризированной ½MS среде при температуре 22°C, при стандартных условиях освещения и влажности четыре дня после прорастания. Впоследствии растения переносились на среду с добавлением mock, для линий Col-0 и *wox5-1*, и 10 мкМ DEX (дексаметазон) для линии *35S::WOX5-GR* на 6 и 48 часов.

3.1.2. Анатомические изменения в линиях Col-0, *wox5-1*, 35S::*WOX5-GR*

В нокаутной линии *wox5-1* наблюдается преждевременная дифференцировка ИК, что подтверждается образованием в них зерен крахмала, характерных только для дифференцированных клеток (Рис. 20А). Также у растений с данной мутацией часто наблюдается уменьшение количества слоев клеток колумеллы, как правило, на один слой. С другой стороны, в трансгенной линии 35S::*WOX5-GR* со сверхэкспрессией *WOX5* при обработке дексаметазоном происходит постепенное разрастание в колумелле пула мелких клеток, похожих на ИК и не содержащих гранул крахмала (Рис. 20А). Уже после 6 часов обработки дексаметазоном появляется дополнительный ряд клеток, похожих на ИК, а после 48 часов обработки в колумелле остается всего один ряд клеток, содержащих гранулы крахмала.

3.1.3. Экспрессия ферментов синтеза, белков транспортеров и репортера ауксина в линиях Col-0, *wox5-1*, 35S::*WOX5-GR*

Анализ мутантов *wox5-1* с потерей функции гена *WOX5* показал снижение сигнала репортера ауксина DR5::*GFP* в колумелле, а также снижение экспрессии белка TAA1, ответственного за биосинтез ауксина в покоящемся центре и прилегающей зоне, в линии *TAA1::TAA1-GFP* × *wox5-1*. Уровень экспрессии репортера ауксина DR5::*GFP* в трансгенной линии 35S::*WOX5-GR* уже через 6 часов после активации дексаметазоном был увеличен, ровно как и экспрессия гена *TAA1* (Рис. 20В). Через 48 часов после активации наблюдалось значительное расширение доменов экспрессии репортеров TAA1::*TAA1-GFP* и DR5::*GFP* (Рис. 20Б,В).

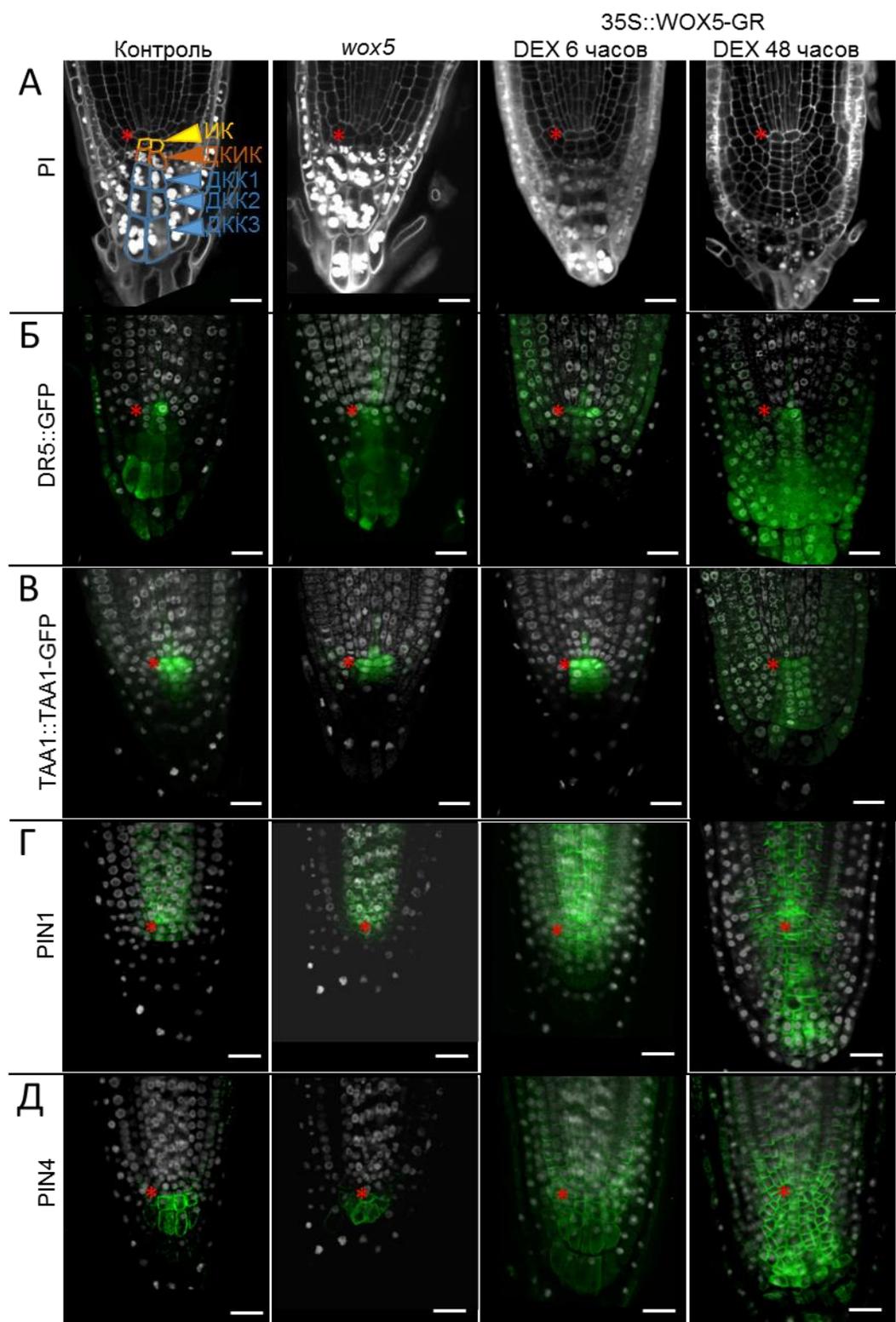


Рис. 20. Сравнение морфологии и процессов синтеза и транспорта ауксина, а также ответа на ауксин в апикальной меристеме корней *A. thaliana* для дикого типа, мутанта *wox5-1* и трансгенной линии 35S::WOX5-GR на медиальном срезе кончика корня. Красной звездочкой отмечена позиция ПЦ. **А.** Анатомическое строение кончика корня. Клеточные стенки окрашены PI. **Б.** Экспрессия репортера ауксина DR5::GFP. **В.** Экспрессия репортера фермента синтеза ауксина TAA1::TAA1-GFP. **Г.** Экспрессия PIN1, показанная с помощью

иммунолокализации. Д. Экспрессия PIN4, показанная с помощью метода иммунолокализации.

Также, наблюдались значительные изменения в экспрессии PIN транспортеров ауксина (Рис. 20Г,Д). Так для трансгенной линии *35S::WOX5-GR* было показано расширение домена экспрессии неполярно локализованных белков семейства PIN в колумелле, а именно PIN1 и PIN4. Стоит отметить, что для белка PIN1 расширение домена сопровождалось сменой полярной локализации на неполярную.

3.1.4. Гипотеза о роли WOX5 в распределении ауксина

Экспериментальные данные свидетельствуют, что в мутанте *wox5-1* и трансгенной линии *35S::WOX5-GR* наравне с морфологическими изменениями наблюдаются изменения в экспрессии генов ферментов синтеза ауксина, белков-переносчиков ауксина семейства PIN, а также репортера ауксина DR5 (Рис. 20). Наличие обратных связей между ауксином и белками семейства PIN позволяет предположить, что воздействие гена *WOX5* на экспрессию PIN белков опосредовано изменением распределения ауксина. Была выдвинута гипотеза о том, что первичной ролью гена *WOX5* в рамках исследуемых явлений является активация *TAA1*-зависимого синтеза ауксина. Мы предположили, что изменения в паттернах экспрессии белков PIN, уровне экспрессии репортера ауксина DR5::GFP и морфологии колумеллы в целом являются следствием увеличения или уменьшения синтеза ауксина в апикальной меристеме корня *A. thaliana*.

Чтобы проверить эту гипотезу было проведено комбинированное экспериментально-компьютерное исследование с применением методов математического моделирования.

3.2. Результаты численного моделирования для двумерной модели с прямоугольным клеточным ансамблем

На первом этапе моделирования мы использовали базовую двумерную математическую модель распределения ауксина с прямоугольным клеточным

ансамблем (см. раздел 2.2.). Для моделирования распределения ауксина в контроле были использованы значения параметров из таблицы 2.

Для моделирования распределения ауксина в линии *35S::WOX5-GR* мы изменили константу скорости синтеза ауксина $K_{s,a}$, в соответствии с экспериментальными данными по изменению экспрессии гена *TAA1* в ПЦ (Рис. 20, Таблица 4). Все остальные параметры модели остались без изменений (Таблица 2).

Поскольку для мутанта *wox5-1* наблюдается снижение экспрессии *TAA1* в нише ствольных клеток, но не происходит полной потери сигнала *TAA1::TAA1-GFP* (Рис. 20), мы уменьшили константу скорости синтеза ауксина $K_{s,a}$ до 20% от значения для контроля (Таблица 4).

Таблица 4. Значения параметров скорости синтеза ауксина, использованных в моделях для расчета концентрации ауксина в контроле, трансгенной линии *35S::WOX5-GR* и мутанте *wox5-1*.

| Название параметра | Контроль | <i>35S::WOX5-GR</i> | <i>wox5-1</i> |
|---|----------|---------------------|---------------|
| Базовая двумерная модель с прямоугольным клеточным ансамблем | | | |
| Константа скорости синтеза ауксина ($K_{s,a}$) | 0,002 | 0,0044 | 0,0004 |
| Дополненная двумерная модель с прямоугольным клеточным ансамблем | | | |
| Константа скорости базального синтеза ауксина ($K_{s,a}$) | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Константа скорости <i>TAA1</i> -зависимого синтеза ауксина ($K_{TAA1,a}$) | 0,05 | 0,11 | 0,01 |

В результате моделирования распределения ауксина в линии *35S::WOX5-GR* в стационарном решении наблюдалось смещение максимума ауксина вверх на две клетки. Клетка с максимумом концентрации ауксина (ПЦ) становится не пятой, а седьмой клеткой от кончика корня, то есть количество клеток колумеллы увеличилось с четырех до шести в модели (Рис. 21Б,В). В стационарном решении для мутанта *wox5-1* наблюдалось смещение максимума концентрации ауксина вниз на одну клетку, то есть слеток колумеллы становится на одну меньше (Рис. 21А,Б). Данные различия в количестве рядов колумеллы согласуются с морфологическими изменениями, наблюдаемыми в эксперименте (Рис. 20А). Вместе со смещением максимума

концентрации ауксина в стационарном решении модели происходит расширение домена экспрессии PIN347, что хорошо согласуется с экспериментальными данными (Рис. 20).

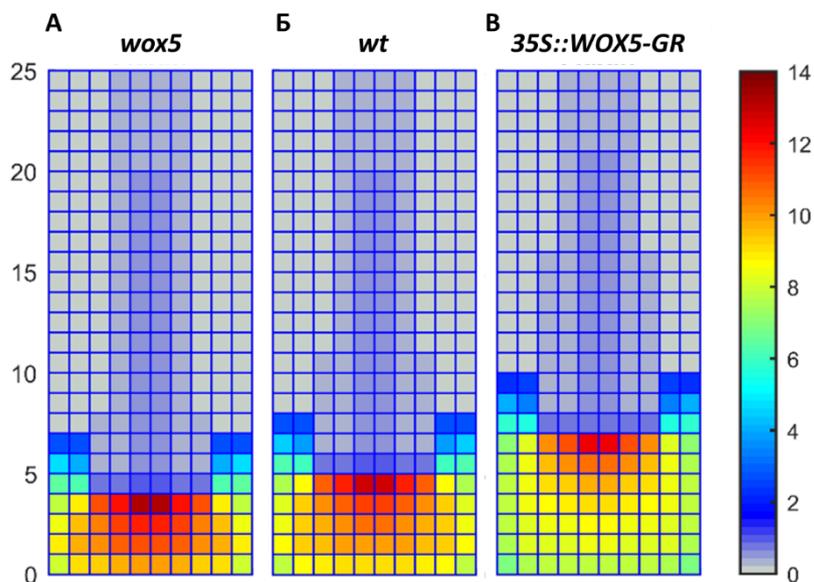


Рис 21. Распределение ауксина, полученное в базовой двумерной модели с прямоугольным клеточным ансамблем. **А.** Мутантная линия *wox5-1* с потерей функции гена *WOX5*. **Б.** Контроль. **В.** Трансгенная линия *35S::WOX5-GR*

В двумерной математической модели, описанной в разделе 2.2, синтез ауксина ($K_{s,a}$) задан одинаковым во всех клетках. Для более корректного описания *ТАА1*-зависимого синтеза ауксина, а также чтобы исследовать самые ранние изменения в распределении ауксина при индукции *WOX5*, мы дополнили базовую математическую модель следующим образом: кроме базального синтеза ауксина $K_{s,a}$, присутствующего во всех клетках клеточного ансамбля, мы ввели дополнительную переменную $K_{ТАА1,a}$, которая описывает скорость *ТАА1*-зависимого синтеза ауксина только в клетки, в которых наблюдалась экспрессия *ТАА1* в контроле, а именно ПЦ и ИК.

Уравнения для клеток (5;5) и (4;5) преобразовались следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{d[a]_{i,j}}{dt} = K_{s,a} + K_{ТАА1,a} - K_{d,a}[a]_{i,j} + D \times \sum_{m \in N_{i,j}} ([a]_m - [a]_{i,j}) + \sum_{x \in P} J_x(i), \text{ for } i = 5, j = 5 \\ \frac{d[a]_{i,j}}{dt} = K_{s,a} + \frac{1}{2} K_{ТАА1,a} - K_{d,a}[a]_{i,j} + D \times \sum_{m \in N_{i,j}} ([a]_m - [a]_{i,j}) + \sum_{x \in P} J_x(i), \text{ for } i = 4, j = 5 \end{cases} \quad (31)$$

В качестве начальных данных для расчета модели при моделировании корней, различных по экспрессии гена *WOX5*, использовалось стационарное решение базовой модели (раздел 2.2) при отсутствии TAA1-зависимого синтеза ауксина в корне ($K_{s,a}=0,1$). В результате было получено стационарное решение математической модели с максимумом концентрации ауксина в клетке (5;5).

Для симуляции TAA1-зависимого синтеза ауксина в контроле, была введена дополнительная переменная $K_{TAA1,a}$ в клетки ПЦ и ИК, (5;5) и (4;5) соответственно. Поскольку для клеток ПЦ и ИК наблюдался различный уровень сигнала TAA1-GFP (Рис. 20), то это было учтено в виде нормировочного коэффициента $\frac{1}{2}$ для клеток ИК в уравнении (31). Далее запускали расчет до получения стационарного решения.

Для расчета модифицированной модели было выбрано максимальное значение $K_{TAA1,a}$, при котором не наблюдалось изменение положения максимума ауксина в стационарном решении модели для всех трех линий (Таблица 4).

Для моделирования распределения ауксина в линии *35S::WOX5-GR* было увеличено значение константы $K_{TAA1,a}$ в соответствии с данными об изменении экспрессии TAA1 в ПЦ (Рис. 20, Таблица 4), а для мутанта *wox5-1* было учтено, что недостаток WOX5 приводит к снижению экспрессии TAA1 и константа $K_{TAA1,a}$ была уменьшена до 20% значения для контроля (Рис. 20, Таблица 4).

В результате моделирования распределения ауксина для трансгенной линии *35S::WOX5-GR* было получено увеличение расчетной концентрации ауксина в колумелле, в ПЦ и, в целом, во всем клеточном ансамбле относительно контроля, а также увеличение уровня экспрессии белков PIN1347 и PIN347 транспортеров в модели, что также соответствует экспериментальным данным. Также модель предсказывает небольшое повышение экспрессии PIN2 во внешних слоях корня, причем в эпидермисе больше.

Поскольку известно, что ауксин влияет также на скорость деления клеток и на дифференцировку (см. раздел 1.5), то можно предположить, что для клеток с близким содержанием ауксина характерна одинаковая «судьба».

Если посмотреть на концентрацию ауксина в ПЦ и клетках колумеллы (Рис. 22, красные рамочки), то видно, что в стационарном решении модели для линии *35S::WOX5-GR* концентрация ауксина во второй клетке от ПЦ (ДКИК) очень близка к концентрации ауксина в ИК для расчета в контроле. Поскольку в контроле делится именно эта клетка, то можно предположить, что данная концентрация ауксина оптимальна для деления. Следовательно, можно ожидать, что в трансгенной линии *35S::WOX5-GR* вскоре после индукции *WOX5* вторая от ПЦ клетка (ДКИК) также будет способна к делению. Это хорошо согласуется с экспериментальными данными.

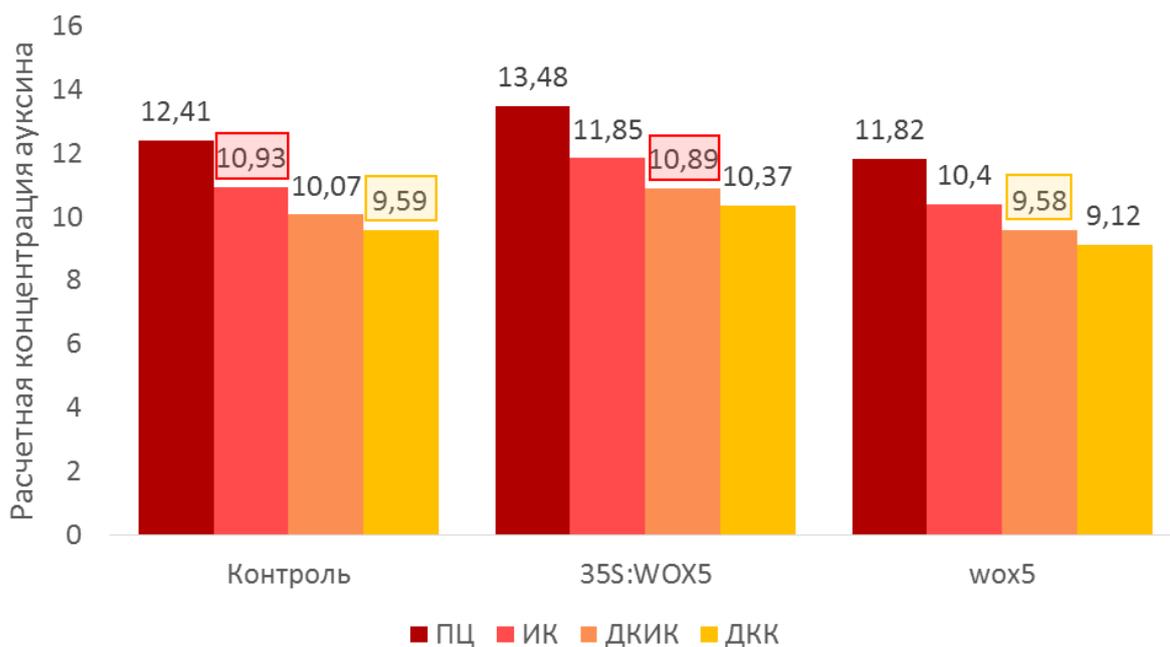


Рис. 22. Концентрация ауксина в условных концентрационных единицах (су) в ПЦ и клетках колумеллы в двумерной модели после модификации. Красной рамочкой выделены значения концентрации ауксина, характерные для делящейся в контроле ИК. Желтой рамочкой выделены значения концентрации ауксина, характерные для ДКК.

В результате моделирования распределения ауксина в мутанте *wox5-1* в стационарном решении было получено снижение концентрации ауксина относительно контроля в колумелле, в ПЦ и во внешних слоях (эпидермисе и

кортексе) с одновременным повышением концентрации ауксина в эндодермисе. Что сопровождалось повышением экспрессии PIN1347 в эндодермисе, при неизменном уровне в сосудистой ткани и перицикле, понижением экспрессии PIN347 и значительным повышением экспрессии PIN2.

Если посмотреть на концентрацию ауксина во второй клетке от ПЦ (ДКИК) в мутанте *wox5-1*, то можно увидеть, что она значительно ниже, аналогичной концентрации в контроле и практически совпадает с концентрацией в дифференцированной клетке колумеллы (ДКК) в контроле. Из чего можно предположить, что в *wox5-1* мутанте дифференцировка колумеллы происходит раньше (ближе к ПЦ), чем в контроле. Что и наблюдается в эксперименте.

При варьировании параметра $K_{TAA1,a}$ в контроле в пределах $\pm 15\%$ результаты моделирования качественно не менялись.

Таким образом, результаты моделирования свидетельствует в пользу предложенной нами гипотезы о том, что изменения морфологии, распределения ауксина и паттернов экспрессии белков PIN являются вторичными процессами, в сравнении с WOX5-регулируемым биосинтезом ауксина.

3.3. Описание одномерной компьютерной модели колумеллы корня *Arabidopsis thaliana* с ростом, делением и сращиванием клеток.

3.3.1. Описание структуры и процессов модели

Для описания клеточной динамики корневого чехлика была разработана одномерная гибридная динамическая модель, описывающая поведение клеток, расположенных вдоль центральной оси корня (Рис. 23). В этой модели клетки растут, делятся и сращиваются. Рост клеток, изменение концентрации ауксина и белка TAA1 описаны в виде дифференциальных уравнений, а события деления и гибели клеток являются дискретными событиями.

Рост клеток подчинялся следующим логическим правилам: 1) была установлена максимально допустимая длина клетки L_{max} , при приближении размеров клетки к этому значению, рост клетки значительно замедлялся, вплоть до полного прекращения роста; 2) чем выше концентрация ауксина в клетке, тем ниже скорость роста.

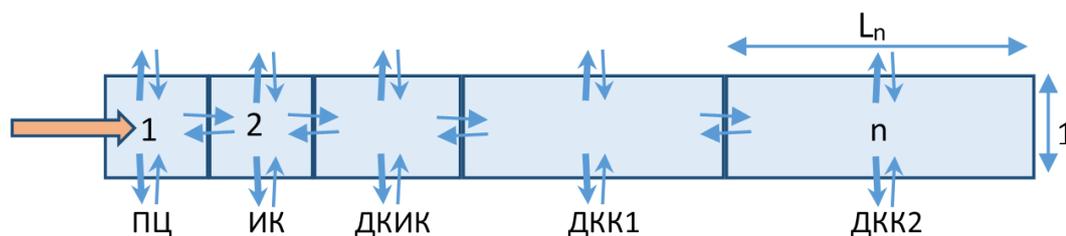


Рис. 23. Потоки ауксина в одномерной математической модели с ростом и делениями клеток. Оранжевой стрелкой обозначен поток из верхней части корня в ПЦ, голубыми стрелками обозначены потоки активного/пассивного транспорта.

Для расчета концентрации ауксина учитывались следующие процессы: поток ауксина из верхней части корня в ПЦ, ТАА1-зависимый синтез ауксина, деградация ауксина, пассивный и активный транспорт.

Активный транспорт ауксина был описан аналогично активному транспорту в двумерной модели с прямоугольным клеточным ансамблем (уравнение 14). Учитывался только один белок переносчик PIN347, который неполярно расположен на мембранах клеток, с допущением, что транспортеры всегда находятся в равновесном состоянии. Это позволило избавиться от лишней переменной и описать активный транспорт ауксина как ауксин-зависимую функцию. Параметры ауксин-зависимой экспрессии белка PIN347, а также параметры, описывающие деградацию и пассивный транспорт ауксина, были взяты из двумерной модели с прямоугольным клеточным ансамблем (Таблица 2).

Для учета латерального оттока ауксина из колумеллы в БКЧ был введен параметр компенсации латерального потока (p_{lat}), отражающий долю потока ауксина, как активного, так и пассивного транспорта, из клеточного ансамбля, которая не компенсируется боковым латеральным потоком из соседних клеточных файлов. Данный параметр одинаков для всех клеток в модели.

3.3.2. Уравнения математической модели

Поскольку в двумерной модели распределения ауксина с прямоугольным клеточным ансамблем все клетки были одинаковы, понятия концентрация и масса были неразделимы при рассмотрении единичной площади клетки. Соответственно можно считать, что ранее учитывалось изменение внутриклеточной массы ауксина и белков PIN. Однако при разработке одномерной модели с изменяющейся длиной клеток было необходимо разделить данные понятия для корректного описания транспорта ауксина между клетками с разными объемом и концентрацией ауксина при непрерывном росте. Для описания изменения концентрации веществ во времени использовалось следующее преобразование формулы:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{d\left(\frac{m}{V}\right)}{dt} = \frac{dm}{dt} * \frac{1}{V} - \frac{dV}{dt} * \frac{m}{V^2} = \frac{1}{V} \left(\frac{dm}{dt} - C * \frac{dV}{dt} \right). \quad (32)$$

Поскольку модель одномерная, то каждая клетка была представлена в виде прямоугольного параллелепипеда длины L , в то время как глубина и высота были приняты за единицу длины. Соответственно объем клетки в данном случае был эквивалентен ее длине. В то же время изменение массы исследуемого вещества можно записать по аналогии с двумерной моделью.

В работе Тиана и соавторов были установлены обратные связи между сигнальным путем ауксина и геном *WOX5* (Tian et al., 2014), с другой стороны, TAA1 экспрессируется лишь в клетках с высоким содержанием ауксина, что позволило нам описать экспрессию белка TAA1 в зависимости от ауксина.

На основании всего вышеизложенного была составлена система дифференциальных уравнений для n клеток в общем виде:

$$\begin{cases} \frac{da_i}{dt} = \begin{cases} (k_\alpha + k_s + k_{TAA} * TAA_1 - k_d a_1 - Tras_{out,1} - Tact_{out,1} + Tras_{in,1} + Tact_{in,1} - a_1 * \frac{dL_1}{dt}) / L_1 \\ (k_s + k_{TAA} * TAA_i - k_d a_i - Tras_{out,i} - Tact_{out,i} + Tras_{in,i} + Tact_{in,i} - a_i * \frac{dL_i}{dt}) / L_i, \text{ for } i = 2, \dots, n \end{cases} \\ \frac{dTAA_i}{dt} = \left(K_s * \frac{\left(\frac{a_i}{z_1}\right)^h}{1 + \left(\frac{a_i}{z_2}\right)^h} - K_d * TAA_i - L_i * \frac{dL_i}{dt} \right) / L_i \\ \frac{dL_i}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ if } a_i > s_{QC} \text{ and } L_i \geq 1 \\ \frac{(L_{max} - L_i)}{a_i} * K_{grow}, \text{ else} \end{cases} \end{cases} \quad (33)$$

где a_i – концентрация ауксина в клетке под номером i , TAA_i – концентрация белка TAA1 в клетке под номером i , k_α – интенсивность потока ауксина из

верхней части корня, k_s – константа скорости базального синтеза ауксина, k_{TAA} – константа скорости TAA1-зависимого биосинтеза ауксина, k_d – константа скорости деградации ауксина, $Tras_{out,i}$ – функция, описывающая пассивный транспорт ауксина из клетки под номером i , $Tact_{out,i}$ – функция, описывающая активный транспорт ауксина из клетки под номером i , $Tras_{in,i}$ – функция, описывающая пассивный транспорт ауксина в клетку под номером i , $Tact_{in,i}$ – функция, описывающая активный транспорт ауксина в клетку под номером i , K_S – константа скорости синтеза белка TAA1, K_d – константа скорости деградации белка TAA1, z_1 – порог активации ауксин-зависимого синтеза белка TAA1; z_2 – порог насыщения ауксин-зависимого синтеза белка TAA1; h – коэффициент Хилла, который определяет степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина a_i на скорость синтеза белка TAA1, L_i – длина клетки под номером i , L_{max} – максимально допустимый размер клетки, K_{grow} – константа скорости роста, s_{QC} – порог на рост клетки.

Пассивный транспорт через мембрану клетки, описан следующими функциями:

$$Tras_{out,i} = \begin{cases} 2 * D * a_i + (1 - p_{lat}) * 2L_i * D * a_i, & \text{for } i = 1, \dots, n - 1 \\ D * a_i + (1 - p_{lat}) * 2L_i * D * a_i, & \text{for } i = n \end{cases} \quad (34)$$

$$Tras_{in,i} = \begin{cases} D * a_{i+1}, & \text{for } i = 1 \\ D * a_{i+1} + D * a_{i-1}, & \text{for } i = 2, \dots, n - 1 \\ D * a_{i-1}, & \text{for } i = n \end{cases} \quad (35)$$

где a_i – концентрация ауксина в клетке под номером i , $Tras_{out,i}$ – функция, описывающая пассивный транспорт ауксина из клетки под номером i , $Tras_{in,i}$ – функция, описывающая пассивный транспорт ауксина в клетку под номером i , L_i – длина клетки под номером i , D – константа скорости пассивного транспорта, p_{lat} – параметр компенсации латерального потока.

Активный транспорт через мембрану клетки, опосредованный белком транспортером семейства PIN, описан следующими функциями:

$$Tact_{out,i} = \begin{cases} \frac{1}{2*L_i+1} * Fpin_i * a_i + (1 - p_{lat}) * \frac{2L_i}{2*L_i+1} * Fpin_i * a_i, & \text{for } i = 1, n \\ \frac{2}{2*L_i+2} * Fpin_i * a_i + (1 - p_{lat}) * \frac{2L_i}{2*L_i+2} * Fpin_i * a_i, & \text{for } i = 2, \dots, n - 1 \end{cases} \quad (36)$$

$$Tact_{in,i} = \begin{cases} \frac{1}{2*L_{i+1}+2} * Fpin_{i+1} * a_{i+1}, for i = 1 \\ \frac{1}{2*L_{i-1}+1} * Fpin_{i-1} * a_{i-1} + \frac{1}{2*L_{i+1}+2} * Fpin_{i+1} * a_{i+1}, for i = 2 \\ \frac{1}{2*L_{i-1}+2} * Fpin_{i-1} * a_{i-1} + \frac{1}{2*L_{i+1}+2} * Fpin_{i+1} * a_{i+1}, for i = 3, \dots, n - 2, \\ \frac{1}{2*L_{i-1}+2} * Fpin_{i-1} * a_{i-1} + \frac{1}{2*L_{i+1}+1} * Fpin_{i+1} * a_{i+1}, for i = n - 1 \\ \frac{1}{2*L_{i-1}+2} * Fpin_{i-1} * a_{i-1}, for i = n \end{cases} \quad (37)$$

где a_i – концентрация ауксина в клетке под номером i , $Tact_{out,i}$ – функция, описывающая активный транспорт ауксина из клетки под номером i , $Tact_{in,i}$ – функция, описывающая активный транспорт ауксина в клетку под номером i , L_i – длина клетки под номером i , $Fpin_i$ – функция скорости PIN-зависимого активного транспорта ауксина в клетке под номером i , p_{lat} – параметр компенсации латерального потока.

Функция скорости PIN-зависимого активного транспорта ауксина в клетке представлена в виде:

$$Fpin_i = \frac{\left(\frac{a_i}{q_1}\right)^S}{1 + \left(\frac{a_i}{q_2}\right)^S}, \quad (38)$$

где a_i – концентрация ауксина в клетке под номером i , $Fpin_i$ – функция скорости PIN-зависимого активного транспорта ауксина в клетке под номером i , q_1 – порог активации ауксин-зависимого синтеза белка PIN; q_2 – порог насыщения ауксин-зависимого синтеза белка PIN; S – коэффициент Хилла, который определяет степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина a_i на скорость синтеза белка PIN.

Все расчеты динамической одномерной модели проводились в программе MATLAB. Для численного расчета решений системы дифференциальных уравнений использовалась функция интегратора дифференциальных уравнений *ode15s*.

3.3.3. Описание клеточной динамики в одномерной модели

Для регуляции роста, деления и слущивания клеток, по аналогии с моделью (Dubreuil et al., 2018), были введены три пороговых значения: s_{QC} , s_{CSC} , s_{Det} , а для каждой клетки можно было определить ее состояние в

соответствии с этими порогами. Так если концентрация ауксина в клетках выше первого порога (s_{QC}), что соответствует состоянию покоя, то такие клетки не растут («Покой» на Рис. 24). Если концентрация ауксина в клетках ниже первого порога (s_{QC}), но выше второго порога (s_{CSC}), клетки растут и потенциально способны поделиться, и это соответствует стволловому состоянию («Рост и Деление» на Рис. 24). Если концентрация ауксина в клетках ниже второго порога (s_{CSC}), но выше третьего порога (s_{Det}), то клетки все еще растут, но уже не способны к делению, что соответствует дифференцированному состоянию («Рост» на Рис. 24). Если концентрация ауксина в клетках ниже третьего порога (s_{Det}), то такие клетки слущиваются, т.е. удаляются из клеточного ансамбля («Слущивание» на Рис. 24).



Рис. 24. Схема, отражающая смену состояний клетки в зависимости от концентрации ауксина в клетке. По ось ординат отложена условная концентрация ауксина в клетке, по оси абсцисс отложена длина клеток, за нулевое значение принята верхняя граница клетки ПЦ.

Стоит отметить, что для того чтобы событие деления клетки состоялось, клетка должна быть определенного размера ($L_{div1} \leq L_i \leq L_{div2}$), то есть слишком маленькие и слишком большие клетки делиться не могут. Неспособность к делению клеток до достижения ими минимально-необходимого размера была показана экспериментально в ряде работ (Schiessl et al., 2012, Sablowski, Dornelas, 2013). При этом для клеток, размер которых превышает L_{div2} , мы полагаем, что они уже вступили на путь дифференцировки и потеряли способность к делению.

Расчет модели происходит итеративно: сначала происходит численный расчет дифференциальных уравнений в течении 100 единиц машинного времени (t_u), затем клетки проверяются на условия деления и/или гибели, происходит изменение нумерации клеток и числа уравнений в системе, затем расчет продолжается снова до новой проверки условий на деление и отмирание клеток через 100 единиц машинного времени.

3.4. Начальные данные для расчета динамической модели

В качестве начальных данных для расчета динамической модели мы использовали стационарное решение, полученное в результате предварительного расчета с фиксированным числом клеток и заданными размерами клеток при выключенном росте ($K_{grow}=0$). Размеры клеток для предварительного расчета были получены на основании измерения длин клеток на репрезентативном экспериментальном изображении корня и нормировании их относительно размеров ПЦ (Таблица 6).

Таблица 5. Значения длин клеток ПЦ и колумеллы, использованные в качестве начальных данных в условных единицах длины.

| ПЦ | ИК | ДКИК | ДКК1 | ДКК2 | ДКК3 |
|----|------|------|------|------|------|
| 1 | 1,03 | 2,14 | 2,79 | 3,14 | 4,74 |

3.5. Подбор параметров модели

Набор значений параметров одномерной динамической модели распределения ауксина в колумелле представлен в Таблице 6. Большая часть параметров модели были получены из модифицированной двумерной математической модели. Значения для таких параметров, как константа скорости деградации ауксина (k_d), константа скорости пассивного транспорта ауксина (D), константа скорости базального синтеза ауксина (k_s), а также все параметры, описывающие активный транспорт ауксина (q_1, q_2, s), были взяты без изменений из двумерной математической модели.

Значение параметра компенсации латерального потока ауксина (p_{lat}) было оценено для стационарного решения двумерной модели для контроля.

Используя уравнения для двумерной методической модели (Уравнения 14-25), был рассчитан латеральный поток ауксина за счет активного и пассивного транспорта из клетки под номером (4;5) в клетку (4;4) и обратно в стационарном решении. На основании этого расчета было оценено значение параметра компенсации латерального потока ауксина с точностью до первого знака после запятой.

Подбор оставшейся части параметров модели осуществлялся в результате предварительного расчета с фиксированным числом клеток и заданными размерами клеток при выключенном росте ($K_{grow}=0$).

Подбор параметров для ауксин-зависимого синтеза ТАА1 (z_1, z_2, h) в контроле был выполнен таким образом, чтобы домен экспрессии ТАА1 был ограничен ПЦ и двумя соседними клетками, а максимум экспрессии лежал в границах варьирования $K_{TAA1,a}$ для двумерной модели.

Поток ауксина из верхней части корня (k_a) и константа ТАА1-зависимого синтеза ауксина (k_{TAA}) подбирались таким образом, чтобы в ПЦ в результате предварительного расчета для контроля наблюдался такой же уровень ауксина, как и в двумерной модели.

Пороги на рост, деление и слущивание клеток были выбраны так, чтобы в процессе расчета динамической модели для контроля наблюдалось состояние гомеостаза, то есть процессы деления и слущивания были согласованы во времени и количество клеток в колумелле сохранялось постоянным, то есть за каждым делением ИК следовало слущивание последней ДКК. При этом состояние первой клетки соответствовало состоянию ПЦ, то есть первая клетка в модели не должна была расти и делиться в течение расчета.

Константы скорости синтеза и деградации белка ТАА1 были приняты эквивалентными и равными 1 для контроля. Для учета изменения уровня экспрессии ТАА1 в трансгенной линии *35S::WOX5-GR* и мутанте *wox5-1* мы изменяли константу скорости синтеза ТАА1 (K_s) аналогично тому, как мы это делали в дополненной двумерной модели.

Таблица 6. Значения параметров, использованные в одномерной динамической модели. tu – единицы массы, cu – единицы концентрации, tu – единицы времени, vu – единицы объема, dl – безразмерный параметр.

| Название параметра | Символ | Единицы измерения | Значение |
|---|------------|-------------------|------------|
| Интенсивность поток ауксина из верхней части корня | k_a | tu/tu | 3,1 |
| Константа скорости деградации ауксина | k_d | vu/tu | 0,005 |
| Константа скорости пассивного транспорта ауксина | D | $1/tu$ | 0,08 |
| Константа скорости базального синтеза ауксина | k_s | tu/tu | 0,001 |
| Константа скорости ТАА1-зависимого синтеза ауксина | $k_{ТАА}$ | vu/tu | 6 |
| Константа скорости синтеза белка ТАА1 | K_s | tu/tu | 1/2,2/0,2* |
| Константа скорости деградации белка ТАА1 | K_d | vu/tu | 1 |
| Порог активации ауксин-зависимого синтеза белка ТАА1 | z_1 | $1/cu$ | 10 |
| Порог насыщения ауксин-зависимого синтеза белка ТАА1 | z_2 | $1/cu$ | 7,8 |
| Коэффициент Хилла, определяющий степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина на скорость синтеза белка ТАА1 | H | dl | 12 |
| Порог активации ауксин-зависимого синтеза белков PIN в колумелле | q_1 | $1/cu$ | 10 |
| Порог насыщения ауксин-зависимого синтеза белков PIN в колумелле | q_2 | $1/cu$ | 10 |
| Коэффициент Хилла, определяющий степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина на скорость синтеза белков PIN в колумелле | S | dl | 4 |
| Константа скорости роста | K_{grow} | dl | 0,0001 |
| Параметр компенсации латерального потока ауксина | p_{lat} | dl | 0,9 |
| Максимально допустимый размер клетки | L_{max} | vu | 5 |
| Минимально допустимый размер клетки для деления | L_{div1} | vu | 1,5 |
| Максимально допустимый размер клетки для деления | L_{div2} | vu | 2,5 |
| Порог на рост клетки | s_{QC} | cu | 12 |
| Порог на деление клетки | s_{CSC} | cu | 10 |
| Порог на слущивание | s_{Det} | cu | 1,5 |

* значения для разных линий: контроль/35S::WOX5-GR/*wox5-1*

В ходе диссертационного исследования было проведено подробное исследование поведения одномерной компьютерной модели распределения ауксина с ростом и делением клеток при варьировании по параметрам. В результате проведенного анализа было показано, что одномерная динамическая модель распределения ауксина наиболее чувствительна к изменению интенсивности потока ауксина из верхней части корня и наименее чувствительна к изменению скорости деградации и базального синтеза ауксина. Результаты варьирования по параметрам приведены в Приложении 1.

3.6. Результаты моделирования с использованием одномерной модели с ростом, делением и слущиванием клеток

После подбора параметров для контроля были произведены расчеты динамической модели, имитирующие поведение всех трех типов корней: контроль (дикий тип), *wox5-1* и *35S::WOX5-GR*.

В результате расчета динамической одномерной модели в случае контроля наблюдался баланс между делением и слущиванием клеток, так, что число клеток оставалось постоянным (6 клеток), как только клетка соответствующая ИК делилась, то через 1-2 шага происходило слущивание последней ДКК. На протяжении всего времени расчета (до 3000 шагов) первая клетка находилась в состоянии покоя, что соответствует ПЦ, вторая клетка находилась в стволовом состоянии, что соответствует ИК, остальные клетки клеточного ансамбля находились в дифференцированном состоянии (Рис. 25). Стоит отметить, что в модели всегда сохранялась одна клетка в стволовом состоянии. При делении ИК, уже на следующем шаге соседняя с ПЦ дочерняя клетка сохраняла стволовое состояние, в то время как вторая дочерняя клетка переходила в дифференцированное состояние. Также домен экспрессии белка ТАА1 в модели оставался стабилен на протяжении всего времени расчета. (Рис. 25)

В результате расчета динамической одномерной модели для *wox5-1* мутанта в среднем наблюдалось уменьшение длины клеточного ансамбля на одну клетку. Вторая клетка клеточного ансамбля, соответствующая в контроле ИК, находилась в дифференцированном состоянии, что соответствует экспериментальным данным. Домен экспрессии белка ТАА1 был меньше на 1 клетку, по сравнению с контролем при одновременном снижении уровня его экспрессии, что соответствует экспериментальным данным. Одновременно с этим содержание ауксина в клеточном ансамбле лишь незначительно падает, что также соответствует экспериментальным данным. Важно отметить, что первая клетка клеточного ансамбля, соответствующая ПЦ, находилась в стволовом состоянии, вместо состояния покоя, и была способна к делению.

Таким образом, наша модель предсказала, что в мутанте *wox5-1* должны наблюдаться преждевременные/учащенные деления ПЦ. Тем не менее, для мутанта *wox5-1* в модели было характерно сохранение баланса между делением и отмиранием клеток, как и в случае контроля. Следовательно, нарушения в работе ПЦ не оказывают сильного влияния на поддержание баланса между делением и слушиванием клеток КЧ, что согласуется с экспериментальными данными.

В результате расчета динамической одномерной модели для трансгенной линии *35S::WOX5-GR* наблюдалось значительное расширение домена экспрессии белка ТАА1 в течение времени расчёта, до размеров всей колумеллы на 1600 шаге (Рис. 25В). В то же время концентрация ауксина в клеточном ансамбле очень сильно растет со временем. Стоит отметить, что в данной линии происходит нарушение баланса между делением и слушиванием клеток колумеллы, то есть деления происходят гораздо чаще событий слушивания последней ДКК. В модели, как и в эксперименте, мы наблюдаем увеличение количества маленьких клеток. Так на 1600 шаге расчета остается лишь одна большая дифференцированная клетка (Рис. 25В). Однако, несмотря на большое количество мелких клеток, в столовом состоянии находятся не все клетки, а лишь расположенные в дистальной части колумеллы. Согласно результатам моделирования, в проксимальной части колумеллы (со стороны ПЦ) образуется пул неделящихся клеток в состоянии покоя, причем количество клеток в состоянии покоя увеличивается в течение времени расчёта.

При длительном расчете модели происходит очень быстрое увеличение размеров колумеллы за счет большого количества делений. Уже на 1900 шаге количество клеток колумеллы достигает 26 клеток, а через 3000 шагов количество клеток превышает 200. Из этого мы можем заключить, что в реальном корне деления будут продолжаться до тех пор, пока не будут исчерпаны все силы организма, и растение не погибнет. В экспериментах за

растениями линии *35S::WOX5-GR* обычно не наблюдают более двух дней, на протяжении которых продолжается рост размеров колумеллы.

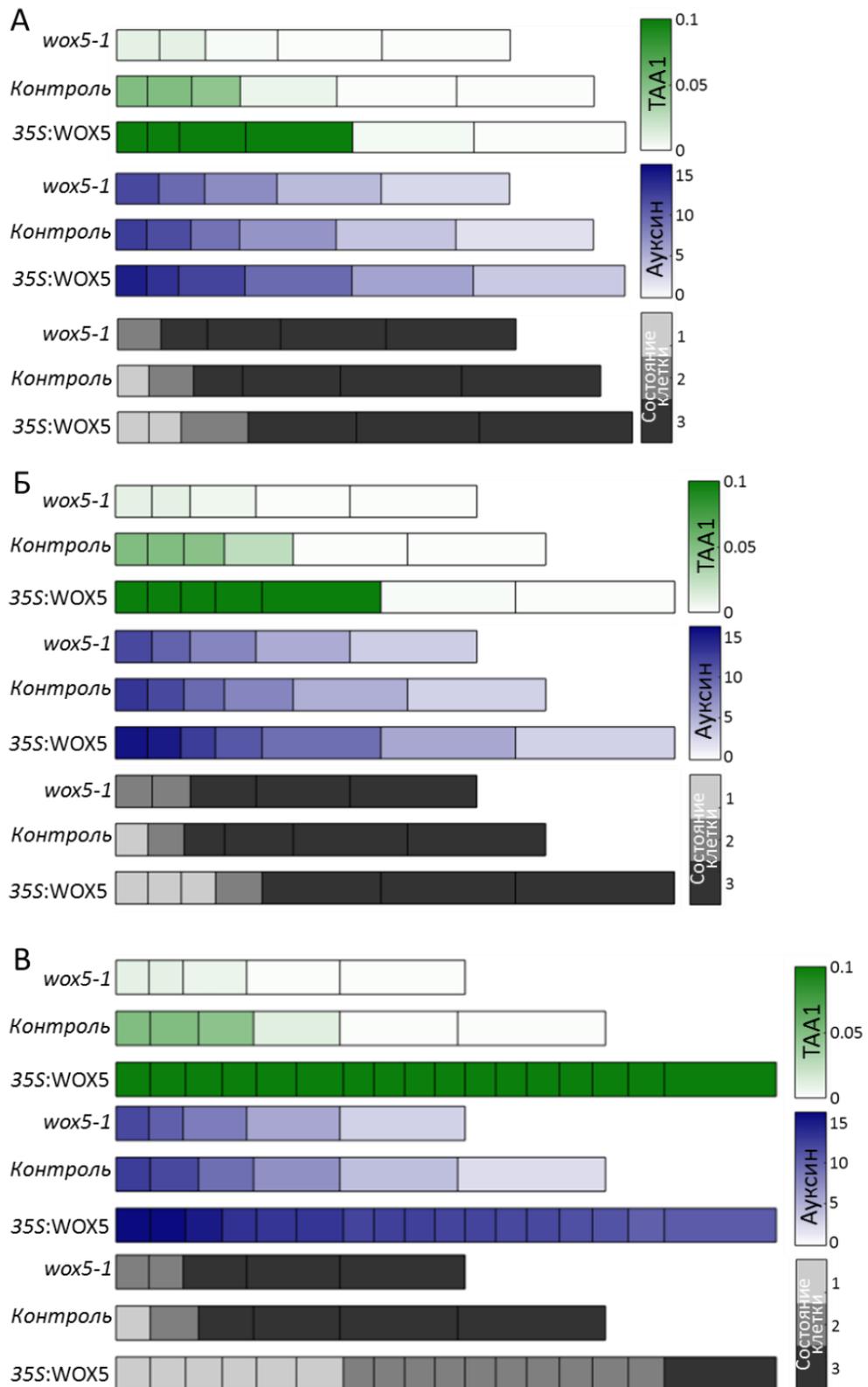


Рис. 25. Сравнение результатов моделирования с использованием одномерной модели с ростом, делением и гибелью клеток. **А.** Распределение белка ТАА1 (зеленый), ауксина (синий) и клеточных состояний (серый) в клеточном ансамбле на 350 шаге расчета модели

для трех линий: *wox5-1*, контроль и *35S::WOX5-GR*. **Б.** Распределение белка ТАА1, ауксина, клеточных состояний на 500 шаге расчета модели. **В.** Распределение белка ТАА1, ауксина, клеточных состояний на 1600 шаге расчета модели. Состояния клетки: 1 – состояние покоя (не способна делиться, не растет), 2 – ствольное состояние (способна расти и делиться), 3 – дифференцированное состояние (способна только расти).

Полученные результаты расчётов динамической модели для трех линий (контроль, *wox5-1* и *35S::WOX5-GR*) доказывают непротиворечивость и достаточность выдвинутой гипотезы о том, что важной ролью гена *WOX5* в процессе поддержания ниши стволовых клеток, в особенности ИК, является активация и поддержание ТАА1-зависимого синтеза ауксина. В модели было показано, что учета *WOX5*-зависимой модуляции экспрессии фермента синтеза ауксина ТАА1 достаточно для объяснения наблюдаемых в эксперименте изменений в строении корневого чехлика в растениях трансгенной линии *35S::WOX5-GR* и мутантных растениях линии *wox5-1*.

3.7. Экспериментальная верификация предсказаний математических моделей

Для верификации предсказаний модели Тарасом Пастернаком были проведены эксперименты в университете Фрайбурга в Германии. Для проверки предсказания об увеличении пула неделящихся клеток в трансгенной линии *35S::WOX5-GR* во времени, был проведен анализ распределения событий репликации ДНК в АМК в контроле и в трансгенной линии *35S::WOX5-GR* через 16 и 48 часов обработки дексаметазоном (Рис. 26). Для окрашивания ядерной ДНК во время события репликации был применен флуоресцентный краситель EdU. Трехмерные изображения корней с конфокального микроскопа анализировались в программе iRoCS Toolbox (Schmidt et al., 2014) для трехмерного аннотирования организации кончика корня Лаврехой В.В.

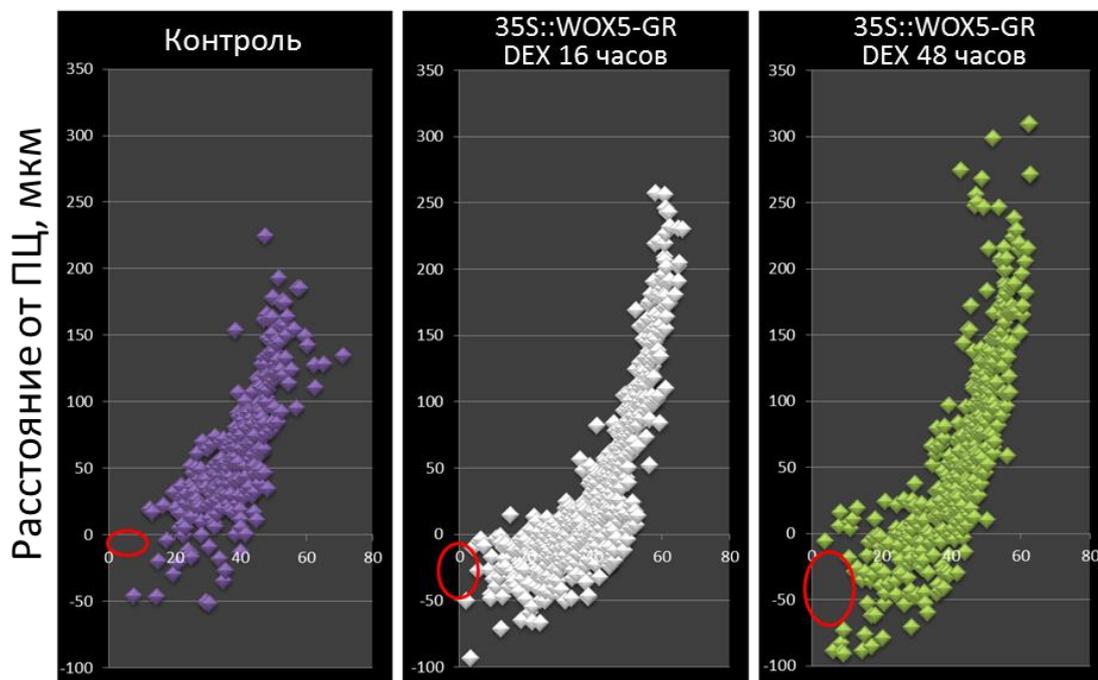


Рис. 26. Распределение событий репликации ДНК в АМК. Ромбами обозначены положения ядер, окрашенных EdU относительно положения покоящегося центра. Красным овалом выделена область, в которой не происходит событий репликации ДНК.

Как видно из представленного распределения событий репликации ДНК в линии *35S::WOX5-GR*, после обработки дексаметазоном происходит расширение области, в которой не происходит репликации ДНК с течением времени в сравнении с контролем. Клетки, в которых не происходит репликации ДНК, как раз соответствуют наблюдаемым в модели клеткам в состоянии покоя.

Для доказательства основной роли синтеза ауксина в формировании разрастания в колумелле трансгенной линии *35S::WOX5-GR* за счет пролиферации в дистальной части колумеллы Тарасом Пастернаком были проведены эксперименты по обработке *L*-кинуренином, конкурентным ингибитором синтеза ауксина через TAA1 (5мкМ, 48 часов), корней дикого типа и активированной дексаметазоном линии *35S::WOX5-GR* (Рис. 27).

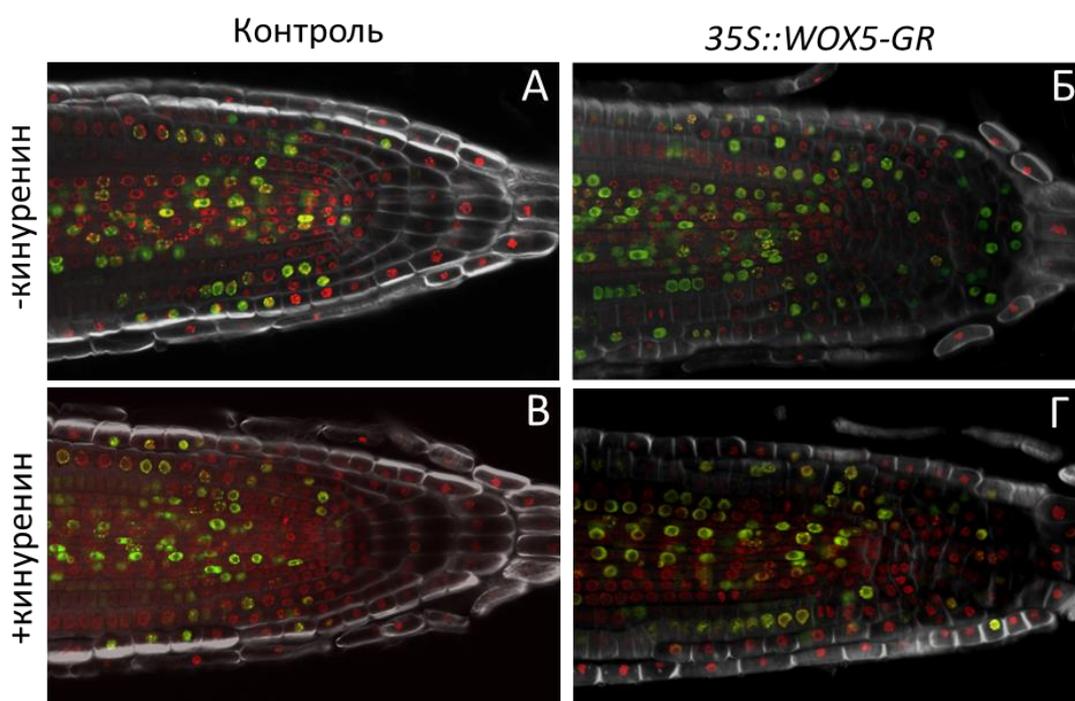


Рис. 27. Микрофотографии медиального среза кончиков корней с окраской ядер с помощью EdU (зеленый), DAPI (красный) и клеточных стенок с помощью BR28 (белый). **А.** Распределение митозов (зеленый сигнал) в контроле без обработки ингибитором синтеза ауксина *L*-кинуренином. **Б.** Распределение митозов (зеленый сигнал) в линии *35S::WOX5-GR* после 48 часов обработки дексаметазоном без обработки *L*-кинуренином. **В.** Распределение митозов (зеленый сигнал) в контроле после 48 часов обработки *L*-кинуренином. **Г.** Распределение митозов (зеленый сигнал) в линии *35S::WOX5-GR* после 48 часов обработки дексаметазоном и *L*-кинуренином.

В результате проведенного эксперимента было показано почти полное исчезновение пролиферативной активности (исчезновение зеленого сигнала) в дистальной части колумеллы в линии *35S::WOX5-GR* при ингибировании синтеза ауксина в кончике корня под действием *L*-кинуренина, что сопровождалось сохранением структуры колумеллы, то есть в отсутствие синтеза ауксина пул мелких недифференцированных клеток в колумелле не формировался. Эти данные подтверждают предсказание модели о том, что изменения морфологии колумеллы являются следствием *WOX5*-опосредованная активация ТАА1-зависимого синтеза ауксина.

Подтверждение предсказания модели о делении ПЦ в мутантной линии *wox5-1*, было найдено при анализе литературы. Так, в работе Форзани и

соавторов (Forzani et al., 2014) было показано, что в эмбриональных корнях мутантов с потерей функции гена *WOX5* наблюдалось значительное увеличение количества делений ПЦ в сравнении с диким типом. Так у мутантных растений наблюдалось в среднем 1,4 деление на корень, в то время как для растений дикого типа было характерно в среднем 0,013 деления на корень.

3.8. Выводы по главе 3

С помощью методов математического моделирования была показана непротиворечивость и достаточность выдвинутой гипотезы о том, что изменения в паттернах экспрессии белков PIN, уровне экспрессии репортера ауксина DR5::GFP и морфологии колумеллы в линиях Col-1, *wox5-1*, 35S::*WOX5-GR* являются следствием *WOX5*-зависимого изменения синтеза ауксина в апикальной меристеме корня *A. thaliana*, для воспроизведения всех особенностей линий Col-1, *wox5-1*, 35S::*WOX5-GR* (см. раздел 3.1). С помощью гибридной одномерной компьютерной модели было предсказано формирование группы маленьких клеток, морфологически похожих на стволовые клетки в проксимальной части дистальной меристемы трансгенной линии 35S::*WOX5-GR*, находящихся в «покоящемся состоянии», то есть в данной группе клеток не происходит делений. Все предсказания, полученные в моделях, были подтверждены экспериментально.

4. Исследование влияния особенностей строения корневого чехлика на распределения ауксина в меристеме корня *Arabidopsis thaliana* в модели с реалистичным клеточным ансамблем

Несмотря на то, что некоторые процессы, протекающие в АМК в целом и в корневом чехлике в частности, могут быть описаны и исследованы в рамках прямоугольного клеточного ансамбля, как было показано в главах 2 и 3, тем не менее, строение корневого чехлика, а именно БКЧ, и ниши стволовых клеток не может быть полностью отражено в рамках использования прямоугольного клеточного ансамбля. Следовательно, для моделирования и исследования процессов, протекающих в корневом чехлике, обладающим сложной анатомией и большими различиями в размерах и формах клеток, необходимо использовать математические модели, учитывающие анатомическое строение кончика корня.

Несмотря на то, что ранее уже был разработан ряд подобных моделей (Cruz-Ramírez et al., 2012; Cruz-Ramírez et al., 2013; Band et al., 2014; Muraro et al., 2016), ни в одной из них не учитывалось наличие обратных связей между сигнальными путями ауксина и экспрессией его белков переносчиков.

Именно поэтому было решено разработать двумерную математическую модель распределения ауксина в меристеме корня *Arabidopsis thaliana*, учитывающую как морфологию кончика корня, так и ауксин-зависимую регуляцию экспрессии белков переносчиков семейства PIN.

4.1. Получение количественных характеристик строения тканей корня

Клеточный ансамбль портретной модели соответствует реальной структуре продольного среза репрезентативного корня *A. thaliana* (изображение получено с конфокального микроскопа) (Рис. 28). С использованием Matlab Image Processing Toolbox была разработана программа для ЭВМ «Создание двумерных моделей тканей растений (PlantLayout)» для создания структурных компьютерных моделей тканей растений. PlantLayout

позволяет получить количественные и качественные характеристики реалистичного клеточного ансамбля в полуавтоматическом режиме. Программа работает с предобработанным изображением, пример такого изображения представлен на рис. 28. Разработанный скрипт позволяет определить: 1) Размеры каждой клетки (объем и периметр клетки); 2) Размеры каждой клеточной стенки между любыми двумя соседними клетками (длина и ширина); 3) Ориентацию клеточных стенок (1 – верхняя, 2 – нижняя, 3 – правая, 4 – левая) для каждой клетки.

Клетки и клеточные стенки были определены как связные области с использованием функции `bwconncomp` из Matlab Image Processing Toolbox.

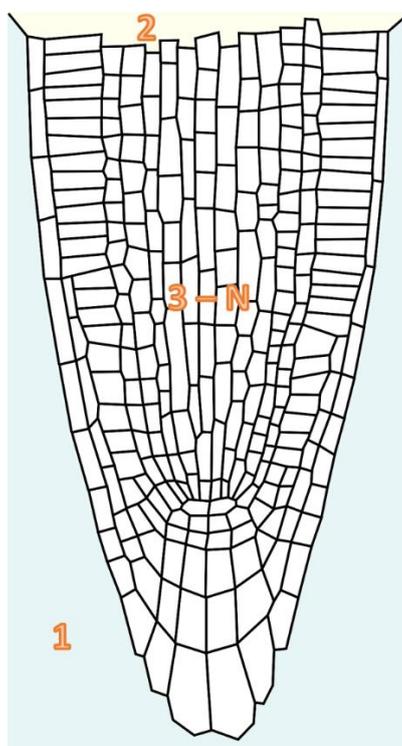


Рис. 28. Предобработанное двумерное изображение кончика корня *A. thaliana* для работы программы PlantLayout.

Клетки ансамбля получают уникальные идентификаторы, индексы от 3 до $N+2$ (N – количество клеток в клеточном ансамбле) и им в автоматическом режиме присваиваются значения характеристик. Индекс 1 закреплен за внешней средой, а индекс 2 закреплен за частью органа/ткани, которая не вошла в моделируемый клеточный ансамбль (Рис. 28). Количественные характеристики клеток представлены в виде вектор-столбцов, где размерность

вектора соответствует $N+2$, а индексы вектора соответствуют уникальным идентификаторам. Количественные и качественные характеристики клеточных стенок представлены матрицами размерности $(N+2) \times (N+2)$, при этом ячейке с номером (i, j) соответствует клеточная стенка между клетками с индексами i и j . Если между клетками с индексами i и j нет клеточной стенки, то есть клетки с индексами i и j не являются соседними, значение ячейки (i, j) полагается равным нулю. В случае количественных характеристик, длина и ширина клеточной стенки $(i, j) = (j, i)$. В случае с матрицей, описывающей ориентацию клеточной стенки $(i, j) \neq (j, i)$. В то время как для клетки i клеточная стенка является нижней (левой), для клетки j та же клеточная стенка будет верхней (правой).

Для определения ориентации клеточных стенок был разработан специальный алгоритм. Для этого вычислялись следующие характеристики для клеток и клеточных стенок, рассматриваемых в качестве связных областей: 1) центр масс (центроид) каждой связной области, 2) минимальный прямоугольник, включающий каждую связную область, 3) ориентация связной области, то есть угол между x -осью и максимальной осью эллипса, эксцентриситет которого, совпадает с эксцентриситетом связной области; и некоторые другие характеристики. Определение ориентации клеточных стенок для каждой клетки: верхняя, нижняя, правая, левая, происходит по следующим правилам:

1. Если \max и \min координаты стенки целиком лежат между центроидами клеток i и j по вертикали/горизонтали значит для клетки i она нижняя/правая, а для клетки j она верхняя/левая (Рис. 29А).

2. Если стенка расположена вертикально (угол с горизонталью $\geq 45^\circ$) и при этом центроид клетки j правее центроида клетки i , то стенка является правой для клетки i и левой для клетки j . Если стенка расположена горизонтально (угол с горизонталью $< 45^\circ$) и при этом центроид одной клетки выше центроида другой клетки, то стенка является нижней для верхней клетки и верхней для нижней клетки (Рис. 29Б).

3. Определение с помощью наименьшего прямоугольника, содержащего область стенки. Стенка между клетками i и j . Если клетка i выше прямоугольника, а клетка j ниже прямоугольника стенка считается нижней для i и верхней для j , аналогично для правой и левой. Если не возникает неоднозначности (одновременного признания стенки верхней/нижней и правой/левой), то ориентация клеточной стенки определена (Рис. 29В).

4. Если по 2 и 3 пункту определены одинаково и однозначно, то ориентация клеточной стенки определена.

5. Если есть неоднозначность ищем общих соседей клеток i и j .

6. Если i и j имеют одинаково ориентированные стенки с клеткой q , то совместная стенка клеток i и j будет перпендикулярна. Правая/левая (верхняя/нижняя) определяется по взаимному расположению центроидов клеток i и j (Рис. 29Г).

7. Если i и j имеют разно ориентированные стенки с клеткой q , то если ориентация совместной стенки клеток i и j (определенная на шаге 2 или 4) совпадает с ориентацией совместной стенки клеток i и q или j и q . То ориентация клеточной стенки определена (Рис. 29Д).

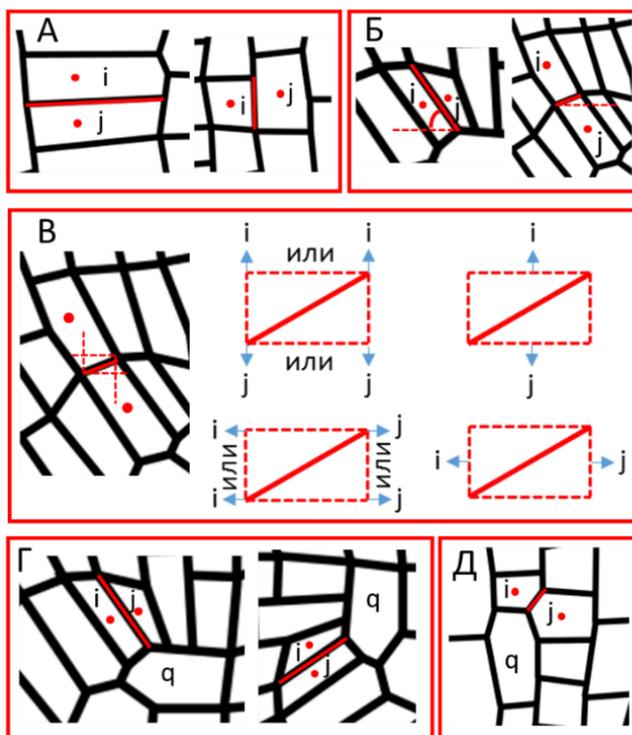


Рис. 29. Визуализация правил определения ориентации клеточных стенок.

С помощью программы «PlantLayout» было создано две структурные компьютерные модели (клеточные ансамбли) реальных кончиков корней *A. thaliana* дикого типа (экотип Col-0) для продольного среза кончика корня: клеточный ансамбль 1: длиной 200 μm и клеточный ансамбль 2: длиной 300 μm (Рис. 30).

Оба клеточных ансамбля отражают анатомическое строение апикальной меристемы корня *A. thaliana* в норме. Граница клеточных ансамблей проходила по границе апикальной меристемы корня. Использование двух различных клеточных ансамблей позволит исследовать индивидуальные особенности в распределении ауксина у растений дикого типа.

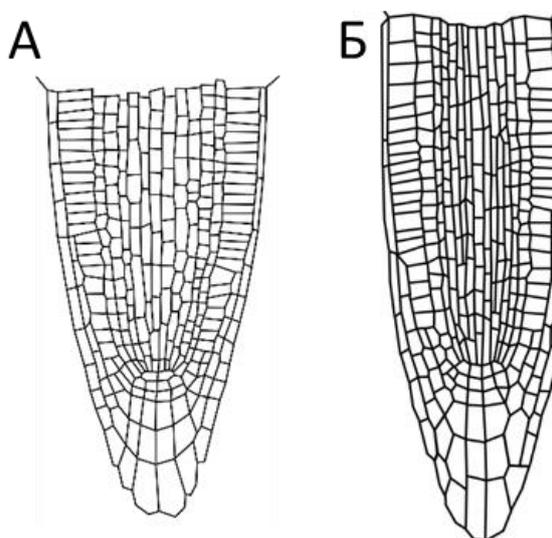


Рис. 30. Схемы кончиков корней *A. thaliana* (Col-0), используемые для создания структурных моделей. **А.** Структура клеточного ансамбля 1, длиной 200 μm . **Б.** Структура клеточного ансамбля 2, длиной 300 μm .

На основании этих клеточных ансамблей продольного среза кончика корня *A. thaliana* были разработаны компьютерные математические модели распределения ауксина с пятью белками переносчиками семейства PIN (PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7).

4.2. Описание портретной математической модели корня *Arabidopsis thaliana*

Математическая модель с тремя обобщенными PIN белками и прямоугольным клеточным ансамблем, описанная в разделе 2.2 была взята за

основу при разработке новой математической модели, учитывающей реалистичную структуру клеточного ансамбля, с учетом площадей клеток и наличия у клеток различного числа соседей. А также в модели было задано пять белков семейства PIN, вместо трех обобщенных белков, заданных в модели с прямоугольным клеточным ансамблем (см. раздел 2.2).

4.2.1. Элементарные процессы, рассмотренные в портретной математической модели

В модели рассматриваются все пять белков-переносчиков ауксина семейства PIN: PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 (Рис. 31).

- PIN2 экспрессируется только в клетках, соответствующих кортексу и эпидермису, при этом в кортексе PIN2 локализуется на мембране клетки, обращенной к кончику корня, а в эпидермисе на мембране, обращенной к побегу, и в обеих тканях на внутренней мембране, обращенной к центральной оси корня. Причем на внутренней мембране локализовано только 20 % от всего PIN2 вырабатываемого в клетке.
- PIN1 экспрессируется в клетках, соответствующих эндодермису, перициклу и сосудистому цилиндру, с локализацией по направлению к кончику корня во всех тканях и на внутренних мембранах клетки в клетках перицикла и эндодермиса, на внутренних мембранах локализовано только 20 % от всего PIN1 вырабатываемого в клетке.
- PIN4 экспрессируются во всех тканях корня, а PIN3 и PIN7 во всех тканях за исключением эпидермиса и кортекса. Причем, в случае экспрессии в клетке совместно с PIN1, локализация на мембранах совпадает с таковой для PIN1, аналогично при экспрессии совместно с PIN2. При этом, остальные клетки экспрессирующие PIN3, PIN4, PIN7 являются неполярными, то есть белки PIN равномерно по всем мембранам клеток, за исключением тех мембран, которые граничат с окружающей средой.

Элементарные процессы, рассматриваемые в портретной модели, полностью аналогичны таковым для прямоугольной модели.

4.2.2. Уравнения портретной математической модели

Математическая модель была описана в терминах дифференциальных уравнений, описывающих скорости изменения концентраций ауксина и пяти белков транспортеров в каждой клетке клеточного ансамбля, всего более 1500 переменных и 37 параметров модели (Таблица 7). Экспрессия белков транспортеров ауксина семейства PIN зависела от концентрации ауксина и была описана с помощью обобщенных функций Хилла (см. раздел 1.8.2). Уравнения портретной математической модели были разработаны на основании двумерной математической модели с прямоугольным клеточным ансамблем (уравнения 14-25) с учетом разницы в размерах клеток (уравнение 32) и распределения потоков ауксина, представленного на Рис. 31 (уравнения 39-43). Так для белков PIN1, PIN2, PIN3, PIN7 были введены ауксин-зависимый синтез и ауксин-зависимая деградация, в то время как для белка PIN4 был задан только ауксин-зависимый синтез.

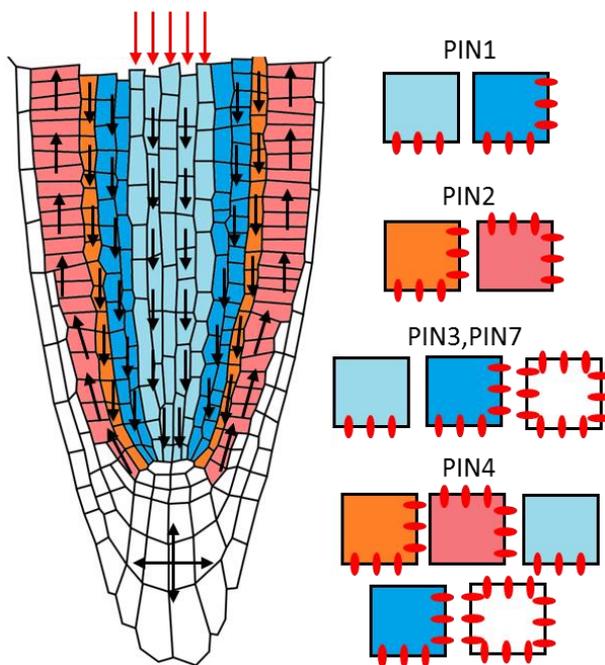


Рис. 31. Потоки ауксина в клеточном ансамбле математической модели с реалистичным клеточным ансамблем. Черными стрелками обозначены потоки активного транспорта ауксина с помощью белков семейства PIN. Красными стрелками обозначен поток ауксина из верхней части растения. Разные типы клеток по полярности и характеру экспрессии белков семейства PIN обозначены разным цветом. Красными метками обозначена локализация PIN белков на мембране клеток.

Система дифференциальных уравнений портретной модели для концентраций каждого вещества $[a]_i$, $[PIN1]_i$, $[PIN2]_i$, $[PIN3]_i$, $[PIN4]_i$, $[PIN7]_i$ в каждой клетке клеточного ансамбля выглядит следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{d[PIN1]_i}{dt} = (F_{s,PIN1}([a]_i) - F_{d,PIN1}([a]_i) \times [PIN1]_i) \frac{1}{V_i} \\ \frac{d[PIN2]_i}{dt} = (F_{s,PIN2}([a]_i) - F_{d,PIN2}([a]_i) \times [PIN2]_i) \frac{1}{V_i} \\ \frac{d[PIN3]_i}{dt} = (F_{s,PIN3}([a]_i) - F_{d,PIN3}([a]_i) \times [PIN3]_i) \frac{1}{V_i} \\ \frac{d[PIN4]_i}{dt} = (F_{s,PIN4}([a]_i) - F_{d,PIN4} \times [PIN4]_i) \frac{1}{V_i} \\ \frac{d[PIN7]_i}{dt} = (F_{s,PIN7}([a]_i) - F_{d,PIN7}([a]_i) \times [PIN7]_i) \frac{1}{V_i} \\ \frac{d[a]_i}{dt} = (k_\alpha * p_i + K_{s,a}(i) - K_{d,a}[a]_i + D \times \sum_{m \in N_i} ([a]_m - [a]_i) l_{i,m}) + \sum_{x \in P} J_x(i) \end{cases} \frac{1}{V_i} \quad , (39)$$

где k_α описывает поток ауксина из зоны растяжения; p_i – доля потока ауксина из зоны растяжения, приходящаяся на клетку i ; $K_{s,a}(i)$ – константа скорости синтеза ауксина; $K_{d,a}$ – константа скорости деградации ауксина; D – константа скорости пассивного транспорта; N_i – множество соседних клеток для клетки i ; $J_x(i)$ – потоки ауксина, регулируемые транспортерами x , где $x \in \{PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7\}$; $F_{s,x}$ – скорость ауксин-зависимого синтеза белков x ; $F_{d,x}$ – скорость деградации белков x ; V_i – объем клетки i клеточного ансамбля (в случае двумерной модели – площадь сечения клетки); $l_{i,m}$ – длина клеточной стенки между клетками i и m .

В математической модели решено было учитывать только ТАА1-зависимый синтез ауксина, то есть синтез ауксина присутствовал лишь в клетках ПЦ и ИК (таблица 7).

В то же время поток ауксина из зоны растяжения характерен только для верхних клеток сосудистого цилиндра, соседствующих с ячейкой 2 в структуре клеточного ансамбля, то есть для клеток сосудистого цилиндра:

$$p_i = \frac{l_{i,2}}{\sum_j l_{j,2}} \quad (40)$$

где $l_{i,2}$ – длина клеточной стенки клетки i сосудистого цилиндра, граничащей с ячейкой 2 (верхней частью корня, не вошедшей в модель), $\sum_j l_{j,2}$ – сумма всех стенок клеток сосудистого цилиндра, граничащих с ячейкой 2.

В то же время, для клеток, не принадлежащих к сосудистому цилиндру, $p_i=0$.

Функции $F_{s,x}$, $F_{d,x}$ аналогичны таковым для математической модели распределения ауксина с прямоугольным клеточным ансамблем:

$$F_{s,x}([a]_i) = K_{s,x} \frac{\left(\frac{[a]_i}{q_{1,x}}\right)^{s_x}}{1 + \left(\frac{[a]_i}{q_{2,x}}\right)^{s_x}}, \quad x = PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7, \quad (41)$$

$$F_{d,x}([a]_i) = \begin{cases} K_{d,x} \left(1 + \left(\frac{[a]_i}{q_{3,x}}\right)^{h_x}\right), & x = PIN1, PIN2, PIN3, PIN7 \\ K_{d,x}, & x = PIN4 \end{cases}, \quad (42)$$

где $K_{s,x}$ описывает константу скорости синтеза для белка $x = PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7$; $q_{1,x}$ – порог активации ауксин-зависимого синтеза белка x ; $q_{2,x}$ – порог насыщения ауксин-зависимого синтеза белка x ; s_x – коэффициент Хилла, который определяет степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина $[a]_i$ на скорость синтеза белка x ; $K_{d,x}$ – константа скорости деградации белка x ; $q_{3,x}$ – порог активации ауксин-зависимой деградации белка x ; h_x – коэффициент, который определяет нелинейность ауксин-зависимого ингибирования белка x .

Важно отметить, что в модели рассматривается только дистальный домен экспрессии белков PIN3, PIN7 и игнорируется наличие проксимального домена экспрессии, поскольку он полностью перекрываются с доменом экспрессии белка PIN1, и полярность клеток внутри данного домена совпадает для всех рассматриваемых PIN белков (PIN1, PIN3, PIN7).

Функции J_x определяются распределением потоков ауксина (Рис. 31). В общем виде функцию J_x можно описать:

$$J_x(i) = \sum_{m \in N_i} (k_{m,i}^x [a]_m [x]_m - k_{i,m}^x [a]_i [x]_i), \quad (43)$$

где N_i – множество соседних клеток для клетки i ; $k_{m,i}^x$ – константа, отражающая долю белка x , расположенного на мембране клетки m , граничащей с клеткой i , от общего содержания белка x в клетке m ; $k_{i,m}^x$ – константа, отражающая долю белка x , расположенного на мембране клетки i ,

граничащей с клеткой m , от общего содержания белка x в клетке i ; $x \in \{PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7\}$.

Для клеток, в которых существует боковой поток ауксина (перицикл, эндодермис, кортекс и эпидермис), было принято считать, что на боковую поверхность клетки приходится 20% всех белков одного типа в клетке. А в случае неполярного транспорта (ПЦ и корневой чехлик), белки, синтезируемые в клетке, распределяются пропорционально по всей длине клеточных стенок.

Такие параметры, как V_i , $l_{i,j}$, $k_{i,j}^{PIN1}$, $k_{i,j}^{PIN2}$, $k_{i,j}^{PIN3}$, $k_{i,j}^{PIN4}$, $k_{i,j}^{PIN7}$, p_i , определялись на основании структурных моделей для каждого клеточного ансамбля в отдельности.

Для расчета двумерной математической модели с реалистичным клеточным ансамблем использовался интегратор дифференциальных уравнений *ode15s*, расчеты проводились в программе MATLAB.

4.3. Подбор параметров портретной модели с пятью PIN транспортерами

Ранее в нашей группе в Институте Цитологии и Генетики в рамках диссертационной работы Коврижных В. В. была сформулирована гипотеза о концентрационно-зависимой регуляции ауксином белков транспортеров ауксина семейства PIN (Рис. 32) и показана ее непротиворечивость (Коврижных, 2016).

Согласно этой гипотезе PIN1 максимально экспрессируется при промежуточных концентрациях ауксина. Экспрессия PIN2 начинается при самых низких концентрациях и снижается при промежуточных. Белки PIN3, PIN4, PIN7 предположительно реагируют как на низкие, так и на высокие уровни ауксина, следующим образом: снижение концентрации от промежуточной до низкой последовательно активирует гены PIN7, PIN4, PIN3, а повышение от промежуточной до наибольшей концентрации приводит также последовательно к экспрессии PIN7, PIN3, PIN4.

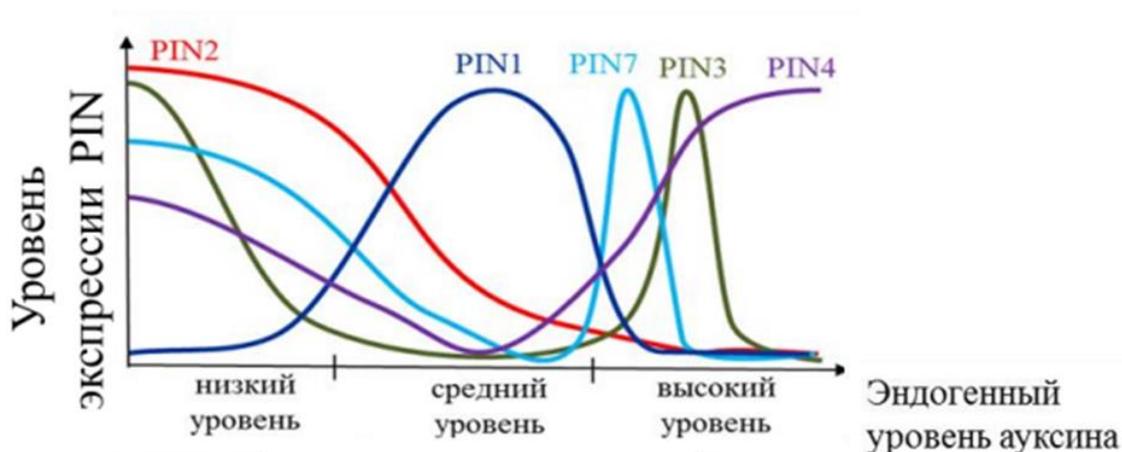


Рис. 32. Уровень экспрессии PIN белков в зависимости от концентрации эндогенного ауксина согласно гипотезе о концентрационно-зависимой регуляции ауксином экспрессии PIN белков (Адаптировано из Коврижных, 2016).

Поскольку мы не рассматривали в модели проксимальный домен экспрессии белков PIN7, PIN3, а область, в которой PIN4 экспрессируется при низких концентрациях ауксина, находится за пределами используемых клеточных ансамблей, то для подбора параметров модели мы ориентировались на правую часть кривых для белков PIN3, PIN4, PIN7, считая, что при низких концентрациях ауксина белки PIN3, PIN4, PIN7 не экспрессируются.

Для описания регуляции ауксин-зависимой экспрессии PIN белков и подбора параметров мы опирались на описанную гипотезу. Для удобства мы приняли за условную единицу максимально возможный уровень экспрессии для всех PIN белков (PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7).

Подбор параметров ауксин-зависимой экспрессии белков PIN осуществлялся в два этапа. За низкий уровень ауксина были приняты значения меньше 0,3 μM , за высокий – значения больше 0,7 μM . На первом этапе для каждого PIN в отдельности были отобраны наборы параметров, при которых кривые ауксин-зависимой экспрессии PIN белка в стационарном состоянии, описанные уравнением (44), удовлетворяли следующим условиям: максимальное значение экспрессии находится в промежутке [0,95; 1,05], и максимум экспрессии для PIN2 достигается при низкой концентрации ауксина, для PIN1 – при средней, а для PIN3, PIN4, PIN7 – при высокой. Выбор

наборов параметров проводился полным перебором по параметрам q_1, q_2, q_3 в интервале $[0,01; 2]$ с постоянным шагом 0,01.

$$x = \frac{F_{s,x}([a]_i)}{F_{d,x}([a]_i)}, \quad x = PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 \quad (44)$$

На втором этапе полученные наборы параметров для пяти PIN белков были использованы для расчетов численного решения системы дифференциальных уравнений (39) в различных комбинациях. Паттерны распределения ауксина и экспрессии PIN белков, полученные в стационарных решениях с различными комбинациями наборов параметров сравнивались с экспериментальными данными. В результате подбора параметров модели нам удалось получить распределения концентрации ауксина и белков семейства PIN, которые хорошо согласуются с экспериментальными данными (Рис. 34).

На рис. 33 Представлены графики экспрессии белков PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 в зависимости от внутриклеточной концентрации ауксина в модели с реалистичным клеточным ансамблем с подобранным набором параметров (Таблица 7).

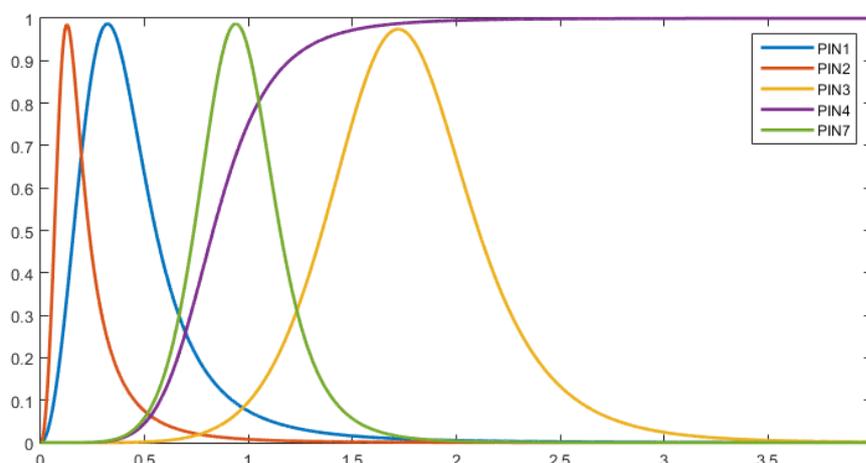


Рис. 33. График концентрационно-зависимой экспрессии белков PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 в модели с реалистичным клеточным ансамблем относительно уровня ауксина в клетке.

Таблица 7. Значения параметров, использованные в модели с реалистичным клеточным ансамблем для расчета. mu – единицы массы, cu – единицы концентрации, tu – единицы времени, vu – единицы объема, lu – единицы длины, dl – безразмерный параметр.

| Название параметра | Символ | Единицы измерения | Значение |
|---|--------------|-------------------|----------|
| Интенсивность поток ауксина из зоны растяжения | k_a | mu/tu | 1,15/1* |
| Константа скорости деградации белка PIN1 | $K_{d,PIN1}$ | vu/tu | 1000 |
| Константа скорости деградации белка PIN2 | $K_{d,PIN2}$ | vu/tu | 1000 |
| Константа скорости деградации белка PIN3 | $K_{d,PIN3}$ | vu/tu | 1000 |
| Константа скорости деградации белка PIN4 | $K_{d,PIN4}$ | vu/tu | 1000 |
| Константа скорости деградации белка PIN7 | $K_{d,PIN7}$ | vu/tu | 1000 |
| Константа скорости деградации ауксина | $K_{d,a}$ | vu/tu | 0,005 |
| Константа скорости синтеза белка PIN1 | $K_{s,PIN1}$ | mu/tu | 1000 |
| Константа скорости синтеза белка PIN2 | $K_{s,PIN2}$ | mu/tu | 1000 |
| Константа скорости синтеза белка PIN3 | $K_{s,PIN3}$ | mu/tu | 1000 |
| Константа скорости синтеза белка PIN4 | $K_{s,PIN4}$ | mu/tu | 1000 |
| Константа скорости синтеза белка PIN7 | $K_{s,PIN7}$ | mu/tu | 1000 |
| Константа скорости синтеза ауксина | $K_{s,a}$ | mu/tu | 0,01/0** |
| Константа скорости пассивного транспорта ауксина | D | lu/tu | 0,08 |
| Порог активации ауксин-зависимого синтеза белка PIN1 | $q_{1,PIN1}$ | $1/cu$ | 0,2 |
| Порог насыщения ауксин-зависимого синтеза белка PIN1 | $q_{2,PIN1}$ | $1/cu$ | 0,33 |
| Порог активации ауксин-зависимой деградации белка PIN1 | $q_{3,PIN1}$ | $1/cu$ | 0,42 |
| Коэффициент Хилла, определяющий степень нелинейности воздействия концентрации внутриклеточного ауксина на скорость синтеза белка PIN1 | $SPIN1$ | dl | 2 |
| Коэффициент, который определяет нелинейность ауксин-зависимого ингибирования белка PIN1 | h_{PIN1} | dl | 4 |
| Параметры ауксин-зависимых синтеза и деградации белка PIN2 | $q_{1,PIN2}$ | $1/cu$ | 0,09 |
| | $q_{2,PIN2}$ | $1/cu$ | 0,53 |
| | $q_{3,PIN2}$ | $1/cu$ | 0,13 |
| | $SPIN2$ | dl | 2 |
| | h_{PIN2} | dl | 4 |
| Параметры ауксин-зависимых синтеза и деградации белка PIN3 | $q_{1,PIN3}$ | $1/cu$ | 1,47 |
| | $q_{2,PIN3}$ | $1/cu$ | 1,82 |
| | $q_{3,PIN3}$ | $1/cu$ | 1,83 |
| | $SPIN3$ | dl | 6 |
| | h_{PIN3} | dl | 10 |
| Параметры ауксин-зависимого синтеза белка PIN4 | $q_{1,PIN4}$ | $1/cu$ | 0,83 |
| | $q_{2,PIN4}$ | $1/cu$ | 0,83 |
| | $SPIN4$ | dl | 6 |
| Параметры ауксин-зависимых синтеза и деградации белка PIN7 | $q_{1,PIN7}$ | $1/cu$ | 0,8 |
| | $q_{2,PIN7}$ | $1/cu$ | 0,99 |
| | $q_{3,PIN7}$ | $1/cu$ | 1 |
| | $SPIN7$ | dl | 6 |
| | h_{PIN7} | dl | 10 |

* клеточный ансамбль № 1 / клеточный ансамбль № 2

** для клеток ПЦ и ИК / для остальных клеток

4.4. Результаты моделирования распределения ауксина и экспрессии белков PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7

Была разработана компьютерная математическая модель распределения ауксина с пятью белками переносчиками семейства PIN (PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7). На рис. 34 представлены стационарные решения модели для двух клеточных ансамблей (№1 и №2), полученных на основании структурных моделей двух индивидуальных кончиков корней *A. thaliana* дикого типа (линия Col-0), в сравнении с экспериментально наблюдаемыми паттернами экспрессии белков PIN и репортера ауксина DR5::*GFP*.

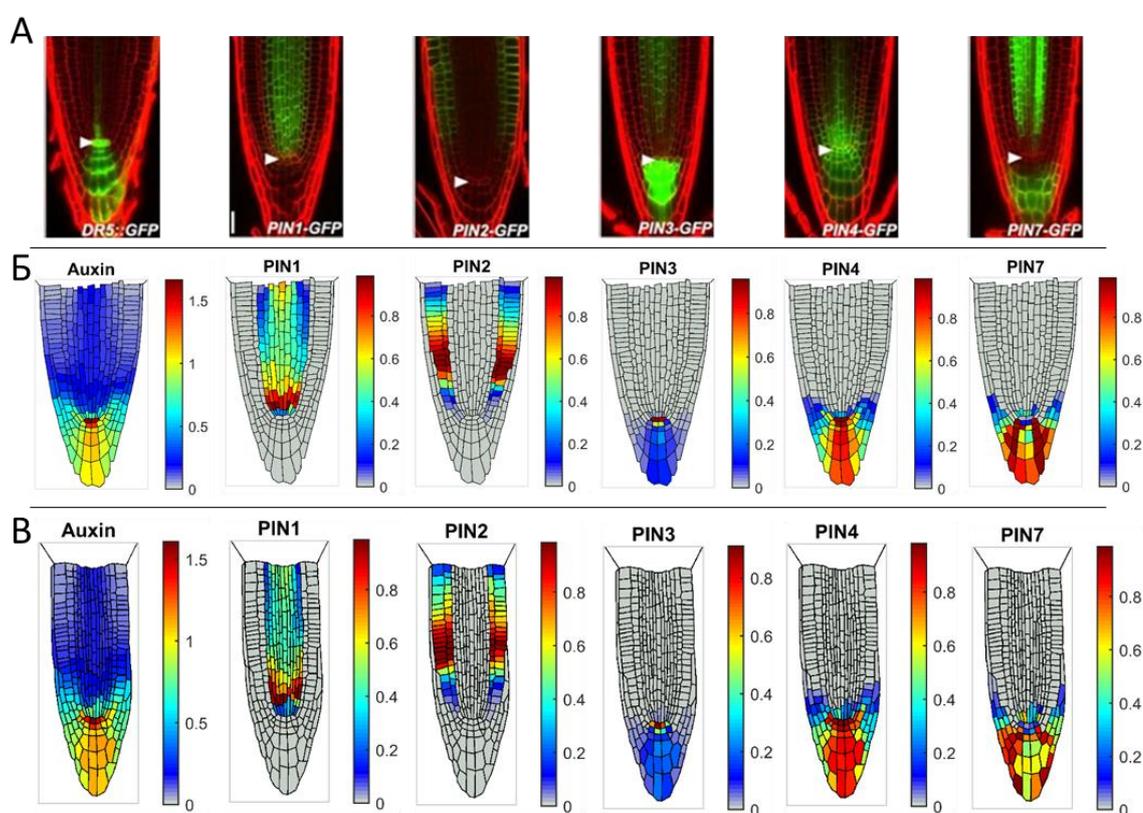


Рис. 34. Сравнение результатов моделирования для двух различных клеточных ансамблей с экспериментальными данными. **А.** Экспрессия репортёрных генов *DR5::GFP*, *PIN1-GFP*, *PIN2-GFP*, *PIN3-GFP*, *PIN4-GFP*, *PIN7-GFP* в нормальных условиях представлена зеленым цветом (Hong et al., 2017), красным флуоресцентным красителем окрашены клеточные стенки; **Б.** Стационарное решение модели для клеточного ансамбля № 1; **В.** Стационарное решение модели для клеточного ансамбля № 2.

Важным преимуществом разработанной математической модели служит формирование в стационарных решениях модели явно выраженных градиентов в распределении ауксина и белков семейства PIN (Рис. 34Б,В).

Присутствие подобных градиентов отчетливо заметно на экспериментальных изображениях с репортером ауксина R2D2 (Liao et al., 2015). Ранее в Институте Цитологии и генетики в рамках диссертационной работы Коврижных В. В. на основании комплексного анализа экспрессии ауксин-чувствительных репортерных конструкций: DR5, DII::VENUS, R2D2 и данных масс-спектрометрии была составлена интегральная схема распределения ауксина (Рис. 35Е), а также интегральные схемы паттернов экспрессии белков транспортеров семейства PIN (Рис. 35А-Д) (Коврижных, 2016).

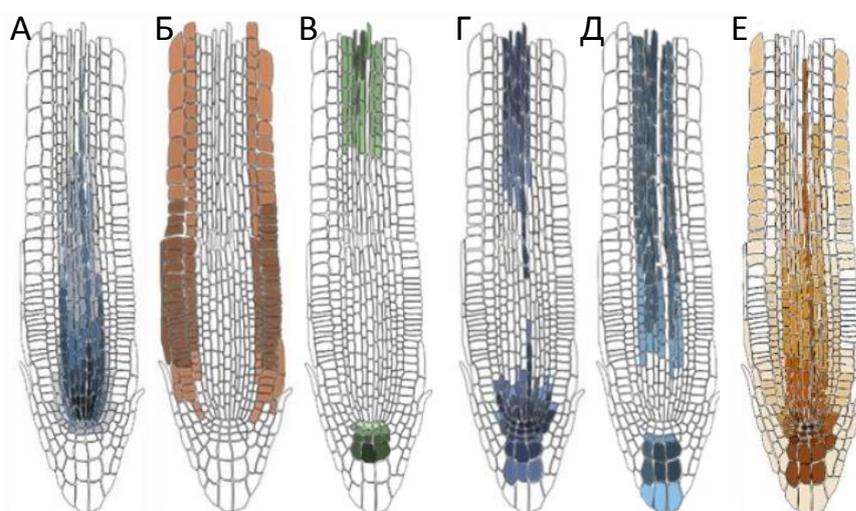


Рис. 35. Градиенты распределения ауксина и белков транспортеров ауксина семейства PIN. А. Паттерн экспрессии PIN1. Б. Паттерн экспрессии PIN2. В. Паттерн экспрессии PIN3. Г. Паттерн экспрессии PIN4. Д. Паттерн экспрессии PIN7. Е. Распределение ауксина. Интенсивность цвета прямо пропорциональна содержанию ауксина (Е) и уровню экспрессии белков PIN (А-Д) (Адаптировано из Коврижных, 2016).

Однако в математических моделях, разработанных ранее как в нашей группе (Mironova et al., 2012; Hong et al., 2017), так и другими исследователями (Grieniesen et al., 2007; Cruz-Ramírez et al., 2013), наличие подобных градиентов для ауксина, особенно в проксимальной меристеме, удавалось показать только с использованием логарифмической шкалы. Что же касается распределения белков семейства PIN, их экспрессия либо не моделировалась вовсе (Grieniesen et al., 2007; Cruz-Ramírez et al., 2013; Band et al., 2014; Muraro

et al., 2016), либо в модели рассматривались обобщенные белки (Глава 2, Mironova et al., 2012).

Также стоит отметить, что максимальная расчетная концентрация ауксина (что соответствует клеткам ПЦ) в стационарном решении модели с реалистичным клеточным ансамблем всего в 10 раз превышает среднюю концентрацию ауксина в клетках проксимальной меристемы, что гораздо лучше соотносится с количественными экспериментальными данными, по которым оценка того же параметра составляет около 4,5-5 раз (Petersson et al., 2009). Для сравнения в модели с прямоугольным клеточным ансамблем, описанной в главе 2, максимальная расчетная концентрация ауксина в 30 раз превышает среднее значение концентрации в клетках, соответствующих проксимальной меристеме. А в моделях группы под руководством Гринайсен подобный параметр превышает 100 раз (Grieniesen et al., 2007; Cruz-Ramírez et al., 2013).

Таким образом, разработанная математическая модель наиболее корректно описывает формирование паттернов распределения ауксина и экспрессии белков семейства PIN в сравнении с аналогами.

Стоит отметить, что в стационарном решении модели существует право-левая асимметрия в распределении белка PIN2 в меристеме корня относительно центральной оси (Рис. 34Б,В). Причем асимметрия в распределении белка PIN2 хорошо соотносится с асимметрией строения БКЧ: максимум экспрессии белка PIN2 совпадает с границами второго слоя БКЧ для клеточного ансамбля № 1, а для клеточного ансамбля № 2 концентрация PIN2 в эпидермисе выше с той стороны, которая полностью прикрыта слоем клеток БКЧ (слева), по сравнению с другой стороной, где БКЧ заканчивается по середине клеточного ансамбля.

Подобная асимметрия в распределении белка PIN2 приводит к формированию право-левой асимметрии в распределении ауксина. Известно, что ауксин оказывает концентрационно-зависимое влияние на частоту деления и скорость роста клеток, следовательно, асимметричное распределение

ауксина может служить объяснением волнообразного характера роста корня *A. thaliana* (Osmont et al., 2007; Vaughn, Masson, 2011), то есть в процессе роста корень незначительно изгибается сначала в одну сторону, затем в другую (Рис. 36). В том числе в модели наблюдается право-левая асимметрия в распределении ауксина на выходе из меристемы, что также может объяснять асимметричный характер закладки боковых корней (Рис. 36А) (Osmont et al., 2007; Dubrovsky et al., 2008). Известно, что для закладки боковых корней необходимо формирование локального максимума концентрации ауксина в перицикле в зоне растяжения (Blilou et al., 2005; de Smet et al., 2007). В случае наблюдаемой в модели асимметрии в распределении ауксина на выходе из меристемы, необходимый локальный максимум концентрации ауксина, должен сформироваться раньше с той стороны, где наблюдается повышенная концентрация ауксина. Процессы волнообразного роста главного корня и закладки боковых корней в таком случае должны быть согласованы между собой, что и наблюдается в эксперименте (Рис. 36).

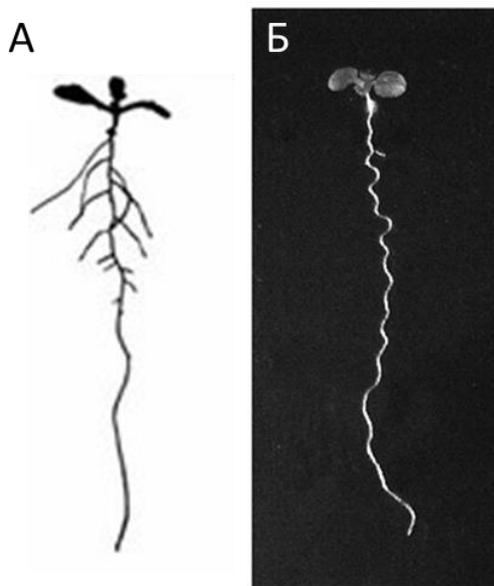


Рис. 36. Морфология корня *Arabidopsis thaliana*. **А.** Изображения взято из статьи Osmont et al., 2007; **Б.** Изображения взято из статьи Vaughn and Masson, 2011.

Результаты моделирования показывают, что для формирования наблюдаемой в эксперименте асимметрии в распределении ауксина и

экспрессии белка PIN2 достаточно естественной асимметрии в анатомическом строении корня.

Чтобы показать роль, естественно возникающей в ходе развития, асимметрии в анатомическом строении корня в формировании асимметрии паттерна экспрессии PIN2 был разработан третий, абсолютно симметричный клеточный ансамбль. Новый клеточный ансамбль был получен путем зеркального отражения правой половины клеточного ансамбля №1. Для расчетов модели был использован набор параметров для клеточного ансамбля №1 (Таблица 7). Результаты моделирования, представленные на рис. 37, показывают, что в случае с абсолютно симметричным клеточным ансамблем, описанной выше асимметрии не возникает.

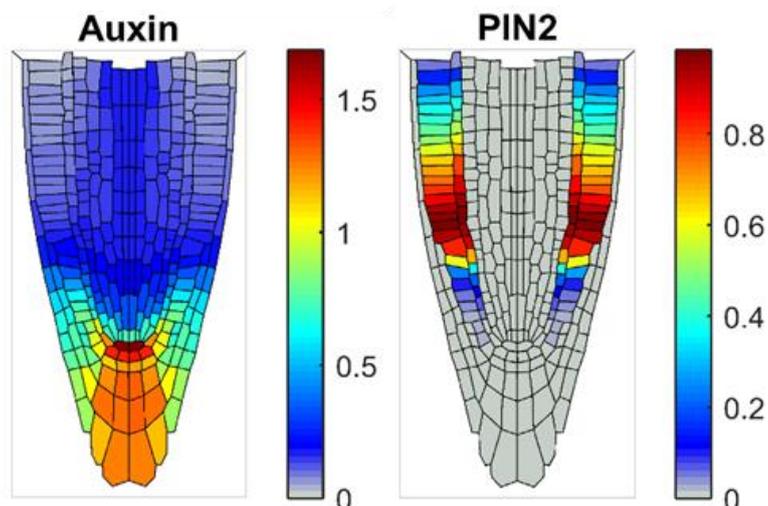


Рис. 37. Распределение ауксина и белка PIN2 в абсолютно симметричном клеточном ансамбле.

Право-левая асимметрия в распределении ауксина характерна также для инициалей всех основных тканей корня в стационарном решении модели для обоих клеточных ансамблей (№ 1 и № 2) (Рис. 34, 38.). На диаграмме видно, что инициали разных типов различаются по концентрации в них ауксина. Что позволяет нам предположить, что деления разных типов инициалей в таком ансамбле будут происходить с различной частотой. Что подтверждается данными полученными Рахни и Бернбаумом в 2018 году в ходе непрерывного наблюдения за ростом и делением клеток в апикальной меристеме корня *A. thaliana* в течение недели (Rahni and Birnbaum, 2018).

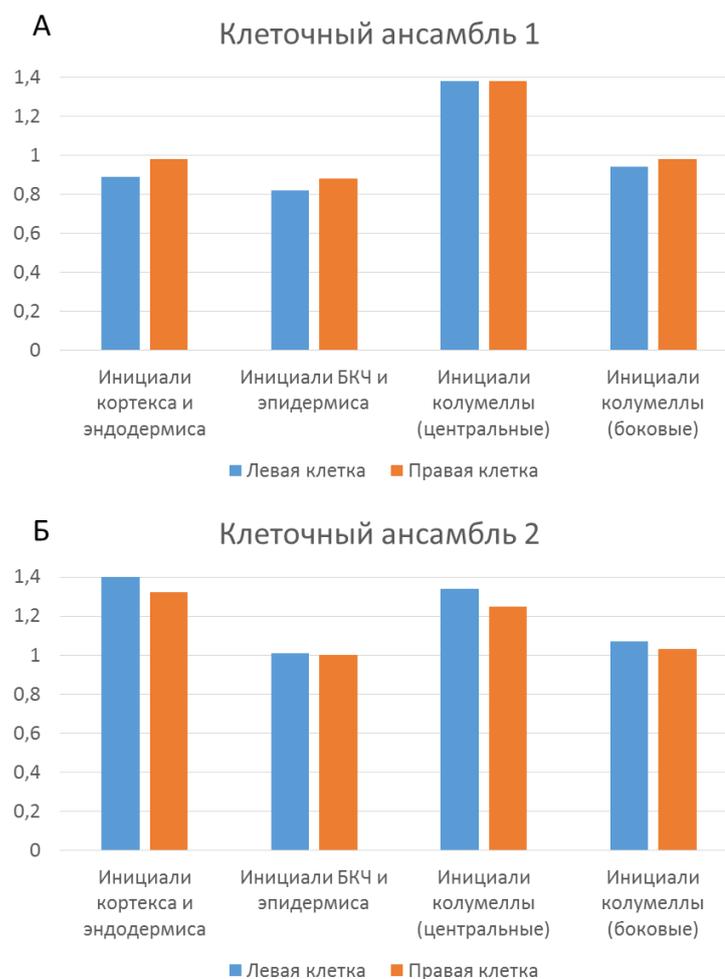


Рис. 38. Концентрация ауксина в нише стволовых клеток, предсказанная с помощью двумерной математической модели распределения ауксина с реалистичным клеточным ансамблем. **А.** Клеточный ансамбль № 1. **Б.** Клеточный ансамбль № 2.

При этом для инициалей одного типа, расположенных на противоположных полюсах относительно ПЦ также наблюдаются различия в содержании ауксина в модели (Рис. 38). Это говорит о том, что деления инициалей одного типа, например инициалы кортекса и эндодермиса, могут происходить неодновременно. Действительно на изображениях, полученных экспериментально в лаборатории проф. Чен Ксу из Национального Университета Сингапура, мы можем наблюдать право-левую асимметрию делений инициалей одного типа (Рис. 39Б-Г)

Центральные ИК в стационарном решении модели значительно отличаются по концентрации в них ауксина от боковых ИК (Рис. 38), следовательно, мы можем предположить, что одна пара инициалей может

поделиться раньше, чем другая. Что также подтверждается при анализе экспериментальных данных (Рис. 39А).

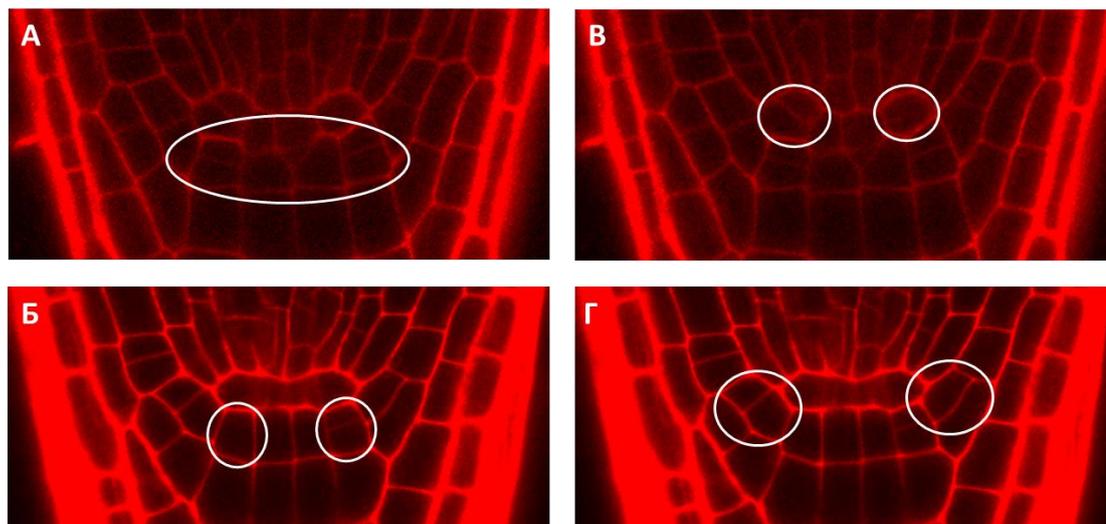


Рис. 39. Асимметрия деления инициалей в апикальной меристеме корня *A. thaliana*. Экспериментальные данные из лаборатории проф. Чен Ксу из Национального Университета Сингапура. **А.** Асимметрия делений центральных и боковых ИК. **Б.** Право-левая асимметрия делений ИК. **В.** Право-левая асимметрия делений инициалей кортекса и эндодермиса. **Г.** Право-левая асимметрия делений инициалей БКЧ и эпидермиса.

Стоит отметить, что характер распределения ауксина (формирование максимума в ПЦ и общая структура формируемых градиентов) и экспрессии PIN белков сохранялись независимо от используемого клеточного ансамбля, однако существуют индивидуальные различия. Так, например, можно заметить, что для двух клеточных ансамблей соотношение концентраций ауксина в инициалах кортекса и эндодермиса по сравнению с ИК различно (Рис. 38). Для клеточного ансамбля № 1 концентрация ауксина в инициалах кортекса и эндодермиса находится на уровне концентрации ауксина в боковых ИК, в то время как для клеточного ансамбля № 2 – на уровне концентрации ауксина в центральных ИК. Формирование подобных отличий в распределении ауксина является прямым следствием наличия индивидуальных особенностей строения апикальной меристемы корня и ниши стволовых клеток в частности (Рис. 30).

В заключение важно сказать, что использование разработанной математической модели с различными клеточными ансамблями может быть

полезно в будущем при анализе индивидуальных различий у растений как дикого типа, так и мутантных растений, с выраженными нарушениями в морфологии корня.

4.5. Варьирование по параметрам двумерной модели распределения ауксина с реалистичным клеточным ансамблем

Для определения устойчивости решения модели к изменению уровня ауксина был проведен анализ поведения модели при варьировании параметров модели, отвечающих за поступление ауксина в систему. Варьирование параметров модели проводилось для варианта модели с использованием клеточного ансамбля № 1.

В результате варьирования параметров k_α , описывающего интенсивность потока ауксина из зоны растяжения корня, в физиологических пределах от 0,5 до 5 и $K_{s,a}$, константы скорости синтеза ауксина, в физиологических пределах от 0 до 0,1 была показана стабильность формируемого паттерна распределения ауксина.

Распределение таких белков, как PIN1, PIN2, PIN4 также качественно не изменялось при варьировании k_α в пределах от 1 до 1,5. Варьирование k_α в пределах 1,5 – 5, как и прежде, практически не сказывалось на характере формируемого паттерна распределения PIN1, однако приводило к сокращению домена экспрессии PIN2, с одновременным расширением домена экспрессии PIN4 в модели. При варьировании параметра k_α в пределах 0,5 – 1 наблюдалось обратное, то есть сокращение домена экспрессии PIN4 и расширение домена экспрессии PIN2, с сохранением характера распределения ауксина и PIN1.

Важно отметить, что при варьировании k_α в описанных пределах стабильно сохранялась асимметрия распределения PIN2 в модели.

Аналогичное поведение модели было получено в результате варьирования константы скорости синтеза ауксина $K_{s,a}$, при значениях константы $K_{s,a} < 0,005$ наблюдалось значительное сокращение домена экспрессии PIN4 и значительное расширение домена экспрессии PIN2. При

$K_{s,a} > 0,05$, наоборот, домен экспрессии PIN4 был расширен, в то время, как домен экспрессии PIN2 сокращался.

Несмотря на изменение размеров домена экспрессии характер распределения белков PIN2 и PIN4 оставался неизменным.

С другой стороны, распределение белков PIN3 и PIN7 в модели оказалось крайне чувствительно к изменению рассмотренных параметров модели k_α и $K_{s,a}$ (Рис. 40), в отличие от белков PIN1, PIN2, PIN4.

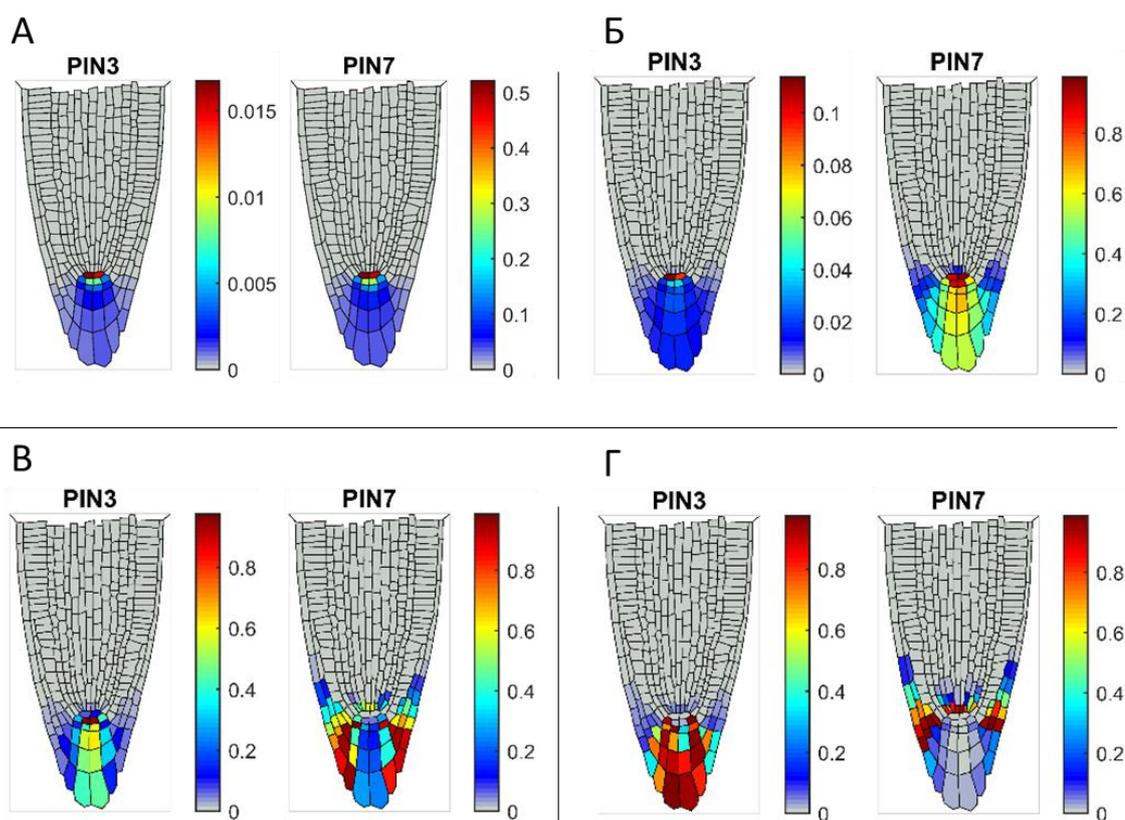


Рис. 40. Паттерны экспрессии белков PIN3 и PIN7 при варьировании параметра k_α в двумерной модели распределения ауксина с реалистичным клеточным ансамблем № 1. **А.** Стационарное решение модели для PIN3 и PIN7 при $k_\alpha = 0,75$. **Б.** $k_\alpha = 0,95$. **В.** $k_\alpha = 1,25$. **Г.** $k_\alpha = 1,55$.

Так при уменьшении параметров k_α и $K_{s,a}$ мы наблюдали наибольший уровень экспрессии белка PIN7 в модели в клетках ИК и ПЦ (Рис. 40А,Б), что не соответствует экспериментально наблюдаемым доменам экспрессии (Рис. 34А). В то же время при увеличении параметров k_α и $K_{s,a}$ мы наблюдали наибольший уровень экспрессии PIN7 в клетках БКЧ и инициалах сосудистого цилиндра (Рис. 40В,Г). Для белка PIN3 при увеличении параметров k_α и $K_{s,a}$ мы

наблюдали появление PIN3 в последних ДКК (Рис. 40В,Г), в то время как уменьшение параметров k_a и $K_{s,a}$ не приводило к значительным изменениям в домене экспрессии PIN3 (Рис. 40А,Б). Причем, стоит отметить возникновение «конкуренции» за область экспрессии между белками PIN3 и PIN7 при увеличении параметров k_a и $K_{s,a}$ (Рис. 40В,Г). То есть появление белка PIN3 в дополнительных клетках, приводит к значительному снижению белка PIN7 в этих клетках. С другой стороны, при уменьшении параметров k_a и $K_{s,a}$, наоборот, белки PIN3 и PIN7 становятся «одинаковыми», занимая общий домен экспрессии и не показывая различий в распределении (Рис. 40А).

Данный результат может свидетельствует о том, что принятое в модели допущение о том, что регуляция экспрессии для белков PIN3 и PIN7 зависит только от концентрации ауксина, оказалось неверным. По всей видимости, существует некоторый неучтенный механизм, обеспечивающий стабилизацию доменов экспрессии белков PIN3 и PIN7. Данный вопрос требует более подробного изучения в будущем.

4.6. Выводы по главе 4

Была разработана двумерная компьютерная модель распределения ауксина в апикальной меристеме корня *A. thaliana* с использованием реалистичного клеточного ансамбля, учитывающая существование всех пяти типов транспортеров ауксина из клетки PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 и PIN7.

Важным преимуществом разработанной математической модели распределения ауксина с реалистичным клеточным ансамблем служит формирование явно выраженных градиентов в распределении ауксина и белков семейства PIN, наблюдаемых в экспериментах.

Впервые в моделях подобного типа нами было получено право-левая асимметрия в распределении ауксина и белка PIN2 в меристеме корня, которая может служить объяснением волнообразного характера роста корня *A. thaliana* и характера закладки боковых корней, а также асинхронности деления

инициалей одного типа и различий в частоте делений инициалей разных типов.

В заключение важно сказать, что использование разработанной математической модели с различными клеточными ансамблями может быть полезно в будущем при анализе индивидуальных различий у растений, как дикого типа, так и мутантных растений, с выраженными нарушениями в морфологии корня.

Заключение

Изучение механизмов поддержания ниш стволовых клеток является одной из важнейших задач биологии развития. Благодаря специфическому микроокружению в нишах стволовых клеток стволовые клетки могут сохранять плюрипотентность длительное время (Imin and Rolfe, 2007; Sugimoto et al., 2011).

Важную роль в развитии корня и поддержании ниши стволовых клеток апикальной меристемы корня выполняет корневой чехлик, расположенный на его кончике (Иванов, 1987). Корневой чехлик реагирует на изменение условий окружающей среды по мере роста корня растения, выполняя защитную, секреторную, сигнальную функции, и, в том числе, поддерживают микроокружение ниши стволовых клеток (Иванов, 1987; Driouich et al., 2013; Fendrych et al., 2014; Kumpf, Nowack, 2015).

Центральная часть корневого чехлика, колумелла, характеризуется повышенным содержанием фитогормона ауксина (van den Berg et al. 1997; Sabatini et al. 1999). Поддержание высоких концентраций ауксина в колумелле и покоящемся центре имеет важное значение для процессов морфогенеза в корне, поддержания целостности апикальной меристемы, в целом, и ниши стволовых клеток, в частности (Vieten 2005; Liao, 2015). Именно поэтому основное внимание при изучении функционирования апикальной меристемы корня уделяется механизмам распределения ауксина в тканях.

В силу высокой сложности систем передачи сигнала и транспорта ауксина, отсутствия экспериментальных методов, позволяющих напрямую отследить изменения в содержании ауксина на клеточном уровне, а также необходимости исследовать распределение ауксина в динамике и в пространстве (Goh et al., 2014; Sabatini et.al., 1999; Brunoud et al., 2012; Band L., 2014; Liao et.al., 2015), исследование механизмов действия фитогормона ауксина требует привлечения методов математического моделирования.

Настоящая диссертационная работа представляет результаты исследования влияния структуры корневого чехлика и аномалий в его у

Arabidopsis thaliana при воздействии низких положительных температур или при нарушениях в работе гена *WOX5*, одного из основных регуляторов поддержания ниши стволовых клеток.

На первом этапе было проведено исследование влияния повреждений в колумелле на распределение ауксина. Наши коллабораторы показали, что при длительном (24 часа) воздействии низких положительных температур (4°C) наблюдается гибель вновь образованных дочерних клеток инициалей колумеллы, вследствие образования индуцированных холодом двуцепочечных разрывов ДНК.

В ходе работы компьютерная модель, разработанная в Институте Цитологии и Генетики (Mironova et al., 2012), была адаптирована под задачи исследования длительного воздействия холода (4°C, 24 часа) на апикальную меристему корня *Arabidopsis thaliana*. Компьютерное моделирование с использованием математической модели с прямоугольным клеточным ансамблем показало, что холодовой стресс приводит к уменьшению концентрации ауксина в кончике корня. В результате деление инициалей колумеллы приводит к потере максимума концентрации ауксина в покоящемся центре. Эти результаты свидетельствуют, что в результате холодового стресса может происходить потеря идентичности покоящегося центра, то есть он может начать делиться, а значит, сохранение ниши стволовых клеток находится под угрозой.

В результате численных расчетов показано, что гибель дочерних клеток инициалей колумеллы предотвращает смещение максимума концентрации ауксина из покоящегося центра. А значит, мы можем заключить, что гибель дочерних клеток инициалей колумеллы является защитным механизмом, позволяющим предотвратить нарушение функции ниши стволовых клеток после стрессового воздействия холода.

Предсказания модели были подтверждены экспериментально группой зарубежных ученых из Национального Университета в Сингапуре под руководством профессора Чен Ксу. Экспрессия гена *WOX5* в линии

WOX5::GFP при длительном воздействии холода была существенно выше в корнях, для которых наблюдалась гибель дочерних клеток инициалей колумеллы, по сравнению с корнями, в которых данное событие не наблюдалось. Растения, в которых произошло событие гибели дочерних клеток инициалей колумеллы, быстрее восстанавливаются после последующих заморозков (0°C) и легче переносят засуху, по сравнению с растениями, в которых данное событие не наблюдалось.

На основании этой комплексной компьютерно-экспериментальной работы был предложен механизм адаптации корневой апикальной меристемы к воздействию низких положительных температур «Жертва ради спасения» (Hong et al., 2017). Коротко данный механизм можно описать следующим образом: индуцированное холодом повреждение ДНК вызывает селективную гибель дочерних клеток инициалей колумеллы, восстанавливая максимум концентрации ауксина в покоящемся центре, что позволяет сохранить целостность всей ниши стволовых клеток и дает адаптивные преимущества при последующих стрессовых воздействиях.

Это открытие дает возможность исследовать воздействие так называемой холодной акклиматизации, которая улучшает устойчивость многих видов растений к стрессам от замерзания и засухи (Seki et al., 2002; Siminovitch and Cloutier, 1983; Steponkus, 1979), а также может помочь в селекции, направленной на уменьшение воздействия неблагоприятных условий среды на продуктивность сельскохозяйственных культур.

На следующем этапе работы были исследованы причины формирования аномалий развития корневого чехлика. Типичной аномалией развития корневого чехлика является преждевременная дифференцировка инициалей колумеллы, например, в одиночном мутанте *wox5-1* (Sarkar et al., 2007), в двойном мутанте *plt1 plt2* (Ding, Friml, 2010), а также в трансгенной линии *35S::CDF4* (Pi et al., 2015). Интересно, что сверхэкспрессия *WOX5* разрастанию в колумелле пула мелких клеток, похожих на инициали колумеллы и не содержащих гранул крахмала. Схожий фенотип наблюдается

в одиночных мутантах с нарушениями транспорта ауксина *pin3* и *pin4* (Ding, Friml, 2010) и обработке низкими дозами (30 мкМ) салициловой кислоты (Pasternak et al., 2019). В данной работе было исследовано, что является первопричиной таких сценариев развития при нарушении функции *WOX5*.

На основании экспериментальных данных об изменении морфологии и экспрессии генов ферментов синтеза ауксина, белков-переносчиков ауксина семейства PIN, а также репортера ауксина DR5 в линиях с потерей функции (*wox5-1*) и сверхэкспрессией гена *WOX5* (*35S::WOX5-GR*) была выдвинута гипотеза о том, что *WOX5*-зависимого изменения синтеза ауксина в апикальной меристеме корня *Arabidopsis thaliana* достаточно для воспроизведения всех наблюдаемых изменений.

С помощью двумерной компьютерной модели распределения ауксина в апикальной меристеме корня *Arabidopsis thaliana*, с прямоугольным клеточным ансамблем, а также одномерной гибридной компьютерной модели распределения ауксина в колумелле с ростом и делением клеток была показана непротиворечивость и достаточность гипотезы о генетической регуляции геном *WOX5* экспрессии фермента биосинтеза ауксина TAA1 для воспроизведения наблюдаемой в эксперименте клеточной динамики в колумелле *Arabidopsis thaliana* и изменений в паттернах экспрессии белков PIN1-4, PIN7 и репортера ауксина DR5 как в контроле, так и при нарушениях в экспрессии гена *WOX5*.

Известно, что других видов растений корневой чехлик состоит из большего количества слоев

Известно, что у других видов растений, таких как, например, пшеница или кукуруза, корневой чехлик состоит из большего количества слоев как стволовых, так и дифференцированных клеток (Hawes, Pueppke, 1986; Иванов, 1987; Iijima et al., 2008). На основании проведенного исследования можно предположить, что у таких видов растений синтез ауксина в кончике корня более продуктивный по сравнению с наблюдаемым у *Arabidopsis thaliana*.

Прямоугольный ансамбль клеток недостаточно хорошо моделирует структуру ниши стволовых клеток, в особенности, это касается инициалей эндодермиса/кортекса и эпидермиса/БКЧ, и клеток БКЧ, расположение которых не поддается моделированию на прямоугольном ансамбле клеток. Поэтому на третьем этапе была разработана двумерная компьютерная модель распределения ауксина в апикальной меристеме корня *A. thaliana* с использованием реалистичного клеточного ансамбля, учитывающая существование пяти типов белков транспортеров ауксина семейства PIN (PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7).

Для создания двумерной модели распределения ауксина в апикальной меристеме корня *Arabidopsis thaliana* с использованием реалистичного клеточного ансамбля, был создан пайплайн PlantLayout на языке MATLAB, который позволяет создавать двумерные компьютерные структурные модели тканей и органов растений, внедрять их в математические модели и упрощает проведение численного анализа полученных моделей.

В стационарном решении модели с реалистичным клеточным ансамблем наблюдалось формирование доменов экспрессии репортера ауксина *DR5* и белков PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 и PIN7 близкое к экспериментальным данным. Важной особенностью было формирование ярко выраженных градиентов концентраций в тканях.

Право-левая асимметрия в строении апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana*, естественно возникающая в процессе развития, приводит к формированию асимметрии в распределении белка PIN2, которая хорошо соотносится с асимметрией строения БКЧ. Подобная асимметрия в распределении белка PIN2 приводит к формированию право-левой асимметрии в распределении ауксина, что может служить объяснением волнообразного характера роста корня *Arabidopsis thaliana* и характера закладки боковых корней (Osmont et al., 2007; Dubrovsky et al., 2008). На основании наблюдаемой асимметрии в распределении ауксина в модели было предсказано, что деления разных типов инициалей будут происходить с

различной частотой, при этом деления инициалей одного вида, расположенных на разных полюсах корня, могут происходить одновременно. Действительно, это было показано экспериментально в работе Рахни и Бернаума (Rahni and Birnbaum, 2018), а также нашими коллабораторами под руководством профессора Чен Ксу.

Проведенное исследование с помощью ряда разработанных математических моделей распределения ауксина с различной степенью детализации показало важную роль структуры коневого чехлика в процессах поддержания ниши стволовых клеток апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana* в норме и при различных нарушениях в его строении. Разработанные в рамках данной работы, инструменты могут иметь широкое применение в исследованиях процессов развития корня.

Выводы

1. Создана серия компьютерных математических моделей распределения ауксина в тканях корня *Arabidopsis thaliana* с различной степенью детализации: (1) с прямоугольным или реалистичным клеточным ансамблем; (2) статических или с ростом и делением клеток; (3) с различным числом PIN транспортеров.
2. Открыт механизм адаптации апикальной меристемы корня *Arabidopsis thaliana* к действию низких положительных температур (4°C), при котором селективная гибель дочерних клеток инициалей колумеллы позволяет поддерживать максимум концентрации ауксина в клетках покоящегося центра и сохранить целостность ниши стволовых клеток. Механизм дает адаптивные преимущества при последующих стрессовых воздействиях.
3. С помощью методов компьютерного моделирования показана достаточность WOX5-опосредованной регуляции TAA1-зависимого синтеза ауксина для воспроизведения клеточной динамики в корневом чехлике, характерной для дикого типа, *wox5-1* и 35S::WOX5-GR;
4. Разработан пакет программ PlantLayout на языке MATLAB, который позволяет создавать двумерные компьютерные структурные модели тканей и органов растений, внедрять их в математические модели и упрощает проведение численного анализа полученных моделей.
5. С помощью компьютерного моделирования распределения ауксина в реалистичном клеточном ансамбле кончика корня *Arabidopsis thaliana*, полученном с помощью PlantLayout, показано наличие ярко выраженных асимметричных, относительно центральной оси корня, градиентов распределения ауксина. Эти градиенты могут обеспечивать волнообразный характер роста корня, асинхронность деления инициалей одного типа и различия в частоте делений инициалей разных типов.

Список литературы

1. Акбердин И. Р., Казанцев Ф. В., Омелянчук Н. А., Лихошвай В. А., Математическое моделирование метаболизма ауксина в клетке меристемы побега растения. // Вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13. – № 1. – С. 170-175.
2. Блюм Я. Б. и др., Влияние фитогормонов на цитоскелет растительной клетки. // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – № 4. – С. 557.
3. Высоцкая Л. Б., Черкозьянова А. В., Веселов С. Ю., Кудоярова Г. Р., Роль ауксинов и цитокининов в формировании боковых корней у растений пшеницы с частично удаленными первичными корнями // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – № 3. – С. 455-460.
4. Иванов В. Б., Пролиферация клеток в растениях // Итоги науки и техники. Цитология. – 1987. – Т. 5. – С. 6-12.
5. Кнорре Д. Г., Крылова Л. Ф., Музыкантов В. С., Физическая химия. – М.: Высш. шк., 1990г. – 463 с.
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. – 2014. – Т. 18. – № 4/1. – С. 797-806.
7. Коврижных В. В. Дис. ... канд. биол. наук: 03.01.09 / В.В. Коврижных. – Новосибирск, 2016. – 102 с.
8. Лихошвай В.А., Омелянчук Н.А., Миронова В.В. и др., Математическая модель паттерна распределения ауксина в корне растения. // Онтогенез. – 2007. – Т. 38. – № 6. – С. 1-11.
9. Лихошвай, В.А. Математическое моделирование и компьютерный анализ генных сетей: Дис. ... д. биол. наук: 03.00.28. / В.А. Лихошвай. – Новосибирск, 2008. – 364 с.
10. Лихошвай В. А., Омелянчук Н. А., Миронова В. В. и др., Моделирование регуляции ауксином инициации латеральных органов у

- Arabidopsis thaliana*. // Вестник Вогис. – 2009. – Т. 13. – № 1. – С. 176-185.
11. Медведев С. С., Физиология растений. Учебник для университетов. С.-Пб.: Изд-во СПбГУ. 2004.
12. Медведев С. С., Механизмы формирования и физиологическая роль полярности в растениях. // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – № 4. – С. 543.
13. Ощепкова, Е. А., Омельянчук, Н. А., Савина, М. С., Пастернак, Т., Колчанов, Н. А., Землянская, Е. В. // Системно-биологический анализ гена *WOX5* и его функций в нише ствольных клеток корня. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016. – Том 5. – № 4. – Стр. 459-474.
14. Тихонов А.Н., Системы дифференциальных уравнений, содержащие малые параметры при производных. // Математический сборник. – 1952. – Т. 31. – № 3. – С. 575–586.
15. Чуб В. В., Синюшин А. А., Фасциация цветка и побега: от феноменологии к построению моделей преобразования апикальной меристемы. // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 4. – С. 574.
16. Цыганкова В.А., Галкина Л.А., Мусатенко Л.И., Сытник К.М., Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Молекулярно-генетический контроль проведения и реализации сигналов ауксинов. // Біополімери і клітина. – 2005. – Т. 21 – № 1. – С. 187-219.
17. Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. // Plant Cell. – 2008. – Vol. 20. – P. 2117–2129.
18. Band L. R., Wells D.M., Fozard J.A., Ghetiu T., French A.P., Pound M.P., Wilson M.H., Yu L., Li W., Hijazi H.I., Oh J., Pearce S.P., Perez-Amador M.A., Yun J., Kramer E., Alonso J.M., Godin C., Vernoux T., Hodgman T.C.,

- Pridmore T.P., Swarup R., King J.R., Bennett M.J. Systems analysis of auxin transport in the Arabidopsis root apex. // *The Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – N. 3. – P. 862-875.
- 19.Barbez, E., Kubeš, M., Rolčík, J., Béziat, C., Pěňčík, A., Wang, B., Rosquete, M.R., Zhu, J., Dobrev, P.I., Lee, Y. and Zažímalová, E. A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. // *Nature*. – 2012. – Vol. 485. – N. 7396. – P. 119-122.
- 20.Barlow PW. The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function. *Journal of plant growth regulation*. – 2002. – Vol. 21. – N. 4. – P. 261-286.
- 21.Baron KN, Schroeder DF, Stasolla C. Transcriptional response of abscisic acid (ABA) metabolism and transport to cold and heat stress applied at the reproductive stage of development in *Arabidopsis thaliana*. // *Plant Sci*. – 2012. – Vol. 188–189. – P. 48–59.
- 22.Bayer, E. M., Smith, R. S., Mandel, T., Nakayama, N., Sauer, M., Prusinkiewicz, P., Kuhlemeier, C. Integration of transport-based models for phyllotaxis and midvein formation. // *Genes & development*. – 2009. – Vol. 23. – N. 3. – P. 373-384.
- 23.Benfey, P.N. and Schiefelbein, J.W. Getting to the root of plant development: the genetics of *Arabidopsis* root formation. // *Trends in genetics*. – 1994. – Vol. 10. – N. 3. – P. 84-88.
- 24.Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G. and May, S.T. *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. // *Science*. – 1996 – Vol. 273. – N. 5277. – P. 948.
- 25.Blancaflor E. B., Fasano J. M., Gilroy S. Mapping the functional roles of cap cells in the response of *Arabidopsis* primary roots to gravity. // *Plant physiology*. – 1998. – Vol. 116. – №. 1. – P. 213-222.
- 26.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. - Vol. 433. - N. 7021. - P. 39-44.

27. Borghi L. // Inducible gene expression systems for plants. // *InPlant Developmental Biology*. – 2010. – P. 65-75. – Humana Press, Totowa, NJ.
28. Brunoud G., Wells DM, Oliva M, Larrieu A, Mirabet V, Burrow AH, Beeckman T, Kepinski S, Traas J, Bennett MJ, Vernoux T. A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution // *Nature*. – 2012. – Vol. 482. – N. 7383. – P. 103-106.
29. 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. - Vol. 137. - N. 3. - P. 939-948.
30. Cannesan, M. A., Durand, C., Burel, C., Gangneux, C., Lerouge, P., Ishii, T., Laval, K., Follet-Gueye, M.-L., Driouich, A. and Vické-Gibouin, M. Effect of Arabinogalactan proteins from the Root Caps of Pea and Brassica napus on *Aphanomyces euteiches* Zoospore chemotaxis and germination. // *Plant Physiol.* – 2012. – Vol. 159 – P. 1658-1670.
31. Catala´ R, Lo´pez-Cobollo R, Mar Castellano M, Angosto T, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J. The Arabidopsis 14-3-3 protein RARE COLD INDUCIBLE 1A links low-temperature response and ethylene biosynthesis to regulate freezing tolerance and cold acclimation. // *Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – P. 3326–3342.
32. Chen, Q., Dai, X., De-Paoli, H., Cheng, Y., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y. and Zhao, Y. Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in Arabidopsis roots. // *Plant and Cell Physiology*. – 2014. – Vol. 55. – N.6. – P. 1072-1079.
33. Ciardi JA, Deikman J, Orzolek MD. Increased ethylene synthesis enhances chilling tolerance in tomato. // *Physiol Plant*. – 1997. – Vol. 101 – P. 333–340.
34. Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Blilou, I., Grieneisen, V.A., Sozzani, R., Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P. and Caballero-Pérez, J. A bistable circuit involving SCARECROW-

- RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. // *Cell*. – 2012. – Vol. 150. – N. 5. – P. 1002-1015.
35. Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Wachsman, G., Du, Y., Arteaga-Vázquez, M., Zhang, H., Benjamins, R., Blilou, I., Neef, A.B., Chandler, V. and Scheres, B. A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the Arabidopsis root stem cell organizer. // *PLoS biology*. – 2013. – Vol. 11. – N. 11. – P. e1001724.
36. Cuevas JC, Lo'pez-Cobollo R, Alca'zar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio AF, Ferrando A. Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. // *Plant Physiol*. – 2008. – Vol. 148. – P. 1094–1105.
37. de Reuille PB, Bohn-Courseau I, Ljung K et al., Computer simulations reveal novel properties of the cell-cell signaling network at the shoot apex in Arabidopsis. // *Proc Natl Acad Sci*. – 2006. – Vol. 103. – P. 1627–1632.
38. De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, dit Frey NF, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, Inzé D. // Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. // *Development*. – 2007. – Vol. 134. – N. 4. – P. 681-690.
39. di Mambro, R., de Ruvo, M., Pacifici, E., Salvi, E., Sozzani, R., Benfey, P.N., Busch, W., Novak, O., Ljung, K., Di Paola, L. and Marée, A.F. Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the Arabidopsis root. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – N. 36. – P. E7641-E7649.
40. Ding Z, Friml J. // Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – N. 26. – P. 12046-12051.
41. Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S. et al. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. // *Development*. - 1993. - Vol. 119. - N. 1. - P. 71-84.

42. Dong CJ, Li L, Shang QM, Liu XY, Zhang ZG. Endogenous salicylic acid accumulation is required for chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. // *Planta*. – 2014. – Vol. 240. – P. 687–700.
43. Doussan C., Pages L., Pierret A. Soil exploration and resource acquisition by plant roots: an architectural and modelling point of view // *Agronomie*. - 2003. - Vol. 23. - P. 419–431.
44. Driouich, A., Follet-Gueye, M.-L., Vire-Gibouin, M. and Hawes, M. Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2013. – Vol. 16 – P. 489-495.
45. Dubreuil, C., Jin, X., Grönlund, A. and Fischer, U. A Local Auxin Gradient Regulates Root Cap Self-Renewal and Size Homeostasis. // *Current Biology*. – 2018. – Vol. 28. – N. 16. – P. 2581-2587.
46. Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucially-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J. and Benková, E. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – N. 25. – P. 8790-8794.
47. Eremina M, Rozhon W, Poppenberger B. Hormonal control of cold stress responses in plants. // *Cell Mol Life Sci*. – 2016. – Vol. 73. – N. 4. – P. 797-810.
48. Fendrych, M., Van Hautegeem, T., Van Durme, M., Olvera-Carrillo, Y., Huysmans, M., Karimi, M., Lippens, S., Guerin, C. J., Krebs, M., Schumacher, K. et al. Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in *Arabidopsis*. // *Curr. Biol.* – 2014. – V. 24. – P. 931-940.
49. Feraru E, Friml J. PIN polar targeting. // *Plant Physiol*. – 2008. – Vol. 147. – N. 4. – P. 1553-1559.
50. Feugier FG, Mochizuki A, Iwasa Y, Self-organization of the vascular system in plant leaves: inter-dependent dynamics of auxin flux and carrier proteins. // *J Theor Biol*. – 2005. – Vol. 236. – N. 4. – P. 366–375.

51. Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W. and Murray, J.A. WOX5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. // *Current Biology*. – 2014. – Vol. 24. – N. 16 – P. 1939-1944.
52. Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis* // *Cell*. – 2002a. – Vol. 108. – N. 5. – P. 661-673.
53. Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. // *Nature*. – 2002b. - Vol. 415. - N. 6873. - P. 806-809.
54. Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H. et al. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis* // *Nature*. - 2003. - Vol. 426. - N. 6963. - P. 147-153.
55. Friml J., Yang X., Michniewicz M., Weijers D., Quint A. et al. A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux // *Science*. - 2004. - Vol. 306. - N. 5697. - P. 862-865.
56. Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M. Gravitropic response of inflorescence stems in *Arabidopsis thaliana*. // *Plant Physiol*. – 1996. – Vol. 110. – P. 933–943.
57. Gao B., Wen C., Fan L., Kou Y., Ma N., Zhao L. A *Rosa canina* WUSCHEL-related homeobox gene, RcWOX1, is involved in auxin-induced rhizoid formation. // *Plant Mol. Biol*. – 2014. – Vol. 86. – N. 6. – P. 671-679.
58. Geisler, M. and Murphy, A.S. The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. // *FEBS letters*. – 2006. – Vol. 580. – N. 4. – P. 1094-1102.
59. Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W. et al. The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth // *Cell*. - 2003. - Vol. 112. - N. 2. - P. 219-230.

60. Goh, T., Vobeta, U., Farcot, E., Bennett, M.J., and Bishopp, A. Systems biology approaches to understand the role of auxin in root growth and development. // *Physiol Plant.* – 2014. – Vol. 151. – P. 73-82.
61. Goldsmith MH, Goldsmith TH, Martin MH, Mathematical analysis of the chemosmotic polar diffusion of auxin through plant tissues. // *Proc Natl Acad Sci.* – 1981. – Vol. 78. – N. 2. – P. 976–980.
62. 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. - Vol. 449. - N. 7165. - P. 1008-1013.
63. Grieneisen, V.A., Scheres, B., Hogeweg, P. and Marée, A.F. Morphogengineering roots: comparing mechanisms of morphogen gradient formation. // *BMC systems biology.* – 2012. – Vol. 6. – N. 1. – P. 37.
64. Guo Z, Tan J, Zhuo C, Wang C, Xiang B, Wang Z. Abscisic acid, H₂O₂ and nitric oxide interactions mediated cold-induced S-adenosylmethionine synthetase in *Medicago sativa* subsp. *falcata* that confers cold tolerance through up-regulating polyamine oxidation. // *Plant Biotechnol J.* – 2014. – Vol. 12. – P. 601–612.
65. Guye MG, Vigh L, Wilson LM. Chilling-induced ethylene production in relation to chill-sensitivity in *Phaseolus* spp. // *J Exp Bot.* – 1987. – Vol. 38 – P. 680–690.
66. Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M., Laux T. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. // *Development.* – 2004. – Vol. 131. – N. 3. – P. 657-668.
67. Hawes MC, Pueppke SG. // Sloughed peripheral root cap cells: yield from different species and callus formation from single cells. // *American Journal of Botany.* – 1986. – Vol. 73. – N. 10. – P. 1466-1473.
68. Hawes, M. C., Gunawardena, U., Miyasaka, S. and Zhao, X. The role of root border cells in plant defense. // *Trends Plant Sci.* – 2000. – Vol. 5. – P. 128-133.

- 69.Hong, J.H., Chu, H., Zhang, C., Ghosh, D., Gong, X. and Xu, J. A quantitative analysis of stem cell homeostasis in the *Arabidopsis columella* root cap. // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6. – P. 206.
- 70.Hong JH, Savina MS, Du J, Devendran A, Ramakanth KK, Tian X, Sim WS, Mironova VV, Xu J. A sacrifice-for-survival mechanism protects Root Stem Cell Niche from Chilling Stress. // *Cell*. – 2017. – Vol. 170. – P. 102-113.
- 71.Hu Y, Jiang L, Wang F, Yu D. Jasmonate regulates the inducer of cbf expression-C-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*. // *Plant Cell*. – 2013. – Vol. 25 – P. 2907–2924.
- 72.Huang X, Li J, Bao F, Zhang X, Yang S. A gain-of-function mutation in the *Arabidopsis* disease resistance gene RPP4 confers sensitivity to low temperature. // *Plant Physiol*. – 2010. – Vol. 154. – N. 2. – P. 796–809.
- 73.Iijima M, Morita S, Barlow PW. // Structure and function of the root cap. // *Plant production science*. – 2008. – Vol. 11. – N. 1. – P. 17-27.
- 74.Imin N., Rolfe B. G. Factors that mediate root initiation in plants. // *Plant signaling & behavior*. – 2007. – Vol. 2. – N. 4. – P. 249-250.
- 75.Ivanov V.B., Dubrovsky I.G. Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. // *Trends in Plant Science*. – 2013. – Vol. 18. – P. 237–242.
- 76.Jeon J, Kim NY, Kim S, Kang NY, Nova'k O, Ku SJ, Cho C, Lee DJ, Lee EJ, Strnad M, Kim J. A subset of cytokinin twocomponent signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. // *J Biol Chem*. – 2010. – Vol. 285. – P. 23371–23386.
- 77.Jiang K., Feldman J.L. Regulation of Root Apical Meristem Development // *Annu. Rev Cell Dev Biol*. - 2005. - Vol. 21. - P. 485–509.
- 78.Jiang YP, Huang LF, Cheng F, Zhou YH, Xia XJ, Mao WH, Shi K, Yu JQ. Brassinosteroids accelerate recovery of photosynthetic apparatus from cold stress by balancing the electron partitioning, carboxylation and redox homeostasis in cucumber. // *Physiol Plant*. – 2013. – Vol. 148. – P. 133–145.

79. Jönsson H, Heisler MG, Shapiro BE et al., An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. // *Proc Natl Acad Sci.* – 2006. – Vol. 103. – P. 1633–1638.
80. Kazan, K. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. // *Annals of botany.* – 2013. – Vol. 112. – N. 9. – P. 1655-1665.
81. Kim Y, Park S, Gilmour SJ, Thomashow MF. Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of *Arabidopsis*. // *Plant J.* – 2013. – Vol. 75. – P. 364–376.
82. Kosová K, Prašil IT, Viťa'mva's P, Dobrev P, Motyka V, Floková K, Nova'k O, Turec'kova' V, Rolc'ik J, Pes'ek B, Tra'vnic'kova' A, Gaudinova' A, Galiba G, Janda T, Vlasa'kova' E, Pra's'ilova' P, Vankova' R. Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. // *J Plant Physiol.* – 2012. – Vol. 169. – P. 567–576.
83. Kramer E.M., Bennett M.J. Auxin transport: a field in flux. // *Trends Plant Sci.* – 2006. – Vol. 11. – N. 8. – P. 382-386.
84. Kramer EM, Lewandowski M, Beri S, Bernard J, Borkowski M, Borkowski MH, Burchfield LA, Mathisen B, Normanly J. Auxin gradients are associated with polarity changes in trees. // *Science.* – 2008. – Vol. 320. – N. 5883. – P. 1610.
85. Kramer, Auxin-regulated cell polarity: An inside job? // *Trends Plant Sci.* – 2009. – Vol. 14. – P. 242–247.
86. Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zazimalová E. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. // *Genome Biol.* – 2009. – Vol. 10. – N. 12. – P. 249.
87. Krupinski P, Jonsson H. Modeling Auxin-regulated Development. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2010. – Vol. 2. – N. 2. – P. a001560.
88. Kumpf RP, Nowack MK. // The root cap: a short story of life and death. // *Journal of experimental botany.* – 2015. – Vol. 66. – N. 19. – P. 5651-5662

- 89.Laskowski M, Grieneisen VA, Hofhuis H et al., Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. // PLoS Biol. – 2008. – Vol. 6. – P. 307.
- 90.Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J. and Jurgens, G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. // Development. – 1996. – Vol. 122. – N. 1. – P. 87-96.
- 91.Lavrekha, V. V., Pasternak, T., Ivanov, V. B., Palme, K., Mironova, V. V. 3D analysis of mitosis distribution highlights the longitudinal zonation and diarch symmetry in proliferation activity of the Arabidopsis thaliana root meristem. // The Plant Journal. – 2017. – Vol. 92. – N. 5. – P. 834-845.
- 92.Lee, Y., Lee, W.S. and Kim, S.H. Hormonal regulation of stem cell maintenance in roots. // Journal of experimental botany. – 2012. – Vol. 64. – N. 5. – P. 1153-1165.
- 93.Lewis DR, Negi S, Sukumar P, Muday GK. Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. // Development. – 2011. – Vol. 138. – P. 3485–3495.
- 94.Li L, Xu J, Xu ZH, Xue HW. Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in Brassica and Arabidopsis. // Plant Cell. – 2005. – Vol. 17 – P. 2738–2753.
- 95.Liao, C.Y., Smet, W., Brunoud, G., Yoshida, S., Vernoux, T. and Weijers, D. Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. // Nature methods. – 2015. – Vol. 12.- N. 3. – P. 207-210.
- 96.Likhoshvai V, Ratushny A, Generalized hill function method for modeling molecular processes. // J Bioinform Comput Biol. – 2007. – №5 (2B) – P. 521-531.
- 97.Ljung K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M. et al. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. // Plant Cell. – 2005. – Vol. 17. – N. 4. – P. 1090-1104.
- 98.Ljung, K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. // Development. – 2013. – Vol. 140. – N. 5. – P. 943-950.

99. Mähönen, A.P., Ten Tusscher, K., Siligato, R., Smetana, O., Díaz-Triviño, S., Salojärvi, J., Wachsman, G., Prasad, K., Heidstra, R. and Scheres, B. PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. // *Nature*. – 2014. – Vol. 515 – N. 7525. – p.125.
100. Malamy, J.E. and Benfey, P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. // *Development*. – 1997. – Vol. 124 – N. 1. – P. 33-44.
101. Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ. AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. // *The EMBO journal*. – 1999 – Vol. 18. – N. 8. – P. 2066-2073.
102. Maruyama K, Urano K, Yoshiwara K, Morishita Y, Sakurai N, Suzuki H, Kojima M, Sakakibara H, Shibata D, Saito K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. // *Plant Physiol*. – 2014. – Vol. 164. – P. 1759–1771.
103. Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. and Laux, T. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. // *Cell*. – 1998. – Vol. 95. – N. 6. – P. 805-815.
104. Merks, R. M., Van de Peer, Y., Inzé, D., Beemster, G. T. Canalization without flux sensors: a traveling-wave hypothesis. // *Trends in plant science*. – 2007. – Vol. 12. – N. 9. – P. 384-390.
105. Mironova VV, Omelyanchuk NA, Yosiphon G, Fadeev SI, Kolchanov NA, Mjolsness E, Likhoshvai VA. A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root. // *BMC Systems Biology*. – 2010. – Vol. 4 – N. 1. – P. 1.
106. Mironova VV, Omelyanchuk NA, Novoselova ES, Doroshkov AV, Kazantsev FV, Kochetov AV, Kolchanov NA, Mjolsness E, Likhoshvai VA. Combined in silico/in vivo analysis of mechanisms providing for root apical

- meristem self-organization and maintenance. // *Ann Bot.* – 2012. – Vol. 110 – N. 2. – P. 349-360.
107. Mitchison, The polar transport of auxin and vein patterns in plants. // *Phil Trans R Soc Lond B.* – 1981. – Vol. 295. – P. 461–471.
108. Möller, Barbara K., Wei Xuan, and Tom Beeckman. Dynamic control of lateral root positioning. // *Current opinion in plant biology.* – 2017. – Vol. 35. – P. 1-7.
109. Moore, S., Zhang, X., Liu, J., and Lindsey, K. Some fundamental aspects of modeling auxin patterning in the context of auxin-ethylene-cytokinin crosstalk. // *Plant Signal Behav.* – 2015. – Vol. 10. – P. e1056424.
110. Morita M. T., Tasaka M. Gravity sensing and signaling // *Current opinion in plant biology.* – 2004. – Vol. 7. – №. 6. – P. 712-718.
111. Mosca G, Adibi M, Strauss S, Runions A, Sapala A, Smith RS. Modeling plant tissue growth and cell division. // *In Mathematical Modelling in Plant Biology, Springer, Cham.*– 2018. – P. 107-138.
112. Mravec J, Skůpa P, Bailly A, Hoyerová K, Krecek P, Bielach A, Petrášek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof YD, Dobrev PI, Schwarzerová K, Rolcík J, Seifertová D, Luschnig C, Benková E, Zazimalová E, Geisler M, Friml J. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. // *Nature.* – 2009. – Vol. 459. – N. 7250. – P. 1136-1140.
113. Muraro, D., Byrne, H., King, J. and Bennett, M. The role of auxin and cytokinin signalling in specifying the root architecture of *Arabidopsis thaliana* // *Journal of theoretical biology.* – 2013. – Vol. 317. – P. 71-86.
114. Muraro, D., Larrieu, A., Lucas, M., Chopard, J., Byrne, H., Godin, C. and King, J. A multi-scale model of the interplay between cell signalling and hormone transport in specifying the root meristem of *Arabidopsis thaliana*. // *Journal of theoretical biology.* – 2016. – Vol. 404 – P.182-205.

115. Nadella V, Shipp MJ, Muday GK, Wyatt SE. Evidence for altered polar and lateral auxin transport in the gravity persistent signal (gps) mutants of *Arabidopsis*. // *Plant Cell Environ.* – 2006. – Vol. 29. – P. 682–690
116. Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. // *Front Plant Sci.* – 2014. – Vol. 5. – P. 170.
117. Nardmann J., Werr W. The invention of WUS-like stem cell-promoting functions in plants predates leptosporangiate ferns. // *Plant. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 78 – N. 1-2. – P. 123-134.
118. Omelyanchuk, N.A., Kovrizhnykh, V.V., Oshchepkova, E.A., Pasternak, T., Palme, K. and Mironova, V.V. A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in *Arabidopsis thaliana* root. // *BMC plant biology.* – 2016. – Vol. 16. – N. 1. – P. 1.
119. Osmont, K.S., Sibout, R. and Hardtke, C.S. Hidden branches: developments in root system architecture. // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 58 – P. 93-113.
120. Pasternak T, Groot EP, Kazantsev F, Teale W, Omelyanchuk N, Kovrizhnykh V, Palme K, Mironova VV. // Salicylic acid affects root meristem patterning via auxin distribution in a concentration-dependent manner. // *Plant physiology.* – 2019. – P. 00130.
121. Petersson S. V. Johansson AI, Kowalczyk M, Makoveychuk A, Wang JY, Moritz T, Grebe M, Benfey PN, Sandberg G, Ljung K. An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis // *The Plant Cell.* – 2009. – 21(6). – P. 1659-1668.
122. Petrásek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J.J., Abas M. et al. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux // *Science.* - 2006. - Vol. 312. - N. 5775. – P. 914-918.

123. Pi L., Aichinger E., van der Graaff E., Llavata-Peris C.I., Weijers D., Hennig L., Groot E. Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression. // *Dev. Cell.* – 2015. – Vol. 33 – N. 5. – P. 576-588.
124. Prusinkiewicz P, Runions A. Computational models of plant development and form. // *New Phytologist.* – 2012. – Vol. 193. – N. 3 – P. 549-69.
125. Qi, J., Wang, Y., Yu, T., Cunha, A., Wu, B., Vernoux, T., Meyerowitz, E. and Jiao, Y. Auxin depletion from leaf primordia contributes to organ patterning. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2014. – Vol. 111. – N. 52. – P. 18769-18774.
126. Rahman A. Auxin: a regulator of cold stress response. // *Physiologia Plantarum.* – 2013. – V. 147 – P. 28–35.
127. Rahni R. and Birnbaum D. Week-long imaging of cell divisions in the *Arabidopsis* root meristem. // *bioRxiv.* – 2018. – P. 268102.
128. Rashotte AM, Brady SR, Reed RC, Ante SJ, Muday GK. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. // *Plant physiology.* – 2000. – Vol. 122 – N. 2 – P. 481-490.
129. Richards S, Wink RH, Simon R. // *Mathematical modelling of WOX5- and CLE40-mediated columella stem cell homeostasis in Arabidopsis.* // *Journal of experimental botany.* – 2015. – Vol. 66. – N. 17. – P. 5375-5384.
130. Richter R, Behringer C, Müller IK, Schwechheimer C. The GATAtype transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROMEINTERACTING FACTORS. // *Genes Dev.* – 2010. – Vol. 24 – P. 2093–2104.
131. Richter R, Bastakis E, Schwechheimer C. Cross-repressive interactions between SOC1 and the GATAs GNC and GNL/ CGA1 in the control of greening, cold tolerance, and flowering time in *Arabidopsis*. // *Plant Physiol.* – 2013. – Vol. 162 – P. 1992–2004.

132. Rudge T, Haseloff J. A computational model of cellular morphogenesis in plants. // European Conference on Artificial Life. Springer, Berlin, Heidelberg. – 2005. – P. 78-87.
133. Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorska R, Beeckman T, Friml J, Benkova E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. // Plant Cell. – 2007. – Vol. 19 – P. 2197–2212.
134. Ruzicka K, Simaskova M, Duclercq J, Petrasek J, Zazimalova E, Simon S, Friml J, Van Montagu MC, Benkova E. Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. // Proc Natl Acad Sci. – 2009. – Vol. 106 – P. 4284–4289
135. 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. - Vol. 99. - N. 5. - P. 463–472.
136. Sablowski, R. Carnier Dornelas, M. Interplay between cell growth and cell cycle in plants. // Journal of Experimental Botany. – 2013. – Vol. 65 – N. 10 – P. 2703-2714.
137. Sahlin P, Söderberg B, Jönsson H, Regulated transport as a mechanism for pattern generation: Capabilities for phyllotaxis and beyond // J Theor Biol – 2009. – V. 258 – N. 1. – P. 60–70.
138. Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., Laux T. Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. // Nature. – 2007. – Vol. 446. – P. 811-814.
139. Sauter M., Kende H. Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice // Planta. - 1992. - Vol. 188. - P. 362–368.
140. Schiessl K, Kausika S, Southam P, Bush M, Sablowski R. JAGGED controls growth anisotropy and coordination between cell size and cell cycle during plant organogenesis. // Current Biology. – 2012. – Vol. 22. – P. 1739–1746.

141. 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. – Vol. 77. – N. 5. – P. 806–814.
142. Scott IM, Clarke SM, Wood JE, Mur LA. Salicylate accumulation inhibits growth at chilling temperature in *Arabidopsis*. // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 135. – P. 1040–1049.
143. Shi Y, Tian S, Hou L, Huang X, Zhang X, Guo H, Yang S. Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in *Arabidopsis*. // *Plant Cell.* – 2012. – Vol. 24. – P. 2578–2595.
144. Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A. Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: underlying molecular mechanisms. // *Plant Cell.* – 2009. – Vol. 21. – P. 3823–3838.
145. Shkolnik-Inbar D, Bar-Zvi D. ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. // *Plant Cell.* – 2010. – Vol. 22. – P. 3560–3573.
146. Sievers, A., Braun, M. and Monshausen, G. B. The root cap: structure and function. In *Plant Root: The Hidden Half* (ed. Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi). // New York: CRC Press. – 2002. – P. 33-47.
147. Singh I, Kumar U, Singh SK, Gupta C, Singh M, Kushwaha SR. Physiological and biochemical effect of 24-epibrassinolide on cold tolerance in maize seedlings. // *Physiol Mol Biol Plants.* – 2012. – Vol. 18. – P. 229–236.
148. Smith, R. S., Guyomarc'h, S., Mandel, T., Reinhardt, D., Kuhlemeier, C., Prusinkiewicz, P. A plausible model of phyllotaxis. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2006. – Vol. 103. – N. 5. – P. 1301-1306.
149. Stahl Y., Simon R. Plant stem cell niches // *Int J Dev Biol.* - 2005. - Vol. 49. - N. 5-6. - P. 479-489.
150. Sorefan, K., Girin, T., Liljegren, S.J., Ljung, K., Robles, P., Galván-Ampudia, C.S., Offringa, R., Friml, J., Yanofsky, M.F. and Østergaard, L. A

- regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – N. 7246. – P. 583.
151. Sugimoto K., Gordon S. P., Meyerowitz E. M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? // *Trends in cell biology*. – 2011. – Vol. 21 –N. 4. – P. 212-218.
152. Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, ChenQ, Liu F, ZhouW, Chen R, Li X, Tietz O, Wu X, Cohen JD, Palme K, Li C. *Arabidopsis* ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. // *Plant Cell*. – 2009 – Vol. 21. – P. 1495–1511.
153. Sun J, Chen Q, Qi L, Jiang H, Li S, Xu Y, Liu F, ZhouW, Pan J, Li X, Palme K, Li C. Jasmonate modulates endocytosis and plasma membrane accumulation of the *Arabidopsis* PIN2 protein. // *New Phytol*. – 2011. – Vol. 191. – P. 360–375.
154. Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G. et al. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. // *Genes Dev*. - 2001. - Vol. 15. - N. 20. - P. 2648-2653.
155. Swarup R, Bennett M, Auxin Transport: The Fountain of Life in Plants? // *Developmental Cell*. – 2003. – Vol. 5. – N. 6. – P. 824-826.
156. Swarup R, Kramer EM, Perry P et al., Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. // *Nat Cell Biol*. – 2005. – Vol. 7. – P. 1057–1065.
157. Tian, H., Wabnik, K., Niu, T., Li, H., Yu, Q., Pollmann, S., Vanneste, S., Govaerts, W., Rolcik, J., Geisler, M., et al. WOX5-IAA17 feedback circuit-mediated cellular auxin response is crucial for the patterning of root stem cell niches in *Arabidopsis*. // *Mol Plant*. – 2014. – Vol. 7. –P. 277-289.
158. 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.

159. van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P. and Scheres, B. Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. // *Nature*. – 1997. – Vol. 390 – N. 6657. – P. 287-289.
160. van den Berg, T., Korver, R.A., Testerink, C., and Ten Tusscher, K.H. Modeling halotropism: a key role for root tip architecture and reflux loop remodeling in redistributing auxin // *Development*. – 2016. – Vol. 143 – P. 3350-3362.
161. van der Graaff, E., Laux, T. and Rensing, S.A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. // *Genome biology*. – 2009. – Vol. 10 – N. 12. – P. 248.
162. Vaughn, L.M. and Masson, P.H. A QTL study for regions contributing to Arabidopsis thaliana root skewing on tilted surfaces. // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2011. – Vol. 1. – N. 2. – P. 105-115.
163. Verma, V., Ravindran, P. and Kumar, P.P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. // *BMC plant biology*. – 2016. – Vol. 16 – N. 1. – P. 1.
164. Veselova SV, Farhutdinov RG, Veselov SY, Kudoyarova GR, Veselov DS, Hartung W. The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.). // *J Plant Physiol*. – 2005. – Vol. 162. – P. 21–26
165. Vicre, M., Santaella, C., Blanchet, S., Gateau, A. and Driouich, A. Root border-like cells of Arabidopsis. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. // *Plant Physiol*. – 2005 – V. 138 – P. 998-1008.
166. Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benková E., Benjamins R. et al. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxindependent cross-regulation of PIN expression // *Development*. - 2005. - Vol. 132. - N. 20. - P. 4521-4531.

167. Vieten A, Sauer M, Brewer PB, Friml J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. // *Trends Plant Sci.* – 2007. – Vol. 12 – N. 4 – P. 160-168.
168. von Sachs J. Vorlesungen u̇ber Pflanzen-Physiologie // Wilhelm Engelmann. – 1882.
169. Wang, Q., Kohlen, W., Rossmann, S., Vernoux, T., and Theres, K. Auxin depletion from the leaf axil conditions competence for axillary meristem formation in Arabidopsis and tomato. // *Plant Cell.* – 2014a. – Vol. 26. – P. 2068–2079.
170. Wang, Y., Wang, J., Shi, B., Yu, T., Qi, J., Meyerowitz, E.M. and Jiao, Y. The stem cell niche in leaf axils is established by auxin and cytokinin in Arabidopsis // *Plant Cell.* – 2014b. – Vol. 26. – P. 2055–2067.
171. Willige BC, Isono E, Richter R, Zourelidou M, Schwechheimer C. Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in Arabidopsis thaliana. // *Plant Cell.* – 2011. – Vol. 23. – P. 2184–2195.
172. Wiśniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P.B., Růžička, K., Blilou, I., Rouquié, D., Benková, E., Scheres, B. and Friml, J. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. // *Science.* – 2006. – Vol. 312. – N. 5775 – P. 883-883.
173. Wyatt SE, Rashotte AM, Shipp MJ, Robertson D, Muday GK. Mutations in the gravity persistence signal loci in Arabidopsis disrupt the perception and/or signal transduction of gravitropic stimuli. // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 130. – P. 1426–1435.
174. Xia XJ, Wang YJ, Zhou YH, Tao Y, Mao WH, Shi K, Asami T, Chen Z, Yu JQ. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. // *Plant Physiol.* – 2009. – Vol. 150. – P. 801–814.

175. Xu J., Hofhuis H., Heidstra R., Sauer M., Friml J. et al. A molecular framework for plant regeneration // *Science*. - 2006. – Vol. 311. – N. 5759. – P. 385-388.
176. Xuan, W., Band, L.R., Kumpf, R.P., Van Damme, D., Parizot, B., De Rop, G., Opdenacker, D., Moller, B.K., Skorzinski, N., Njo, M.F., et al. Cyclic programmed cell death stimulates hormone signaling and root development in *Arabidopsis* // *Science*. – 2016. – Vol. 351. – P. 384-387.
177. Yadav, R.K., Tavakkoli, M. and Reddy, G.V. WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. // *Development*. – 2010. – P. dev-054973.
178. Yu XM, Griffith M, Wiseman SB. Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. // *Plant Physiol*. – 2001. – Vol. 126. – P. 1232–1240.
179. Zažímalová E, Murphy AS, Yang H, Hoyerová K, Hošek P. Auxin transporters—why so many?. // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2010. – Vol. 2. – N. 3. – P. a001552.
180. Zhao M, Liu W, Xia X, Wang T, Zhang WH Cold acclimation-induced freezing tolerance of *Medicago truncatula* seedlings is negatively regulated by ethylene. // *Physiol Plant*. – 2014. – Vol. 152. – P. 115–129.
181. Zhu, J., Zhang, K.X., Wang, W.S., Gong, W., Liu, W.C., Chen, H.G., Xu, H.H. and Lu, Y.T. Low temperature inhibits root growth by reducing auxin accumulation via ARR1/12. // *Plant and Cell Physiology*. – 2015. – Vol. 56. – N. 4. – P. 727-736.
182. Zürcher E., Müller B. Cytokinin synthesis, signaling, and function – advances and new insights // *International review of cell and molecular biology*. – 2016. – Vol. 324. – P. 1–38.

Приложение 1. Варьирование по параметрам для одномерной динамической модели распределения ауксина

В рамках данной работы было проведено исследование поведения рассматриваемой динамической системы при варьировании параметров модели (расчеты проводились для набора параметров, соответствующих контролю). При исследовании изменялось значение только одного параметра за раз, каждый расчет проводился до 3000 шагов, начальные данные, касающиеся размеров клеток, не изменялись. Варьирование параметров со значением больше 0,5 осуществлялось с шагом 0,1.

В первую очередь было проведено исследование чувствительности модели к параметрам, относящимся к процессам изменения содержания ауксина в модели, а именно синтез и деградация ауксина, поток ауксина из верхней части корня. Исследование влияния значения интенсивности потока ауксина из верхней части корня (k_a) на клеточную динамику показало, что в модели существует несколько режимов функционирования. При значениях $2,8 \leq k_a \leq 3,2$ в модели поддерживается нормальная клеточная динамика, процессы деления и сдувания клеток согласованы, количество клеток колумеллы сохраняется постоянным. При значениях $2,1 \leq k_a \leq 2,7$ количество клеток также сохраняется постоянным, но их в среднем на одну меньше, чем в контроле. При этом ПЦ теряет состояние покоя и переходит к делению, то есть воспроизводится динамика характерная для мутантной линии *wox5-1*. При $k_a \leq 2$ Происходит полное исчезновения пула стволовых клеток и количество клеток сокращается до двух, при этом они растут и достигают максимально возможных размеров к 3000 шагу расчетов. При $3,3 \leq k_a \leq 5,4$ в целом сохраняется нормальная клеточная динамика, за исключением того, что количество покоящихся клеток, соответствующих ПЦ в этом случае равно двум-трем, и общее количество клеток в среднем на одну-две больше, чем в контроле. При $k_a \geq 5,4$ полностью пропадает пул стволовых клеток, то есть колумелла состоит только из клеток в состоянии покоя и

дифференцированных клеток, которые только растут, но не слущиваются из-за слишком высокой концентрации в них ауксина.

Варьирование константы скорости деградации (k_d) показало, что изменение данной константы не влияет существенным образом на клеточную динамику. При увеличении константы на один порядок наблюдается снижение концентрации ауксина во всех клетках ансамбля, уменьшение количества клеток в ансамбле, на одну-две в среднем, и исчезновение клеток в состоянии покоя, однако процессы деления и слущивания остаются согласованными и количество клеток в системе поддерживается на постоянном уровне. При уменьшении константы на один происходит повышение концентрации ауксина во всех клетках ансамбля, увеличение количества клеток в ансамбле, на одну в среднем, и появление дополнительной клетки в состоянии покоя.

Варьирование константы скорости базового синтеза ауксина (k_s) дало аналогичные результаты. Только при этом уменьшение константы на один порядок приводило к уменьшению концентрации ауксина и всем сопутствующим изменениям, а увеличение на один порядок наоборот.

В случае же варьирования константы скорости ТАА1-зависимого синтеза ($k_{ТАА}$), как и в случае варьирования по параметру k_a , было найдено несколько режимов функционирования модели. При $k_{ТАА} \leq 2,4$ режим функционирования исследуемой системы полностью соответствовал динамике, характерной для мутантной линии *wox5-1*. При $2,5 \leq k_{ТАА} \leq 6,5$ поведение модели полностью совпадает с поведением, характерным для контроля. При $6,6 \leq k_{ТАА} \leq 11,5$ в модели образуется 1-2 дополнительные клетки в состоянии покоя и увеличивается общее количество клеток в клеточном ансамбле на 1-2 клетки, при сохранении баланса между процессами пролиферации и слущивания клеток. При $11,6 \leq k_{ТАА} \leq 14,4$ наблюдается режим функционирования, соответствующий клеточным делениям в трансгенной линии *35S::WOX5-GR* после активации дексаметазоном, с образованием большого пула мелких недифференцированных клеток и с расширенным доменом клеток в состоянии покоя в дистальной части. При $k_{ТАА} \geq 14,5$ также, как при очень больших

значениях параметра k_a , полностью пропадает пул стволовых клеток, а соответственно исчезают и деления.

Таким образом одномерная динамическая модель распределения ауксина наиболее чувствительна к изменению интенсивности потока ауксина из верхней части корня и наименее чувствительна к изменению скорости деградации и базального синтеза ауксина.

Константа скорости роста не оказывает никакого влияния на поведение динамической модели при варьировании в широких пределах: $10^{-7} \leq K_{grow} \leq 10^{-2}$.

Также модель была исследована на чувствительность к изменению пороговых значений на рост, деление и слущивание для размера и концентрации ауксина.

Уменьшение минимально допустимого для деления размера клетки (L_{div1}) приводит к увеличению среднего количества клеток в ансамбле при полном сохранении динамики, характерной для контроля, а увеличение наоборот.

При этом изменение максимально допустимого для деления размера клетки не оказывает влияния на поведение динамической модели.

Изменение порогов по ауксину на слущивание и деление клеток, s_{Det} и s_{CSC} соответственно, не приводило к нарушению баланса между процессами пролиферации и слущивания клеток в колумелле. Тем не менее, уменьшение данных параметров приводило к незначительному увеличению количества клеток в клеточном ансамбле (на 1-2 клетки). Причем при $s_{Det} \leq 0,5$ и при $s_{CSC} \leq 9,5$ происходило также появление дополнительной клетки, находящейся в состоянии покоя. В то же время увеличение порога на гибель клеток s_{Det} приводило к незначительному сокращению числа клеток в клеточном ансамбле, а увеличение порога на деление s_{CSC} не оказывало никакого влияния на поведение исследуемой системы.

Варьирование значений порога на рост клеток (s_{QC}) также не приводило к нарушениям баланса между делением и слущиванием клеток. Однако влияние изменений этого параметра на длину клеточного ансамбля было противоположным. Уменьшение s_{QC} приводило к сокращению на 1-2 клетки

количества клеток в клеточном ансамбле, а увеличение s_{QC} – к увеличению на 1-2 клетки количества клеток, причем в последнем случае происходило исчезновение клеток в состоянии покоя, в то же время стволовых клеток становилось 2, причем они делились попеременно. При этом вторая клетка, соответствующая ИК делилась чаще, чем первая, соответствовавшая ПЦ.