

Акбердин Илья Ринатович

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ МЕРИСТЕМЫ ПОБЕГА В
ЭМБРИОГЕНЕЗЕ *ARABIDOPSIS THALIANA L.*

03.01.09 – математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск

2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте цитологии и генетики СО РАН в лаборатории теоретической генетики, г. Новосибирск

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
В.А. Лихошвай
Институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск

Официальные оппоненты: Кандидат биологических наук
А. В. Кочетов
Институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск

Доктор биологических наук
М. Г. Самсонова
Санкт-Петербургский государственный
политехнический университет,
г. Санкт-Петербург

Ведущее учреждение: Институт молекулярной биологии
им.В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится “8” апреля 2010 г.

на утреннем заседании диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Д-003.011.01) в Институте цитологии и генетики СО РАН в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 10.

Тел. (383)-363-49-06*1321, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии и генетики СО РАН

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2010

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т. М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Развитие организмов является чрезвычайно сложным комплексным процессом. В результате интенсивных исследований на животных и растениях в течение последних ста лет был накоплен огромный фактический материал и достигнут прогресс в понимании многих фундаментальных законов развития: сформулирован закон Дриша, развита теория позиционной информации в морфогенетическом поле, сформулирован «принцип Кольцова», изучены молекулярные механизмы терминальных процессов дифференцировки клеток (цис- и транс-регуляторные элементы для определенного числа продуктов дифференцированных клеток) и т.д. После открытия в 50-60-х годах XX столетия основных законов кодирования и хранения информации на генетическом уровне перед биологией развития встала фундаментальная проблема выявления законов реализации генетической информации в процессе роста и развития организмов. Решение данной проблемы требует интеграции знаний из молекулярной биологии, генетики, биологии клетки, физиологии, анатомии, иммунологии, онкологии и эволюционных исследований. Комплексность проблемы, ее принципиальный междисциплинарный характер предопределяет необходимость привлечения к ее решению не только экспериментальных, но и теоретических, компьютерных методов. В области биологии развития роль теоретических методов традиционно велика. Классическими являются работы Тьюринга, разработавшего первые модели морфогенеза, основанные на физико-химических представлениях [Turing, 1952], Вольперта, сформулировавшего основные положения теории позиционной информации [Wolpert L. 1969], Регирера и Штейна, применивших к решению проблем биологии развития кинематические подходы [Регирер и Штейн, 1987] и ряд других. Именно в них были заложены теоретические основы биологии развития и предложены первые подходы для моделирования процессов развития, среди которых: теория позиционной информации, теория клеточных автоматов, механистические подходы к описанию структуры клетки и ее взаимодействия с окружающей средой и т.п. И в настоящее время данные работы не утратили значения. Подходы, предложенные в них, продолжают интенсивно развиваться и широко применяться для исследования процессов развития живых организмов.

В последнее время особенно интенсивные исследования законов развития проводятся на растениях. Основным модельным объектом является *Arabidopsis thaliana* L. Данное растение было выбрано среди остальных в качестве модельного за ряд уникальных свойств, благодаря которым оно часто называется «растительной дрозофилой». Привлекательность этого вида определяется несколькими факторами: небольшое количество хромосом в отличие от других видов высших растений (всего пять хромосом); один из самых маленьких из известных геномов у высших видов растений (125 млн. п.о.); сравнительно короткий жизненный цикл (35 дней); легко выращивается в лабораторных условиях. В настоящее время для него полностью расшифрован геном, интенсивно накапливаются данные о молекулярно-генетических процессах и о закономерностях пространственного строения на различных стадиях его жизненного цикла. Выявлены многочисленные генетические мутации,

ответственные за фенотипические аномалии в развитии растения. Ожидается, что к 2012 году будет установлена функция всех генов *A. thaliana*. Огромные массивы накопленных экспериментальных данных выдвигают в ряд актуальных проблем системной биологии построение пространственно-распределенной иерархической модели, одновременно описывающей процессы, протекающие на молекулярно-генетическом, биохимическом уровнях, и процессы, протекающие на уровне межклеточных взаимодействий: рост, деление, дифференцировка клеток с учетом их изменяющейся пространственной локализации и межклеточных контактов. Разработка такой модели позволит установить причинно-следственные связи между внутриклеточными процессами, контролируемыми генными сетями, и морфологическими характеристиками растения и его отдельных частей (тканей, групп клеток, индивидуальных клеток).

В диссертации объектом теоретического исследования является апикальная меристема побега *Arabidopsis thaliana* L. на эмбрионально-вегетативных стадиях развития.

Известно, что постэмбриональное развитие наземной части высших растений определяется активностью апикальной меристемы побега (АМП): динамической структуры, образующей листья, цветы и стебель. АМП является резервуаром стволовых клеток растительного организма и координирует процессы роста и развития растения в ответ на поступающие внешние (свет, температура) и внутренние (фитогормоны, сигнальные молекулы) сигналы. Поэтому закономерности развития наземной части растения во многом определяются механизмами развития меристем.

Гормон ауксин является низкомолекулярным соединением, производным индола, и относится к классу важнейших веществ, фитогормонов, участвующих в регуляции различных биологических процессов растений, в особенности, морфогенеза. Координация ауксином процессов роста и развития растений осуществляется через контролируемое формирование паттернов распределения ауксина и дозозависимых механизмов его действия. Выявление регуляции, действия и взаимодействий ауксина с другими фитогормонами и рецепторами является актуальной проблемой биологии развития растений. Применение технологии математического моделирования позволяет провести теоретический анализ молекулярно-генетических механизмов регуляции транспорта и распределения паттернов ауксина в развивающейся ткани; исследовать *in silico* альтернативные гипотезы относительно роли ауксина как одного из сигналов развития и сравнить их с данными, полученными *in vivo*; проанализировать влияние и роль мутаций, связанных с изменением функционирования системы метаболизма и транспорта фитогормонов, регулирующих рост и развитие растений.

Цели и задачи работы. Целью настоящей работы является изучение молекулярно-генетических механизмов метаболизма и транспорта фитогормонов, регулирующих рост и развитие апикальной меристемы побега *Arabidopsis thaliana*, методами математического моделирования и биоинформатики.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Разработка компьютерной технологии конструирования математических моделей регуляторных контуров генных сетей;
2. Реконструкция строения генной сети метаболизма ауксина – регулятора поддержания тотипотентности и дифференцировки клеток при развитии меристемы побега и разработка элементарных математических моделей подсистем генной сети;
3. Разработка математической модели внутриклеточного метаболизма ауксина с учетом генетической регуляции;
4. Разработка пространственно-распределённой модели развития меристемы побега, протекающего под контролем стволового и базального сигналов, а также сигнала дифференцировки;
5. Проведение численных экспериментов с использованием разработанных моделей и биологическая интерпретация полученных результатов.

Научная новизна и практическая ценность. В рамках диссертации разработана конвейерная технология автоматической реконструкции математических моделей молекулярно-генетических систем на основе оригинальных подходов, разработанных ранее в лаборатории теоретической генетики ИЦиГ СО РАН.

Впервые разработаны математические модели метаболизма ауксина в клетках высших и низших видов растений с помощью конвейерной технологии. Проведён компьютерный анализ динамики режимов нормального и аномального функционирования системы регуляции метаболизма ауксина; продемонстрирована адекватность теоретических расчётов к экспериментальным данным. Сравнительный анализ моделей выявил более высокую чувствительность к влиянию параметров регуляторных контуров генной сети на гомеостаз ауксина у низших видов растений по сравнению с высшими.

Впервые разработана математическая модель пространственного развития апикальной меристемы побега (АМП) *Arabidopsis thaliana* [Akberdin et al., 2007]. Математическая модель воспроизводит режимы нормального и мутантных типов развития меристемы. Впервые теоретически показано, что раннее развитие меристемы побега *Arabidopsis thaliana* в целом определяется процессами ненаправленной диффузии и транспорта сигналов, а также фиксированным положением источника базального сигнала. Процессы синтеза сигналов в клетках играют менее существенную роль. На основе модели предсказано существование точно трёх фенотипов развития АМП: фенотип дикого типа, фенотипы мутаций *cuc1 cuc2* и *wus-1*, что может объяснять отсутствие экспериментальных наблюдений других вариантов проявлений этого класса мутаций.

Теоретическая значимость результатов, полученных в диссертационной работе, состоит в том, что они предсказывают новые закономерности в функционировании системы метаболизма ауксина в клетках высших и низших растений, а также в развитии апикальной меристемы побега.

Математическая модель генной сети, контролирующей метаболизм ауксина в клетке растения, а также пространственно-распределённая математическая модель могут быть использованы для исследования

функционирования данной системы в норме и при различных патологических состояниях, для анализа особенностей развития побеговой меристемы в эмбриогенезе. Компьютерные эксперименты *in silico* могут применяться для предсказания молекулярных, генетических, морфологических особенностей функционирования систем на клеточном и тканевом уровнях, для исследования механизмов генетической регуляции синтеза и конъюгации ауксина, для анализа влияния мутаций, предсказания пространственной и временной динамики распределения различных клеток в апикальной меристеме побега, изучения пространственного распределения концентраций сигналов, а также для исследования их влияния на развитие побеговой меристемы.

Практическая значимость разработанных моделей состоит в том, что они могут быть использованы при исследовании факторов, отвечающих за переключение режимов функционирования системы на генетическом и метаболическом уровнях. Модели могут быть использованы для проведения компьютерных экспериментов по анализу функционирования системы метаболизма ауксина в клетке растения *Arabidopsis thaliana* в различных условиях внешней среды. Разработанные математические модели позволяют проводить широкий круг экспериментов *in silico*, что делает их полезным инструментом планирования экспериментов *in vivo*.

Полученные в диссертации результаты используются при чтении лекционного курса «Системная биология: математическое моделирование генных сетей».

Положения, выносимые на защиту.

1. Регуляторные контуры генной сети являются консервативными ключевыми факторами поддержания гомеостаза ауксина в клетке растения. Напротив, количество параллельных путей биосинтеза, деградации, конъюгации ауксина растет от низших видов растений к высшим.
2. Стационарная концентрация ауксина в клетках низших видов растений более чувствительна к мутациям, связанным с регуляторными контурами, чем у высших видов растений.
3. Предсказана ограниченность фенотипических проявлений в развитии апикальной меристемы побега на основе разработанной модели.
4. Развитие меристемы побега *Arabidopsis thaliana* на ранних стадиях в большей степени зависит от механизмов транспорта биологических сигналов, чем от эффективности их синтеза в клетках.
5. Существуют интервальные значения параметров транспорта и синтеза ауксина, определяющие быстрое увеличение (уменьшение) биомассы надземной части растения.

Апробация работы. Материалы работы были представлены на отчетной сессии Института цитологии и генетики СО РАН в 2006 и 2009 годах, на межлабораторных и межинститутских семинарах. Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях и семинарах: The 5th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2006, Novosibirsk, Russia, 2006); The 3rd International Conference "Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanotechnologies for Medicine" (GPBM,

Novosibirsk, Russia, 2006); II Всероссийская конференция "Инфокоммуникационные и компьютерные технологии и системы" (Улан-Удэ, Россия, 2006); VII Всероссийская конференция по математическому моделированию и информационным технологиям (Красноярск, Россия, 2006); Международная молодёжная научно-методическая конференция "Проблемы молекулярной и клеточной биологии" (Томск, Россия, 2007); The 7th Young Scientist Forum "Molecular Networks" (Vienna, Austria, 2007); The 32nd FEBS Congress "Molecular Machines" (Vienna, Austria, 2007); Moscow Conferences on Computational Molecular Biology (Москва, Россия, 2007); Третья международная конференция "Basic Science for Medicine" (Новосибирск, Россия, 2007); Всероссийская научная конференция студентов физиков ВНКСФ-13 (Ростов-на-Дону, Россия, 2007); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2008" (Москва, Россия, 2008); Шестая Международная конференция по биоинформатике регуляции и структуры генома (BGRS'2008) (Новосибирск, Россия, июнь 22-28, 2008); Международная научная конференция "Современные проблемы математического моделирования и вычислительных технологий - 2008" (Красноярск, Россия, 18-24 августа 2008); Вторая международная конференция "Математическая биология и биоинформатика" (г. Пущино Московской области, Россия, 7-13 сентября 2008); Российско-французская конференция «Проблемы и перспективы биотехнологии растений» (Новосибирск, Россия, 21-24 октября 2008); Первый Ежегодный Российский молодежный инновационный конвент (Москва, Россия, 9-10 декабря 2008); German-Russian Forum Biotechnology (Novosibirsk, June 15-19, 2009); Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина и Пятый съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 21 – 27 июня, 2009); Всероссийская конференция по вычислительной математике KBM-2009 (Новосибирск, Россия, 23-25 июня, 2009); Седьмой Международный Конгресс ISAAC (Лондон, 13 – 18 Июля, 2009); Седьмая международная конференция по компьютерным методам и системной биологии (CMSB 2009, Болонья, Италия, 31 августа – 1 сентября, 2009); Рабочий визит в исследовательские центры INRA (Версаль, Тулуза, Лион, Париж, Франция, 29 сентября – 6 октября, 2009); Третий международный конгресс Gene-2009 (Фошань, Китай, 1-7 декабря, 2009). По тематике исследования получено два свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ (Свидетельство №2008611941, апрель 2008; Свидетельство №2008612820, июнь 2008.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано: шесть работ в рецензируемых журналах, из них пять из списка ВАК. Одна публикация представлена в рецензируемой коллективной монографии, десять – в рецензируемых трудах конференций и тринадцать тезисов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (первая глава), четырех глав, содержащих основные результаты, заключения, выводов, списка литературы (259 наименований), шести приложений, а также списка используемых в работе сокращений. Материал изложен на 221 странице, содержит 43 рисунка и 18 таблиц.

Благодарности. Выражаю свою искреннюю благодарность В.А. Лихошвай, Н.А. Колчанову, Н.А. Омельянчук, В.В. Мироновой, Ф.В. Казанцеву, Е.А. Озону, Д.Н. Горпинченко, И.А. Гайновой, С.И. Фадееву, Д.П. Фурман, Т.М. Хлебодаровой, К. Д. Безматерных, Э. Мелснесу.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В разделах 1.1-1.3 обзора литературы рассмотрены особенности структурно-функциональной организации меристемы побега растения *Arabidopsis thaliana* L., особенности гормональной регуляции развития меристемы побега, а также – особенности механизмов регуляции метаболизма ауксина, контролирующих гомеостаз ауксина в клетке меристемы побега. В разделах 1.4-1.5 представлен обзор существующих математических моделей, описывающих развитие меристемы побега растения, а также описывается технология моделирования развития организма в терминах клеточных автоматов.

Научные результаты, полученные автором в ходе выполнения диссертации представлены в главах 2-5.

Глава 2. Автоматическая конвертация структуры генной сети в базу математических моделей элементарных подсистем

В главе 2 описана разработанная автором технология автоматической конвертации генной сети в базу моделей элементарных молекулярно-генетических подсистем.

Разработанная технология осуществляет автоматическую реконструкцию математических моделей элементарных подсистем генной сети, описанной в системе GeneNet [Ananko et al., 2005]. В рамках разработанной технологии генная сеть рассматривается как совокупность взаимодействующих элементарных подсистем S_1, \dots, S_n . В данном случае элементарными подсистемами являются элементарные события (реакции), описанные в стандарте базы данных GeneNet (Рис. 1). Сопоставление каждой выделенной элементарной подсистеме определенной математической модели осуществляется на основе анализа наборов входных и выходных реагентов и наборов управляющих воздействий.

Разработанная технология реализована в программном средстве MGSgenerator [Kazantsev et al., 2008], которое осуществляет автоматизированное конструирование базы математических моделей элементарных подсистем на основе подаваемой ей на вход информации о структурно-функциональной организации генной сети, аннотированной в системе GeneNet [Ananko et al., 2005]. MGSgenerator передает базу моделей на вход программным системам MGSmodeller и STEP+ [Fadeev et al., 2006]. MGSmodeller осуществляет сборку модели, а программный модуль STEP+ позволяет проводить численное исследование математических моделей, представленных автономной системой обыкновенных дифференциальных уравнений. MGSgenerator, MGSmodeller и STEP+ представляют уникальный компьютерный ресурс, обеспечивающий

конвейерный принцип работы, в котором процессы конструирования, адаптации и численного анализа модели представляют единую технологическую цепочку.

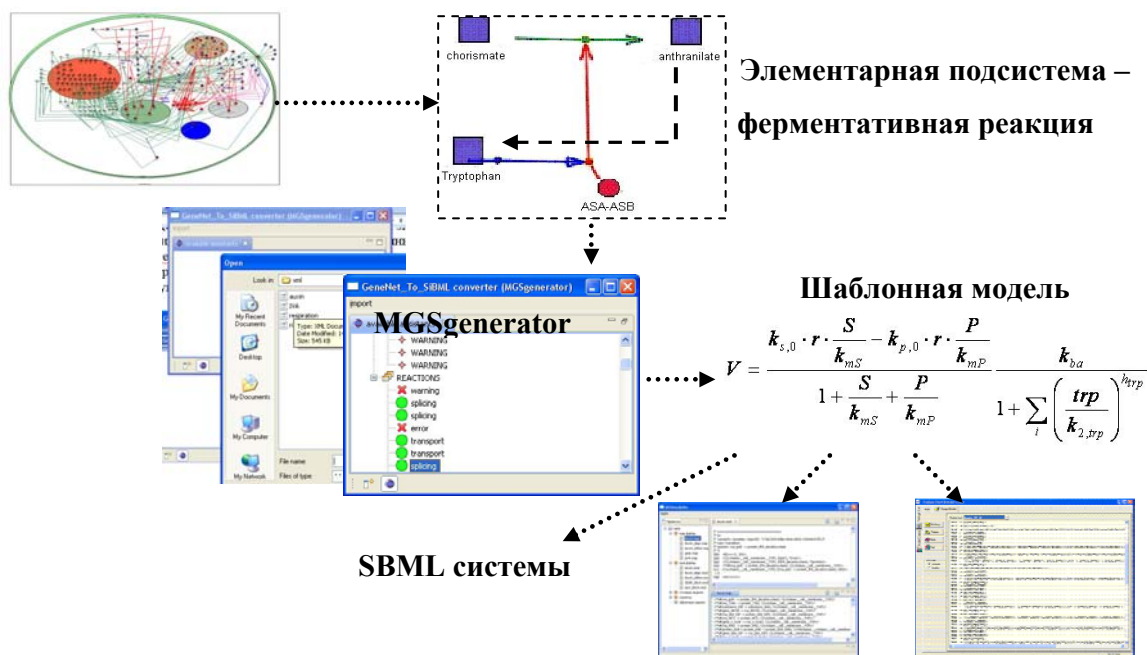


Рисунок 1. Блок-схема автоматической генерации математической модели на основе структурно-функциональной организации ГС с помощью модуля MGSgenerator и экспорт модели в различные программные средства для ее расчета и анализа. На рисунке из всей структуры геной сети рассмотрена элементарная ферментативная реакция (зеленая стрелка): превращения одного низкомолекулярного вещества в другое (синие квадраты). Данная реакция осуществляется под действием (красная стрелка) фермента (указан шаром красного цвета). Связывание третьего низкомолекулярного вещества с белком (синяя стрелка) приводит к изменению конформационной структуры фермента. В результате, белок функционирует хуже (ингибируется) и скорость ферментативной реакции уменьшается. Прерывистая линия указывает на то, что через ряд промежуточных стадий второе вещество превращается в конечный продукт. Данная структурно-функциональная организация ферментативной реакции в формате системы GeneNet является входными данными для программного модуля MGSgenerator. Для данной реакции MGSgenerator имеет собственную шаблонную модель в терминах обобщенного химико-кинетического подхода. В итоге, автоматически генерируется математическая модель для данной реакции. При этом MGSgenerator предоставляет возможность экспорта этой математической модели в форматы различных компьютерных систем: 1) поддерживающих формат SBML; 2-3) форматы программных модулей MGSmodeller и STEP+.

Глава 3. Генная сеть метаболизма ауксина в клетке меристемы побега

Третья глава посвящена описанию структурной модели геной сети метаболизма ауксина и её логическому анализу.

Компьютерная технология была протестирована при моделировании геной сети метаболизма ауксина в клетке растения. Математическая модель автоматически реконструирована на основе структуры геной сети и описывает внутриклеточную регуляцию синтеза и конъюгации ауксина, подсистемы развития апикальной меристемы побега. На начальном этапе, в рамках

диссертации, была проведена реконструкция структуры генной сети (Рис. 2). Для этого использованы данные более ста научных публикаций. Графическое представление реконструкции генной сети осуществлено в компьютерной системе GeneNet [Ananko et al., 2005]. В таблице 1 приведено количество компонентов структурной модели генной сети метаболизма ауксина (ГСМА).

Таблица 1. Количество компонентов генной сети метаболизма ауксина.

Название	Белок	РНК	Ген	Компартменты	Реакция	Метаболит
Количество	44	56	62	8	245	41

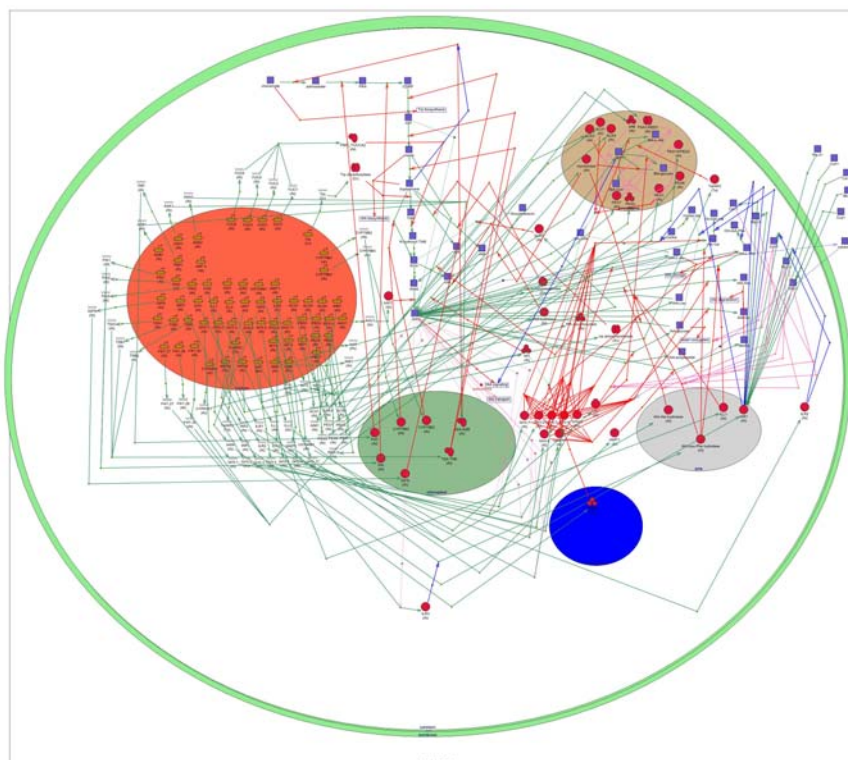


Рисунок 2. Структурная модель генной сети метаболизма ауксина.

На основе компьютерной системы GeneNet [Ananko et al., 2005] реконструирована структурная модель генной сети метаболизма ауксина с учётом генетической регуляции. Структура генной сети реконструирована на основе 107 литературных источников и содержит 62 гена (📄), 56 мРНК (🌀) и 44 белка (🔴). Данная структура генной сети включает 245 молекулярно-генетических процесса: зелёным обозначены реакции превращения, красным – ферментативный синтез, фиолетовым и синим – генетическая регуляция процессов (активация и ингибирование, соответственно). Все молекулярно-генетические процессы данной генной сети распределены в семи компартментах: цитоплазма (белый овал), клеточная мембрана (зелёный овал), ядро (красный овал), пероксисома (светло-коричневый овал), эндоплазматический ретикулум (серый овал), митохондрия (синий овал), хлоропласт (зелёный овал) и внеклеточное пространство (за пределами зелёного овала).

Выявлены характерные особенности структурно-функциональной организации генной сети метаболизма ауксина: наличие множества путей биосинтеза и конъюгации и наличие двух обратных отрицательных связей: 1)

триптофан аллостерически ингибирует ферментативную реакцию превращения хоризмата (хоризмовая кислота) в антранилат (предшественники триптофана); 2) ауксин активирует транскрипцию мРНК GH3 белков, которые являются ферментами реакций конъюгации ауксина. Существование регуляторных контуров в данной генной сети представляется вполне естественным, так как ограничивает (определяет) возможности бесконтрольного биосинтеза ауксина, который при больших концентрациях является токсичным для растения [Woodward and Bartel, 2005].

Метаболизм ауксина распределён по многим компартментам клетки (Рис. 2). Это позволяет предположить, что молекулярно-генетическая система гомеостаза ауксина в клетке растения сформировалась до образования некоторых органелл клетки. В результате эволюционных процессов происходило усложнение и компартментное распределение метаболических реакций. Данная гипотеза частично подтверждается экспериментальными наблюдениями [Cooke et al., 2002].

Основываясь на сравнении структурно-функциональной организации метаболизма ауксина у высших и низших растений [Sztein E. et al., 2000] и ГСМА, были реконструированы упрощенные (редуцированные) структурные модели генной сети метаболизма ауксина, описывающие характерные паттерны внутри клетки (а) высших (покрытосеменные, голосеменные) (ГСМАв), и (б) низших (папоротник, мхи) видов растений (ГСМАн). Сравнение структуры генных сетей метаболизма ауксина у высших и низших видов растений выявило, что их отрицательные контуры практически идентичны. В то же время, у низших растений ауксин синтезируется через единственный триптофан-зависимый путь, а у высших видов растений свободная форма ауксина образуется в результате функционирования восьми параллельных метаболических путей. Это позволяет предположить, что множественность путей биосинтеза ауксина возникла в результате последовательного усложнения структуры генной сети в ходе эволюции от низших видов растений к высшим, а регуляторные контуры возникли на более ранних этапах эволюции. В последующем регуляторные контуры оставались практически неизменными (консервативными).

Глава 4. Математическая модель метаболизма ауксина в клетке меристемы побега *Arabidopsis thaliana* L.

В четвёртой главе представлено описание результатов компьютерного моделирования и теоретического анализа динамики генной сети, контролирующей гомеостаз ауксина в клетке меристемы побега *Arabidopsis thaliana* и сравнительного анализа функционирования моделей, описывающих гомеостаз ауксина в клетках высших и низших растений.

Разделы 4.1-4.3 главы посвящены описанию математической модели метаболизма ауксина в клетке меристемы побега *Arabidopsis thaliana* L., в них приводятся результаты адаптации математической модели к экспериментальным данным и ее анализа. В частности, демонстрируется, что в клетках *in silico* свободная форма ауксина и его эстрифицированная форма составляют <1% и 4% от общего пула ауксина, соответственно. Оставшийся пул ауксина (95%) составляют амидные формы ауксина (Рис. 3). Полученные характеристики модели в точности соответствуют экспериментальным данным [Park et al., 2001].

Численно показано, что в модификациях адаптированного варианта модели, соответствующих мутантам арабидопсиса *trp3-1* и *trp2-1*, имеющим нарушения в триптофан-синтазах α и β , соответственно, повышается содержание амидных форм ауксина, несмотря на низкий уровень триптофана. Из полученных расчетов следует, что нарушение функции триптофан-синтазы мутацией *trp3-1* более сильно сказывается на изменении содержания амидных форм ауксина, по сравнению с изменениями, вызываемыми двойным мутантом *trp3-1 trp2-1* данного фермента. Полученный результат теоретически объясняет важность функциональной активности триптофан-синтазы α , вне комплекса с β субъединицей при производстве индола, предшественника ауксина [Frey et al., 2000].

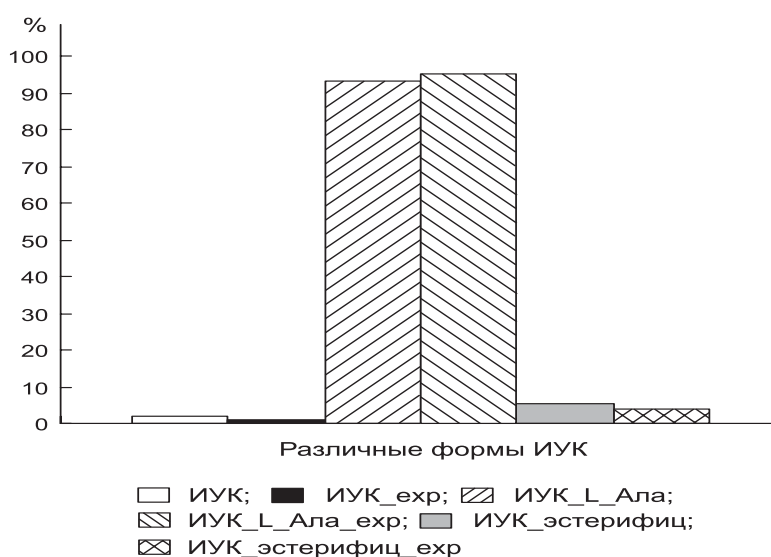


Рисунок 3. Результаты моделирования процентного содержания различных форм ауксина в клетке меристемы побега. По оси у – проценты, по оси х – форма ИУК (индол-3-уксусная кислота или ауксин). Эспр – процентное содержание формы ауксина из экспериментальных данных.

В разделе 4.4 диссертации проведен сравнительный численный анализ математических моделей, описывающих метаболизм ауксина у высших и низших видов растений. Начальные значения большинства переменных и параметров моделей взяты из литературных источников [Bandurski and Schulze, 1977; Momonoki et al., 1983; Davies et al., 1999; Normanly and Bartel, 1999; Mikkelsen et al., 2000; Park et al., 2003]. Остальные значения были оценены на основе косвенных экспериментальных данных и биологических представлениях о природе и механизмах регуляции молекулярно-генетической системы метаболизма ауксина в клетке растения.

Расчёты динамики изменения концентрации ауксина, триптофана и белка GN3 для моделей приведены на рисунках 4 и 5. Как видно из рисунков с течением времени кривые выходят на устойчивый стационар (Рис. 4, 5). Численно, а также методом продолжения по параметру в положительной области значения переменных другие аттракторы не выявляются. Устойчивость стационарных решений подтверждалась методом Годунова-Булгакова. Полученные численно результаты согласуются с биологической природой

моделируемых генных сетей, назначение которых состоит в поддержании гомеостаза целевого продукта (ауксина). Расчеты также показывают, что усложнение генетической системы, описывающей метаболизм ауксина в высших растениях, по сравнению со строением генетической системы, описывающей данный процесс в низших растениях, не приводит к качественному изменению ее динамических характеристик. В то же время расчеты показали, что на количественном уровне две модели различаются достаточно сильно. Например, стационарное значение концентрации свободной формы ауксина, рассчитанное для клетки низших видов растения (0.1446 mM) на два порядка больше, чем аналогичная концентрация, рассчитанная для клетки высших видов растений (0.00992 mM). Полученный результат согласуется с экспериментальными данными [Sztejn E. et al., 2000]: у низших видов растений (харофиты, папоротники) наблюдается высокое содержание свободной формы ауксина (до 30 процентов от общего пула форм ауксина), у высших видов растений (голо- и покрытосеменные), в свою очередь, наблюдается очень низкое содержание свободной формы ауксина.

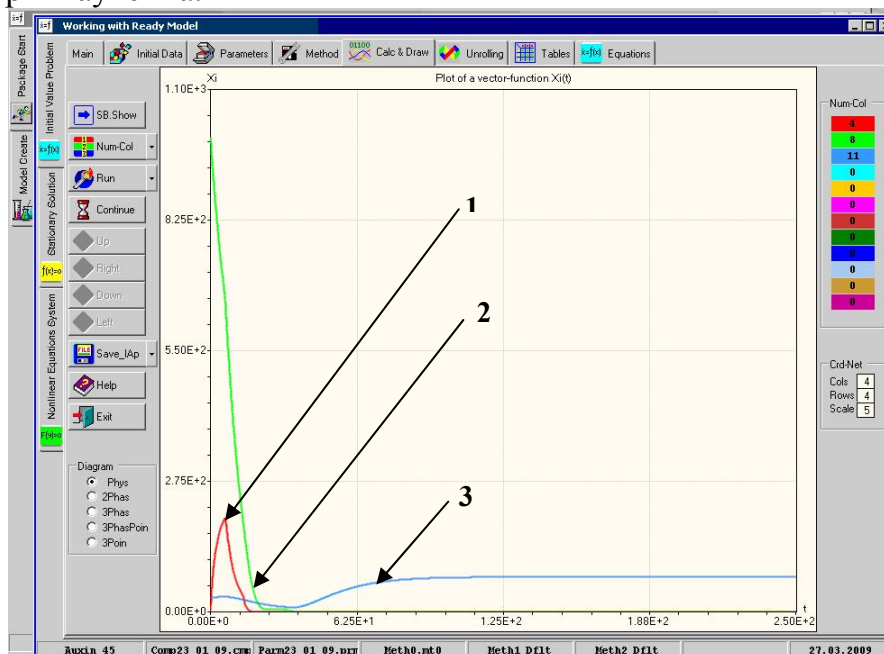


Рисунок 4. Динамика изменения концентрации в модели ГСМАв: 1) ауксина; 2) триптофана; 3) белка GH3. По оси y – концентрация (mM), по оси x – время (сек.).

Сравнительный анализ зависимости стационарного решения от изменения значений параметров был проведен для двух математических моделей метаболизма ауксина, описывающих исследуемую молекулярно-генетическую систему у высших и низших классов растений, соответственно. Характерным отличием в структурно-функциональной организации генной сети метаболизма ауксина у низших видов растений от одноименной генной сети у высших видов растений является отсутствие множественных путей биосинтеза и конъюгации ауксина, что приводит к усилению роли регуляторных контуров (обратных связей) в поддержании гомеостаза ауксина. Результаты анализа чувствительности математических моделей к варьированию параметров подтверждают данный вывод.

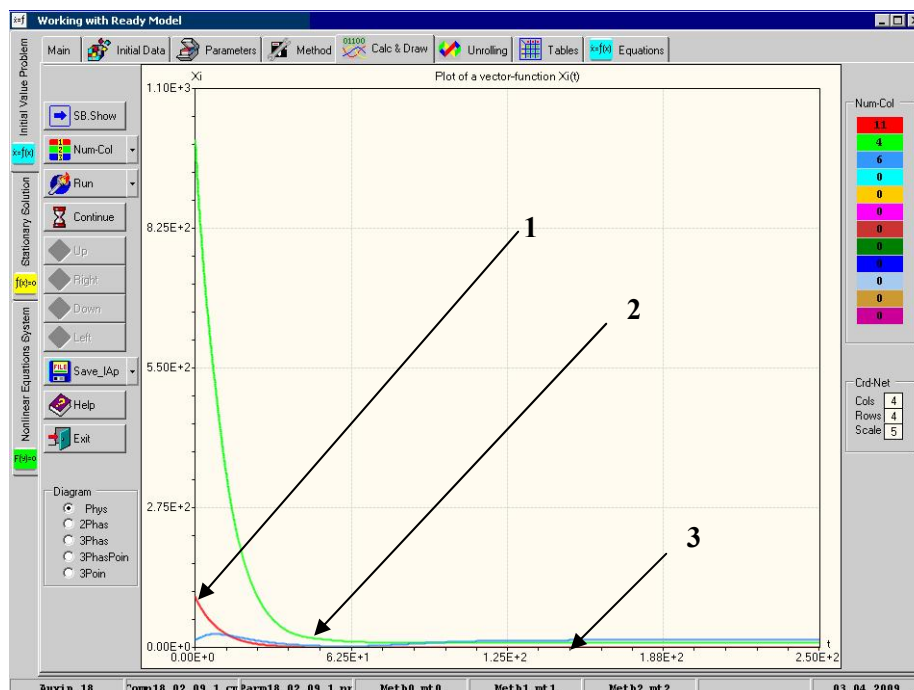


Рисунок 5. Динамика изменения концентрации в модели ГСМАН: 1) ауксина; 2) триптофана; 3) белка GH3. По оси y – концентрация (mM), по оси x – время (сек.).

Глава 5. Математическая модель развития меристемы побега *Arabidopsis thaliana L.* в терминах клеточного автомата

Пятая глава посвящена описанию математической модели развития меристемы побега *Arabidopsis thaliana L.* в терминах клеточного автомата. В ней дается описание принципов, заложенных в структуру математической модели, технология верификации параметров модели и описание анализа чувствительности параметров математической модели.

Разработанная в данной работе модель принадлежит классу LGCA моделей, и представляет собой двумерный клеточный автомат, каждая клетка которого является аналогом клетки эмбриона *Arabidopsis thaliana*. Основная идея модели состоит в том, что клетки автомата способны воспринимать и, в зависимости от типа, продуцировать сигналы, влияющие на развитие зародыша в модели. Таким образом, какое-либо конкретное развитие модельного зародыша есть результат взаимодействия всех клеток ткани. В этом смысле, можно провести аналогию с понятием самосогласованного поля, которое используется в физике твердого тела. Т.е. поведение клетки определяется локальной концентрацией и градиентом химического поля, в свою очередь, каждая клетка вносит вклад в это химическое поле. Сигналы, используемые в модели, имеют биологическую природу и являются аналогами растительных гормонов (ауксин и цитокинин), низкомолекулярных веществ, влияющих на рост и развитие растения. В зависимости от типа продуцируемого сигнала, клетки автомата были разделены на несколько типов, каждый из которых определен на основе анализа экспериментальных данных в базе AGNS [Omelyanchuk, 2005].

Как уже отмечалось выше, клетки взаимодействуют друг с другом посредством сигналов, которые диффундируют в ткани. В данной работе предложено два подхода математического описания данного процесса.

Первый подход основывается на предположении, что скорость диффузии в ткани настолько велика, что время, за которое установится стационарное состояние, пренебрежимо мало по сравнению с характерным временем системы, т.е. средним периодом деления клеток. Исходя из этого предположения, можно рассматривать только стационарное распределение сигналов в ткани. Отметим, что распределение сигналов все же является квазистационарным, поскольку деление хотя бы одной клетки приведет к изменению распределения.

Второй подход к расчету диффузии сигналов учитывает конечность скорости их распространения и заключается в расчете для каждой клетки системы автономных нестационарных дифференциальных уравнений.

Развитие меристемы растения в эмбриогенезе характеризуется сочетанием процессов лавинообразного развития дифференцирующейся ткани и стабильного развития стволовых клеток ткани. В ходе исследования было продемонстрировано, что разработанная модель качественно описывает оба этих процесса (Рис. 6).

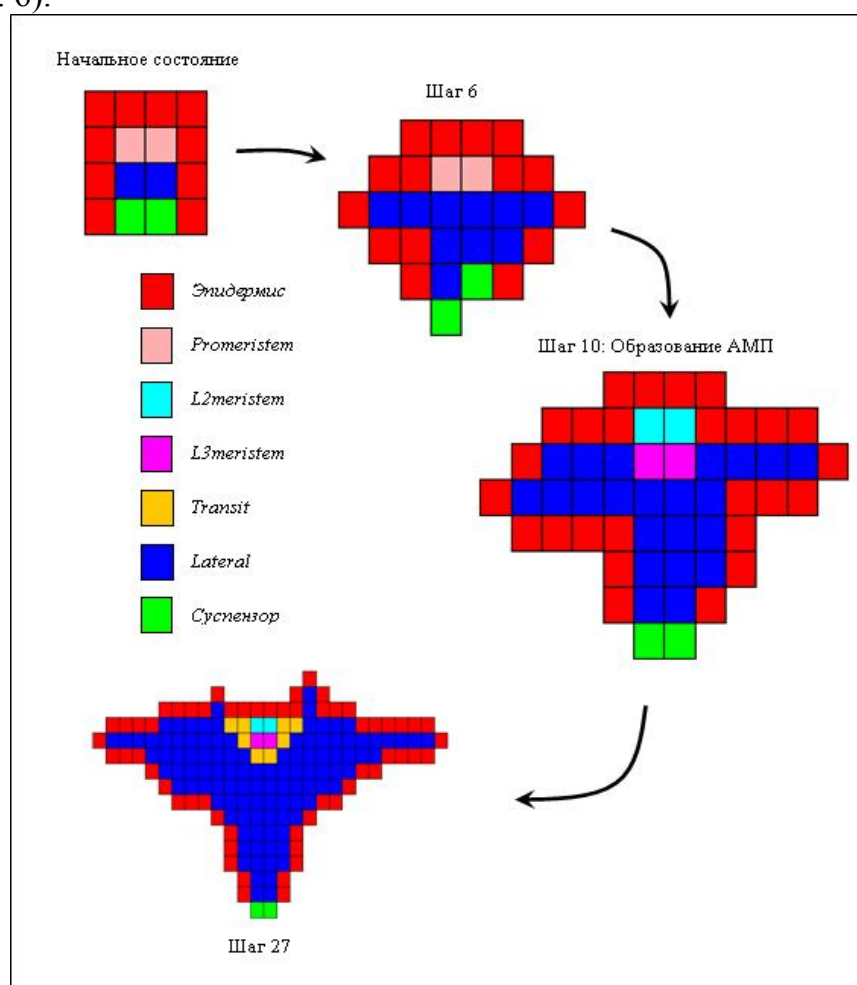


Рисунок 6. Развитие зародыша дикого типа: «Эпидермис, Promeristem, L2-L3meristem, Transit, Lateral, Суспензор» – типы клеток апикальной меристемы побега (АМП). На рисунке отражены стадии развития меристемы побега *in silico*, в точности соответствующие экспериментальным данным на количественном (количество клеток различных типов на каждой стадии развития) и качественном уровнях (структура меристемы, локализация клеток различных типов в развивающейся АМП).

Численными исследованиями установлено, что математическая модель имеет только три различных фенотипа развития, которые качественно соответствуют известным фенотипам, описанным для реального зародыша.

Тот факт, что модель воспроизводит качественные и количественные характеристики развития эмбриона, вплоть до торпедной стадии, позволяет предположить, что на ранних стадиях развития основное значение играет ненаправленный транспорт фитогормонов. Однако, начиная с торпедной стадии, области некорректного поведения модели, необходимо учитывать механизм направленного активного транспорта.

При исследовании чувствительности пространственной модели развития к различным параметрам, была выявлена их роль в развитии зародыша растения по сценариям, соответствующим дикому и мутантным фенотипам. Было показано, что изменение значений параметров, ответственных за транспорт морфогенов, сильнее влияет на развитие меристемы *in silico*, по сравнению с параметрами, влияющими на их биосинтез (Рис. 7). Биологически значимая интерпретация данного теоретического результата состоит в том, что мутации, приводящие к нарушению транспорта морфогенов, проявляются гораздо сильнее, чем мутации, нарушающие биосинтез. Этот вывод подтверждается литературными данными [Cooke et al., 2002].

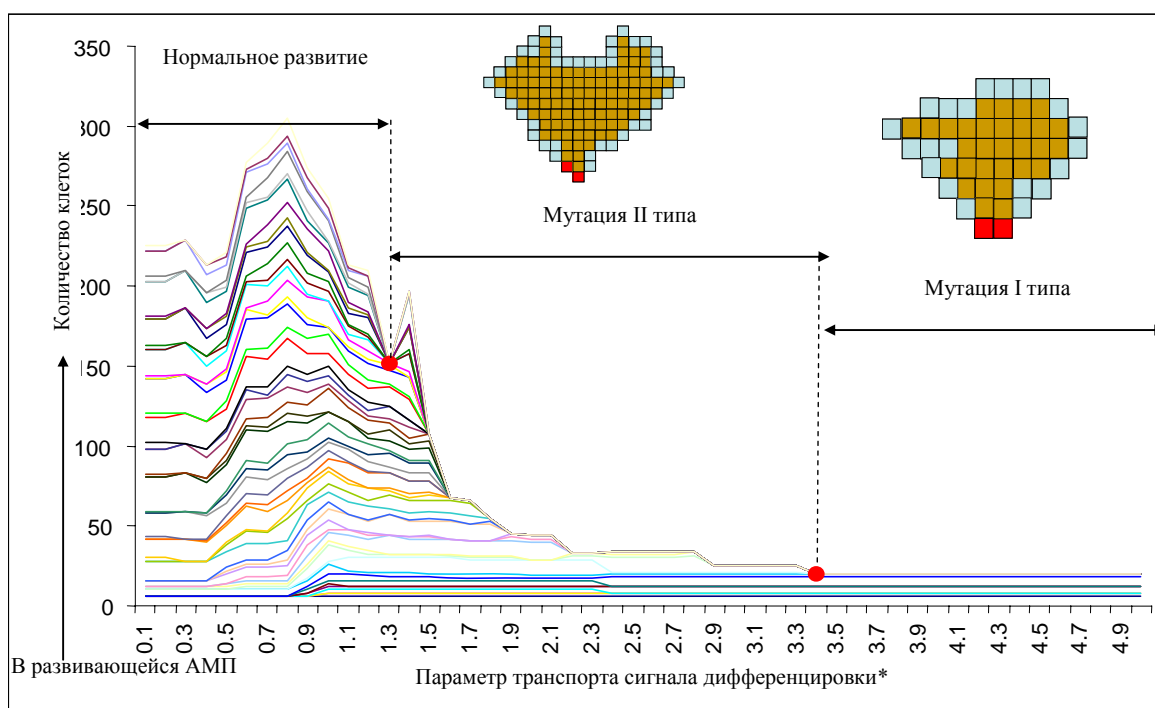


Рисунок 7. Анализ чувствительности модели к параметру транспорта сигнала дифференцировки (ауксина). По оси у – количество клеток в развивающейся АМП, по оси X – значение параметр транспорта в усл. ед. Изменение параметра производилось от 0,1 до 5 с шагом 0,1. Для каждого значения параметра рассчитывалось 50 шагов автомата. Каждая кривая – это зависимость количества клеток на определенном шаге автомата от параметра транспорта сигнала дифференцировки, т.е. самая верхняя кривая соответствует 50 шагу автомата, ниже следует 49 шаг и т.д.

Вывод о чувствительности развивающейся апикальной меристемы побега к параметрам транспорта видится достаточно естественным, поскольку их изменение (в результате мутаций) ведет к кардинальным изменениям формы распределения морфогенов в ткани. С другой стороны, нарушения процессов биосинтеза, при нормальном транспорте, ведут только к относительным изменениям концентраций сигналов, но не к изменению формы их распределения.

Разработанная на основе таких простых предположений математическая модель хорошо описывает качественные, количественные, пространственные особенности развития апикальной меристемы побега на ранних стадиях эмбриогенеза (вплоть до торпедной стадии). Однако в дальнейшем развитие модели подразумевает учет более сложной геометрии взаимодействия клеток, учет молекулярных процессов, контролирующих активный транспорт морфогенов и генетических процессов, регулирующих биосинтез и утилизацию морфогенов. Расширение модели позволит изучить причинно-следственные связи, которые ведут от молекулярно-генетических процессов, протекающих внутри каждой клетки, к формированию определенных морфологических и фенотипических характеристик развивающейся апикальной меристемы побега, что приведет к новым биологически содержательным результатам.

Несмотря на «простоту» принципов (типы клеток, параметры клеток и т.д.), которые являются основой пространственно-распределенной модели, клеточный автомат позволяет описать ряд феноменологических экспериментальных наблюдений и предоставляет возможности изучать мутантные фенотипы *in silico*. С другой стороны, модель, описывающая внутриклеточный метаболизм ауксина, является, в определенном смысле, более комплексной и «сложной» по структуре. В отличие от пространственно-распределенной модели, данная модель описывает молекулярно-генетические процессы, протекающие на внутриклеточном уровне. Сравнительный анализ генетической сложности структуры генной сети метаболизма ауксина и простоты учтенных в пространственно-распределенной модели процессов транспорта ауксина между клетками позволяет сделать важный теоретический вывод, состоящий в том, что на ранних стадиях развития меристемы побега ключевым фактором для формирования морфологии меристемы побега является транспорт ауксина, а сложность генетической регуляции его биосинтеза на пространственном уровне не проявляется.

Выводы

1. Разработана компьютерная технология автоматического конструирования математических моделей генных сетей на основе их структурно-функциональной организации.
2. Реконструирована генная сеть метаболизма ауксина в клетке побега *Arabidopsis thaliana* L., при анализе которой показано, что регуляторные контуры идентичны для низших и высших классов растений, то есть они являются консервативными ключевыми факторами поддержания гомеостаза ауксина, тогда как количество параллельных путей биосинтеза, конъюгации, деградации ауксина растет от низших видов растений к высшим.

3. Разработана математическая модель метаболизма ауксина в клетке меристемы побега *Arabidopsis thaliana* L., которая адекватно воспроизводит экспериментальные данные.
4. Параметрический анализ чувствительности математических моделей метаболизма ауксина у высших и низших видов растений показал, что у низших растений стационарная концентрация ауксина более чувствительна к мутациям, затрагивающим регуляторные контуры.
5. Разработана пространственно-распределённая математическая модель развития меристемы побега *Arabidopsis thaliana* L., которая воспроизводит пространственное распределение ауксина в процессе развития апикальной меристемы побега, режимы нормального и аномального развития меристемы, соответствующие фенотипам дикого типа и мутантам *cuc1 cuc2*, *wus-1* и предсказывает отсутствие других фенотипических проявлений в развитии апикальной меристемы побега.
6. Показано, что развитие меристемы побега *Arabidopsis thaliana* L. на ранних этапах обеспечивается ненаправленной диффузией базального и стволового сигналов, сигнала дифференцировки при условии фиксированного положения клеток суспензора, причем эффективность синтеза сигналов слабо влияет на характеристики развивающейся апикальной меристемы побега.
7. Предсказано существование интервальных значений параметров синтеза и транспорта ауксина, определяющих быстрое увеличение (уменьшение) биомассы надземной части растения.

Список публикаций по теме диссертации в рецензируемых изданиях

1. **Акбердин И.Р.**, Ozonov E A., Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Likhoshvai V.A., Gorpichenko D.N., Kolchanov N.A. (2006). A cellular automaton model of morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. **Биофизика**, Том 51, **1**, стр. 91-94.
2. **Акбердин И.Р.**, Ozonov E A., Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Likhoshvai V.A., Gorpichenko D.N., Kolchanov N.A. (2007). A cellular automaton to model the development of primary shoot meristems of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, Vol. 5, **02B**, pp. 641-650. PMID: 17636867.
3. **Ива Р. Акбердин**, Evgeniy A. Ozonov, Victoria V. Mironova, Nadezda A. Omelyanchuk, Vitaly A. Likhoshvai, Dmytry N. Gorpichenko, Nikolai A. Kolchanov (2007). Mathematical model of the *Arabidopsis thaliana* L. morphogenesis in a cellular automaton terms. **FEBS Journal**, Vol. 274, **1**, pp. 134.
4. Омелянчук Н.А., Миронова В.В., Залевский Е.М., Подколотный Н.Л., Пономарев Д.К., Николаев С.В., **Акбердин И.Р.**, Озонов Е.А., Лихошвай В.А., Фадеев С.И., Пененко А.В., Лавреха В.В., Зубаирова У.С., Колчанов Н.А. Морфогенез растений: реконструкция в базах данных и моделирование // Системная компьютерная биология, 2008, Издательство СО РАН, Новосибирск, глава 6, стр. 539-587.
5. **Акбердин И.Р.**, Казанцев Ф.В., Омелянчук Н.А., Лихошвай В.А. (2009). Математическое моделирование метаболизма ауксина в клетке меристемы побега растения. **Информационный Вестник ВОГиС**, Том 13, №1, стр. 170-176.

6. Казанцев Ф.В., **Акбердин И.Р.**, Безматерных К.Д., Лихошвай В.А. (2009). Система автоматизированной генерации математических моделей генных сетей. **Информационный Вестник ВОГиС**, Том 13, №1, стр. 163-170.
7. Лихошвай В.А., Омелянчук Н.А., Миронова В.В., Казанцев Ф.В., **Акбердин И.Р.**, Королев В.К., Фадеев С.И., Колчанов Н.А. (2009). Моделирование регуляции ауксином инициации латеральных органов у *Arabidopsis thaliana* L. **Информационный Вестник ВОГиС**, Том 13, №1, стр. 176-186.
8. **Акбердин И.Р.**, Казанцев Ф.В., Лихошвай В.А., Фадеев С.И., Гайнова И.А., Королев В.К., Медведев А.Е. (2009). Компьютерная система интеграции модулей для автоматической генерации и численного анализа математических моделей молекулярно-генетических систем. **Сибирские Электронные Математические Известия**, Том 6, стр. 440-456.

Подписано к печати 18.02.2010 г.

Формат бумаги 60 x 90 1/16. Печ. 1 л. Уч. Изд. 07

Тираж 100 экз. Заказ 5

Ротапринт Института цитологии и генетики СО РАН

630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10.