

УДК 57.032:577.38:5-76

МОДЕЛИ РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРЫ НИШИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЕ ПОБЕГА

© 2013 г. У.С. Зубаирова, С.В. Николаев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: ulyanochka@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 15 августа 2013 г. Принята к публикации 5 сентября 2013 г.

Экспериментальные данные, полученные к настоящему времени, привели к определенным представлениям о регуляции ниши стволовых клеток в апикальной меристеме побега. Для проверки непротиворечивости этих представлений и их согласованности с экспериментальными данными применяется математическое моделирование. В статье рассматриваются математические модели регуляции ниши стволовых клеток в апикальной меристеме побега, предложенные разными авторами; анализируются экспериментальные основания и рабочие гипотезы, формализованные в этих моделях, и выявляются методические различия в подходах к построению этих моделей.

Ключевые слова: апикальная меристема побега, ниша стволовых клеток, CLAVATA3, WUSCHEL, математическая модель.

ВВЕДЕНИЕ

Все органы взрослого растения формируются из апикальной меристемы побега (АМП), находящейся на кончике каждого вегетативного побега. АМП является одной из важнейших структур для роста и развития, так как именно здесь находится ниша стволовых клеток, дающих начало всем клеткам наземной части растения (Sharma *et al.*, 2003).

Несмотря на то что АМП имеет небольшие размеры, ее структура достаточно сложна. Выделяют зоны (Newman, 1965) и области клеток, отличающиеся по своим свойствам и функциям, маркированные экспрессией определенных генов и находящиеся в определенном пространственном расположении друг относительно друга на протяжении всей жизни растения (Bowman, Esched, 2000; Brand *et al.*, 2001; Traas, Doonan, 2001). В АМП выделяют следующие зоны (Gross-Hardt, Laux, 2003; Lenhard, Laux, 2003; Kwiatkowska, 2004): центральная (ЦЗ), периферическая (ПЗ), риб-зона (РЗ), зона листовых примордиев (ЛП), а также организационный центр (ОЦ). В ЦЗ содержится запас стволовых клеток, которые в

процессе деления вытесняются в ПЗ и РЗ, клетки в этой зоне характеризуются низкими темпами деления. ПЗ является переходной зоной, клетки здесь делятся быстрее, в дальнейшем клетки из ПЗ переходят в ЛП, РЗ или зону между зачатками листьев. Как и ПЗ, ОЦ также является переходной зоной, она лежит непосредственно под ЦЗ и имеет важную функцию в поддержании ее размеров. Клетки, вытесненные из ОЦ, переходят в РЗ, где образуют сосудистую систему и паренхиму стебля.

Помимо этих зон в структуре АМП также выделяют 3 слоя: L1 (эпидермис), L2 (субэпидермис) и L3 (кортекс). Клетки слоев L1 и L2, которые также называют туникой, делятся в основном антиклинно, обеспечивая поверхностный рост организма. Клетки L3 не имеют определенного направления деления и тем самым обеспечивают объемный рост организма. Рост и деление клеток приводят к потоку клеток из ЦЗ в ПЗ и ОЦ и далее по корпусу АМП. Однако, несмотря на такой поток клеток, положения зон относительно верхушки АМП остаются постоянными.

В результате гистоморфологического и клонального анализов было выяснено, что

стволовые клетки расположены в трех верхних слоях АМП (L1, L2, L3), концентрируясь вокруг ее центральной оси (Gross-Hardt, Laux, 2003; Lenhard, Laux, 2003; Kwiatkowska, 2004).

К настоящему времени у *A. thaliana* выявлен ряд генов, мутации которых приводят к изменению структуры АМП и ниши стволовых клеток в ней. Так, характерной особенностью клеток ЦЗ является экспрессия гена *CLV3*, а в клетках ОЦ наблюдается экспрессия гена *WUS* (Yadav *et al.*, 2009). В клетках ОЦ и его ближайшего окружения наблюдается экспрессия генов *CLV1* и *CLV2*, продуктами которых являются субъединицы гетеродимерного рецепторного комплекса *CLV1/CLV2*, локализованного на клеточной мембране (Schoof *et al.*, 2000; Williams, Fletcher, 2005). Показано, что образующийся в результате процессинга белка *CLV3* короткий пептид выходит из клетки, связывается с *CLV1/CLV2* в клетках вокруг ОЦ и подавляет в этих клетках экспрессию гена *WUS* (Schoof *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 2002; Lenhard, Laux, 2003; Ogawa *et al.*, 2008). Связывание пептида *CLV3* с *CLV1/2* в клетках, окружающих ОЦ, приводит к снижению его поступления в клетки ОЦ, в результате чего в норме в клетках ОЦ наблюдается экспрессия гена *WUS* (Lenhard, Laux, 2003). Белок *WUS* перемещается в клетки ЦЗ и активирует в них экспрессию гена *CLV3* посредством прямого контроля транскрипции (Yadav *et al.*, 2011).

Несмотря на приведенные выше данные, вопрос о механизме регуляции пространственной структуры ниши стволовых клеток в апикальной меристеме побега растения остается открытым. Механизмы, обеспечивающие постоянство структуры АМП, являются предметом интенсивных исследований, как экспериментальных, так и теоретических. Результатом большой экспериментальной работы на протяжении последних 30 лет являются данные о роли отдельных генов в развитии растения. В частности, показано, что отрицательная обратная связь между генами *CLV3* и *WUS* играет центральную роль в поддержании структуры ниши стволовых клеток АМП (Barton, 2010; Sablowski, 2011). К настоящему времени разными авторами (Jönsson *et al.*, 2003, 2005; Николаев и др., 2006, 2007, 2010, 2013; Geier *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2009; Hohm *et al.*, 2010; Fujita *et al.*, 2011; Sahlin *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2011, 2013; Chickarmane *et al.*, 2012; Чуб,

Синюшин, 2012) предложены математические модели регуляции ниши стволовых клеток в АМП, ядром которых является генная сеть, описывающая взаимодействие между генами *CLV3* и *WUS*.

Схемы рассматриваемых в данном обзоре моделей (Hohm *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2011; Chickarmane *et al.*, 2012; Николаев и др., 2013) регуляции пространственного паттерна экспрессии генов *CLV3* и *WUS* представлены на рис. 1 в единообразной форме.

Модели базируются на двух типах экспериментальных данных. Во-первых, это данные о взаимодействии генов и их продуктов, получаемые в молекулярно-генетических экспериментах. Другой тип экспериментальных данных – это пространственное расположение зон экспрессии генов в АМП. Соответственно, исходные предположения, формализуемые в моделях, основаны на представлениях о механизмах взаимодействия генов, природе регуляторных сигналов с учетом данных молекулярно-генетических экспериментов и механизме распространения этих сигналов между клетками. Выходные данные этих моделей – пространственное расположение зон экспрессии генов в АМП, которое можно сравнить с экспериментально наблюдаемым. Важным аспектом моделируемой системы является также постоянство зон, несмотря на деление клеток в АМП.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНА *WUS* В РЕГУЛЯЦИИ НИШИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В АМП (Jönsson *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2011, 2013)

В статье Н. Jönsson с соавт. (2005) была рассмотрена модель позиционирования экспрессии гена *WUS* на двумерном клеточном ансамбле с центральной симметрией. Благодаря симметрии оказалось естественным поместить в «морфологически выделенный» внешний слой клеток некоторый репрессор для гена *WUS*. Модель воспроизводит локализацию экспрессии *WUS* в центре клеточного ансамбля, а также результаты экспериментов, в которых наблюдалось возобновление экспрессии *WUS* после лазерного разрушения ОЦ.

Компьютерная модель (Yadav *et al.*, 2011) объясняет важность поддержания градиента

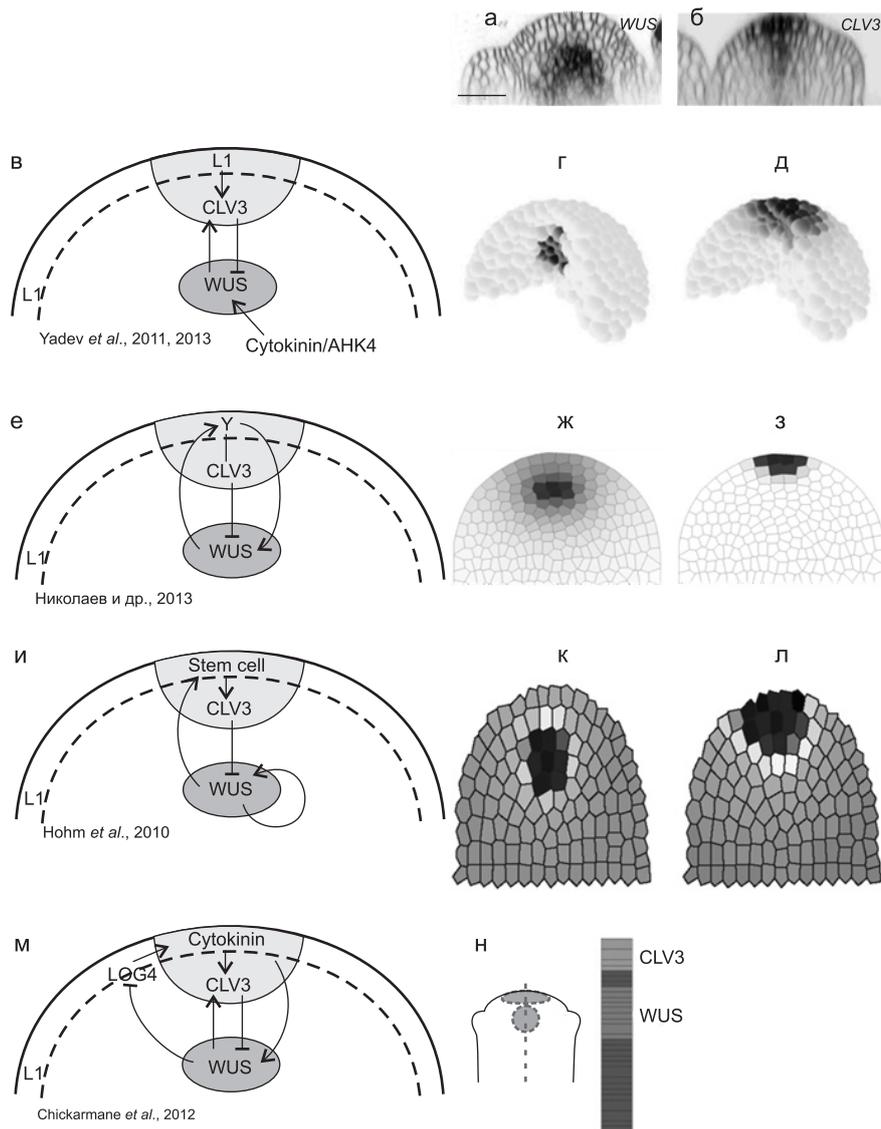


Рис. Модели регуляции структуры ниши стволовых клеток АМП.

Схемы взаимодействия (в, е, и, м – первая колонка) и решения распределения концентраций (г, д, ж, з, к, л, н – вторая (для гена *WUS*) и третья (для гена *CLV3*) колонки) для основных компонент моделей; а, б – распределения экспрессии генов *WUS* (фотография взята из работы (Yadav *et al.*, 2009)) и *CLV3* (фотография взята из работы (Reddy, Meyerowitz, 2005)); в, г, д – модель (Yadav *et al.*, 2011); е, ж, з – модель (Николаев и др., 2013); и, к, л – модель (Hohm *et al.*, 2010) и (м, н) модель (Chickarmane *et al.*, 2012).

белка **WUS** в регуляции ниши стволовых клеток. Модель (схема модели – рис., в): учитывает прямую активацию транскрипции *CLV3* белком *WUS* (Yadav *et al.*, 2011) и отрицательную регуляцию *WUS* сигналом *CLV3*, который происходит из ЦЗ (Brand *et al.*, 2000, 2002; Schoof *et al.*, 2000). Дополнительно *WUS* активируется локальным сигналом цитокинина (Jönsson *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2009; Hohm *et al.*, 2010), а также для активации *CLV3* используется дополнительный

гипотетический сигнал, происходящий из клеток слоя L1 (Jönsson *et al.*, 2003).

Геометрия АМП описывается в модели как верхняя треть трехмерной сферы, заполненная 1366 пересекающимися сферическими клетками. Клетки считаются соседними (т. е. между ними осуществляется транспорт), если соответствующие сферы пересекаются. Начальное распределение экспрессии генов *CLV3* и *WUS* строится на основе микрофотографии. Экспрес-

сия *CLV3* в клетках ЦЗ на верхушке меристемы (55 клеток) и экспрессия *WUS* в клетках ОЦ под ЦЗ (42 клетки) задаются равными единице.

Для описания регуляции транскрипции используются функции Хилла; синтез белков линейно зависит от уровня РНК. РНК и белки распадаются, распространение *CLV3* и *WUS* между клетками описывается как пассивный транспорт. Модель представлена следующей системой уравнений:

$$\frac{d[C]}{dt} = V_C \frac{[a1]^n}{k_{a1/C}^n + [a1]^n} \frac{[w]^n}{k_{w/C}^n + [w]^n} - g_C[C],$$

$$\frac{d[c]}{dt} = P_C[C] - g_C[c] + D_C \Delta[c],$$

$$\frac{d[W]}{dt} = V_W \frac{[a2]^n}{k_{a2/W}^n + [a2]^n} \frac{k_{c/W}^n}{k_{c/W}^n + [c]^n} - g_W[W],$$

$$\frac{d[w]}{dt} = P_w[W] - g_w[w] + D_w \Delta[w],$$

$$\frac{d[a1]}{dt} = P_{a1}[A1] - g_{a1}[a1] + D_{a1} \Delta[a1],$$

$$\frac{d[a2]}{dt} = P_{a2}[A2] - g_{a2}[a2] + D_{a2} \Delta[a2],$$

где $[X]$ и $[x]$ обозначают, соответственно, концентрации мРНК и сигнальных молекул (белка для *WUS* и пептида для *CLV3*); Δ – дискретный оператор Лапласа, описывающий пассивный транспорт (основанный на градиенте концентраций). C обозначает *CLV3*, W – *WUS*. Значения $A1$ и $A2$ являются константами, равными единице, в клетках эпидермиса (внешний слой L1) и ОЦ соответственно.

В результате оптимизации были найдены такие значения параметров, при которых решение модели (рис., г, д) соответствует экспериментально наблюдаемым зонам экспрессии генов *CLV3* и *WUS* на трехмерной ткани.

Расчеты были произведены с использованием пакета Organism (<http://dev.thep.lu.se/organism>), использующего метод Рунге–Кутты 5-го порядка с адаптивной сеткой.

Следующая реализация модели **Yadav с соавт.** (2013) учитывает непосредственную регуляцию транскрипции гена *KANI* белком *WUS*. *KANI* считается одним из генов периферической зоны, непосредственно репрессуемым транскрипционным фактором *WUS* (Kerstetter *et al.*, 2001; Yadav *et al.*, 2013). Дополнительно ген *KANI* активируется неким гипотетическим сигналом из слоя L1 (так же, как *CLV3* в предыдущем ва-

рианте модели). Правомерность такой активации объясняется тем, что когда *WUS* не диффундирует, зона экспрессии *KANI* расположена близко к внешнему слою (L1) меристемы.

Отметим, что в модели используются два дополнительных геометрических ограничения на зоны возможной экспрессии генов: 1) дополнительный фактор активации для *WUS*, представляющий рецепторы АНК4, расположенный в ОЦ; 2) дополнительный фактор активации для *CLV3*, представляющий гипотетические эпидермальные сигналы, расположенный во внешнем слое клеток (L1). Оба ограничения моделируются как гены, т. е. экспрессия гипотетического гена приводит к синтезу сигнальных молекул, которые диффундируют и создают градиент концентрации.

МОДЕЛЬ РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРЫ НИШИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В АМП (Николаев и др., 2007, 2010, 2013)

Приведенные выше опубликованные экспериментальные данные о роли системы *CLV3/WUS* в регуляции структуры ниши стволовых клеток АМП представлены в модели (Николаев и др., 2013) в виде следующих постулатов (схема модели – рис., е):

1. Имеется ген Y , экспрессия которого разрешена только в слое L1. Продукт экспрессии этого гена (белок Y) диффундирует по АМП с одновременным распадом, в результате чего устанавливается некоторое стационарное неоднородное распределение его концентрации.

2. Экспрессия генов *CLV3* и *WUS* активируется белком Y . При этом порог активации для *CLV3* выше, чем для *WUS*. В результате этого нижняя граница зоны экспрессии гена *CLV3* располагается ближе к верхушке АМП (к слою L1), чем нижняя граница зоны экспрессии *WUS*.

3. Белковый продукт гена *WUS* диффундирует от ОЦ, в том числе к верхушке АМП, где он активирует экспрессию гена Y . Кроме того, белок *WUS* активирует экспрессию генов *CLV1* и *CLV2*. Белки *CLV1* и *CLV2* образуют комплекс *CLV1/CLV2* на поверхности клеток, в которых они синтезируются (Schoof *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 2002; Николаев и др., 2007; Ogawa *et al.*, 2008).

4. Пептид pCLV3 распространяется по внешним слоям АМП быстрее, чем по корпусу. Этот пептид необратимо связывается с рецептором

комплексом CLV1/CLV2 на поверхности клеток (Rojo *et al.*, 2002; Николаев и др., 2007; Ogawa *et al.*, 2008).

5. Связывание пептида pCLV3 с рецептором CLV1/CLV2 запускает путь передачи сигнала, подавляющего экспрессию *WUS* (Lenhard, Laux, 2003).

6. Комплекс CLV1/2+CLV3 поглощается клетками и деградирует. В результате этого концентрация CLV3 уменьшается и внутри АМП возникает зона ОЦ, свободная от CLV1/2+CLV3, где и наблюдается экспрессия гена *WUS* (Lenhard, Laux, 2003; Williams, Fletcher, 2005).

Модель рассматривается на продольном срезе АМП с клеточной структурой, геометрически подобной реальным изображениям продольного среза АМП (построена методом разбиения Вороного).

На такой геометрической модели продольного среза АМП была построена динамическая модель пространственно распределенного механизма регуляции со сосредоточенными параметрами в точках i , соответствующих клеткам области. Модель представлена в виде системы обыкновенных дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dy_i}{dt} &= \frac{\beta_y}{V_i} \sum_{j \in \varepsilon(i)} S_{ij}(y_i - y_j) + v_y I_Y^i \mathbf{g}(h_y + T_{yw} w_i) - d_y y_i, \\ \frac{dc_i}{dt} &= \frac{\beta_c}{V_i} \sum_{j \in \varepsilon(i)} S_{ij}(c_i - c_j) + v_c \mathbf{g}(h_c + T_{cy} y_i) - d_c c_i - \alpha c_i z_i + \beta u_i, \\ \frac{dw_i}{dt} &= \frac{\beta_w}{V_i} \sum_{j \in \varepsilon(i)} S_{ij}(w_i - w_j) + v_w \mathbf{g}(h_w + T_{wy} y_i + T_{wu} u_i) - d_w w_i, \\ \frac{dz_i}{dt} &= v_z \mathbf{g}(h_z + T_{zw} w_i) - d_z z_i - \alpha c_i z_i + \beta u_i, \\ \frac{du_i}{dt} &= \alpha c_i z_i - \beta u_i - \gamma u_i, \end{aligned}$$

где y , c , w – концентрации белков Y , CLV3, WUS ; z и u – концентрации гетеродимерного рецептора CVL1/2 и комплекса CLV1/2+CLV3 соответственно. $\beta_y, \beta_c, \beta_w$ – коэффициенты проницаемости межклеточных границ для веществ y , c , w . V_i – объем i -й клетки (двумерной), S_{ij} – площадь границы (одномерной) между i -й и j -й клетками. v_y, v_c, v_w – максимальные скорости синтеза веществ y , c , w ; d_y, d_c, d_w – коэффициенты распада веществ y , c , w ; α – коэффициент скорости образования вещества u ; I_Y^i – индексная функция, равная единице для клеток, находящихся на границе клеточного ансамбля, и нулю для остальных клеток. Суммирование производится по всем клеткам j , которые являются соседними с клеткой i ($j \in \varepsilon(i)$).

Регуляция экспрессии генов y , c , w и z описывается в модели сигмоидной функцией (Mjolsness *et al.*, 1991):

$$\mathbf{g}(X) = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{X}{\sqrt{1 + X^2}} \right).$$

Для вычислительных экспериментов с моделью был использован пакет Cellzilla (<http://computableplant.caltech.edu/~bshapiro/Cellzilla/html/index.html>).

По разработанному алгоритму были подобраны параметры и методом установления во времени получено стационарное решение (рис., ж, з) для распределения продуктов экспрессии генов CLV3 и WUS в АМП, которое качественно согласуется с экспериментально наблюдаемым (рис., а, б).

Предложенный С.В. Николаевым с соавт. (2013) механизм взаимной регуляции пространственно распределенной экспрессии генов $CLV1/2/3$ и WUS , характерной для структуры ниши стволовых клеток в АМП, и гипотетического гена Y способен устойчиво поддерживать такой пространственный паттерн экспрессии. Ключевыми моментами предложенного механизма регуляции являются: а) петля положительной обратной связи между клетками верхушки АМП и ОЦ, представленная в виде взаимодействия генов Y и WUS , которая, как показано в статье С.В. Николаева с соавт. (2010), удерживает ОЦ на фиксированном расстоянии от верхушки АМП; б) активация экспрессии $CLV3$ сигналом Y , распространяющимся сверху, что обеспечивает правильное пространственное распределение экспрессии $CLV3$; в) замкнутость модели,

т. е. для получения устойчивого к возмущениям нужного стационарного решения (пространственного паттерна экспрессии рассматриваемых генов) никакая из областей экспрессии генов не фиксируется принудительно.

**ДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ
ГОМЕОСТАЗА НИШИ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК В МЕРИСТЕМЕ ПОБЕГА
ARABIDOPSIS THALIANA
(Hohm et al., 2010)**

В статье Hohm с соавт. (2010) представлена модель (схема модели – рис., и) регуляции структуры ниши стволовых клеток в апикальной меристеме побега, основанная на взаимодействии генов *CLV3/WUS*. Целью авторов было про-

делировать механизм формирования паттернов экспрессии генов *CLV3* и *WUS* на продольном срезе АМП, используя для этого минимальное количество предположений об участниках этого процесса. Модель использовалась для изучения поведения системы при возмущениях, а также для нахождения допустимых значений параметров, при которых сохраняется гомеостаз ниши стволовых клеток в АМП, несмотря на изменяющиеся внешние условия.

Ядром схемы взаимодействия между компонентами модели являются два контура обратных связей, проходящих через *WUS*. Взаимодействия между компонентами модели осуществляются по механизму реакция–диффузия и представлены в виде системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{\partial[WUS]}{\partial t} &= D_{WUS}\Delta[WUS] + \xi\rho_{anc} \frac{[WUS]^2[facX]}{1 + ([CLV3] + [CLV3_{ext}])^3} - \mu_{WUS}[WUS] + \sigma_{WUS}, \\ \frac{\partial[facX]}{\partial t} &= D_{facX}\Delta[facX] + \xi\rho_{anc} \frac{[WUS]^2[facX]}{1 + ([CLV3] + [CLV3_{ext}])^3} + \frac{\sigma_{facX}}{1 + \frac{[facX]}{K_{facX}}}, \\ \frac{\partial[WUS_{sig}]}{\partial t} &= D_{WUS_{sig}}\Delta[WUS_{sig}] + \rho_{WUS_{sig}}[WUS] - \mu_{WUS_{sig}}[WUS_{sig}], \\ \frac{\partial[st]}{\partial t} &= D_{st}\Delta[st] + 1_{Id}(i)\rho_{st} \frac{\left(\frac{[WUS_{sig}]}{K_{st}}\right)^5}{1 + \left(\frac{[WUS_{sig}]}{K_{st}}\right)^5} - \mu_{st}[st], \\ \frac{\partial[CLV3]}{\partial t} &= D_{CLV3}\Delta[CLV3] + c_{k0}\rho_{CLV3}[st] - \mu_{CLV3}[CLV3]. \end{aligned}$$

В модели присутствуют следующие параметры:

ρ – коэффициент скорости реакции, σ – скорость экспрессии (не зависит от концентрации каких-либо веществ), μ – скорость деградации, K – кинетическая константа.

Переменные модели (концентрации веществ), а также основные модельные предположения относительно них приведены ниже:

$[st]$ – уровень «стволовости» клеток меристемы контролируется *WUS*-зависимым сигналом, на который способны реагировать только клетки внешнего слоя. Пропорционально уровню «стволовости» в стволовых клетках синтезируется сигнальная молекула *CLV3*.

$[CLV3]$ способен диффундировать с распадом в соседние клетки и ограничивать (в зависимости от своей концентрации) экспрессию *WUS*.

$[WUS]$ диффундирует очень медленно и стимулирует образование *WUS*-сигнала, который является более мобильным и способен диффундировать в соседние клетки. Хотя потенциально все клетки (в рамках модели) способны синтезировать *WUS*, в модели присутствует пространственный параметр, который делает клетки, находящиеся ближе к верхушке меристемы, более «компетентными» к синтезу *WUS*. Введение этого параметра было обусловлено необходимостью корректного позиционирования паттернов экспрессии генов *WUS* и *CLV3*.

$[WUS_{sig}]$ синтезируется в тех клетках, где есть *WUS* (в зависимости от его концентрации). Подобно *CLV3*, *WUS*-сигнал может быстро диффундировать и распадаться с постоянной скоростью. В зависимости от концентрации *WUS*-сигнала клетки становятся стволовыми.

Только внешние слои клеток меристемы являются компетентными к WUS-сигналу.

[*facX*] введен в модель для того, чтобы учесть CLV-независимую регуляцию экспрессии гена *WUS*. Изначально *facX* экспрессируется во всех клетках и свободно диффундирует. *facX* стимулирует экспрессию *WUS*, а *WUS* подавляет экспрессию *facX*, что реализовано в модели через активную деградацию (или потребление) *facX* с помощью *WUS*. Таким образом, взаимодействие между *facX* и *WUS* основано на механизме активатор–субстрат, что позволяет получать обособленные области экспрессии *WUS*.

Следует отметить, что для получения правдоподобной картины расположения паттернов экспрессии генов *CLV3* и *WUS* (решение модели для этих генов – рис., к, л) авторы использовали дополнительное пространственное ограничение на расположение клеток, в которых разрешена экспрессия этих генов (предписанное расположение компетентных клеток). Nohm с соавт. (2010) предположили, что *CLV3*-экспрессирующие (т. е. ствольные) клетки определяются сигналом «стволовости», распространяющимся сверху, в то время как *WUS* «модулирует» интенсивность этой экспрессии (и распространяется снизу от ОЦ).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ЦИТОКИНИНА В РЕГУЛЯЦИИ НИШИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В АМП (Gordon *et al.*, 2009; Chickarmane *et al.*, 2012)

Одномерная модель регуляции расположения зон экспрессии генов вдоль продольной оси АМП с делением клеток была рассмотрена в статье Chickarmane с соавт. (2012). Устойчивое позиционирование ОЦ на определенном расстоянии от верхушки меристемы обеспечивалось петлей регуляции между ОЦ и верхушкой АМП (схема модели – рис., м). Транскрипция *WUS* активируется цитокинин-регулируемым транскрипционным фактором, подробнее модель этого механизма исследована в более ранней работе (Gordon *et al.*, 2009). Диффундирующий сигнал – *CLV3*-сигнал – синтезируется в первой клетке массива и регулируется сигналом «стволовости» *Sstemcells* и диффундирующим сигналом, производным от *WUS*. *CLV3*-сигнал распространяется по клеточному массиву и

делает клетки компетентными к экспрессии *CLV3*. Так как *CLV3*-сигнал синтезируется только в первой клетке массива, его градиент экспоненциально уменьшается и поэтому ген *CLV3* экспрессируется лишь в нескольких первых клетках. *WUS* активирует диффундирующий сигнал *Sstemcells*, поддерживающий стволовость клеток и активирующий *CLV3* и *CLV3*-сигнал. Цитокинин синтезируется в первой клетке массива. Таким образом, в начале одномерного массива (сверху) расположены клетки, в которых происходит экспрессия *CLV3*, затем – клетки, маркированные экспрессией *WUS* (решение модели – рис., н).

ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении более 20 лет считается, что гены *CLV3* и *WUS* являются важными участниками в механизме поддержания постоянной пространственной структуры ниши ствольных клеток АМП (Barton, 2010). В настоящем обзоре было рассмотрено несколько моделей, в которых теоретически изучается роль в этом механизме регуляторного контура *CLV3/WUS*.

В моделях Yadav с соавт. (2011, 2013) ставится вопрос о том, какой механизм обеспечивает взаимную регуляцию экспрессии генов в клетках, находящихся в разных пространственных компартментах, так, что сохраняется нужная пространственная структура АМП в целом, а именно: каким образом синтезирующийся в ЦЗ *WUS*, перемещаясь в соседние клетки, влияет на активацию генов *CLV3* и *KANI*.

В моделях С.В. Николаева с соавт. (2007, 2010, 2013) сделан акцент на взаимодействии между разными группами клеток в пространстве АМП. Основанная на опосредованной активации экспрессии *CLV3* белком *WUS* модель поддержания пространственной локализации ЦЗ и ОЦ на продольном срезе АМП была рассмотрена в работе С.В. Николаева с соавт. (2007) при дополнительной фиксации зоны экспрессии гена *Y*, замкнутый вариант этой модели представлен в работе С.В. Николаева с соавт. (2013). Кроме того, в работе С.В. Николаева с соавт. (2010) на одномерном варианте модели было явно смоделировано деление клеток и показано, что предложенная регуляция обеспечивает

локализацию ОЦ на стабильном расстоянии от верхушки АМП при делении клеток.

В модели Hohm с соавт. (2010) для получения правдоподобной картины расположения ЦЗ и ОЦ авторы удерживали на верхушке АМП зону экспрессии некоторого гипотетического сигнала, определяющего «стволовость» клеток. Кроме того, дополнительно предписывали, в каких клетках АМП разрешена экспрессия генов *CLV3* и *WUS*.

В работе Chickarmane с соавт. (2012) предложена модель с учетом роста и деления клеток. Главным вопросом было позиционирование зоны экспрессии гена *WUS* относительно верхушки меристемы, поэтому модель рассчитывали на одномерном массиве клеток, расположенных вдоль центральной оси меристемы. В начале массива (сверху) расположены клетки, в которых происходит экспрессия *CLV3*, затем – клетки, маркированные экспрессией *WUS*.

Было показано (Yadav *et al.*, 2011), что белковый продукт гена *WUS* перемещается из зоны синтеза (ОЦ) в ЦЗ меристемы, где проникает в ядро и непосредственно взаимодействует с последовательностями ДНК в промоторе гена *CLV3*. Однако, согласно сложившимся представлениям о распространении сигнальных молекул в АМП, эти данные порождают много вопросов. Например, неясно, почему экспрессия *CLV3* не наблюдается непосредственно в зоне синтеза *WUS*, где его концентрация должна быть максимальной? Почему экспрессия гена *CLV3* имеет максимум в поверхностных клетках меристемы и падает по направлению к глубинным слоям, хотя при активации экспрессии сигналом из ОЦ ожидается обратная картина? Чтобы согласовать прямую активацию экспрессии *CLV3* продуктом гена *WUS*, авторы модели (Yadav *et al.*, 2011) постулировали, что имеется некий гипотетический сигнал, распространяющийся из верхушки АМП (из слоя L1), и дополнительно фиксировали расположение клеток ОЦ.

Таким образом, в результате моделирования выявляется некоторого рода конфликт между постулатом о непосредственной активации гена *CLV3* продуктом экспрессии гена *WUS*, основанным на экспериментальных данных, и такими постулатами моделей, как пассивное

изотропное распространение молекул-сигналов и обобщенное пространство АМП. Как показывают вычислительные эксперименты, для получения правильного расположения зоны экспрессии гена *CLV3* в моделях с непосредственной активацией гена *CLV3* продуктом экспрессии гена *WUS* (Yadav *et al.*, 2011, 2013; Chickarmane *et al.*, 2012) необходимо постулировать дополнительный активирующий сигнал, распространяющийся сверху (из слоя L1), и эта активация должна превалировать над активацией со стороны ОЦ. Кроме того, вычислительные эксперименты (Николаев и др., 2010; Chickarmane *et al.*, 2012) показывают, что стабильное расположение ОЦ при делениях клеток может обеспечиваться регуляторным контуром между ОЦ и верхушкой АМП, и в предложенный в работе С.В. Николаева с соавт. (2010) положительный регуляторный контур «ОЦ–верхушка АМП» органично вписывается опосредованная активация *WUS*-*Y*-*CLV3*. Эти обстоятельства позволяют предполагать, что именно этот регуляторный контур является центральным звеном в системе регуляции пространственного паттерна экспрессии генов, характерного для ниши стволовых клеток в АМП, в то время как непосредственная активация экспрессии *CLV3* продуктом гена *WUS* является модулирующим сигналом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя компьютерные модели пока еще не стали основным инструментом для изучения развития растений, ряд работ, рассмотренных в настоящем обзоре, являются хорошим примером, показывающим важность их использования наряду с экспериментальными методами для изучения регуляции морфогенеза.

Несмотря на кажущуюся проработанность моделей, многие детали до сих пор остаются невыясненными. Например, неизвестными остаются процессы, посредством которых осуществляются регуляторные взаимодействия генов при формировании пространственных паттернов генной активности в АМП. В рассмотренных моделях в качестве такого механизма передачи сигналов между клетками, разделенными в пространстве, рассматривается диффузия молекул-регуляторов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 11-04-01748-а.

ЛИТЕРАТУРА

- Николаев С.В., Зубаирова У.С., Пененко А.В. и др. Модель регуляции структуры ниши стволовых клеток в апикальной меристеме побега *Arabidopsis thaliana* // Докл. АН. 2013. Т. 451. № 5. С. 336–338.
- Николаев С.В., Зубаирова У.С., Фадеев С.И. и др. Исследование одномерной модели регуляции размеров возобновительной зоны в биологической ткани с учетом деления клеток // Сиб. журн. индустр. математики. 2010. Т. 13. Вып. 4(44). С. 70–82.
- Николаев С.В., Колчанов Н.А., Фадеев С.И. и др. Исследование одномерной модели регуляции размеров возобновительной зоны в биологической ткани // Вычисл. технол. 2006. Т. 11. Вып. 2. С. 67–81.
- Николаев С.В., Пененко А.В., Лавреха В.В. и др. Модельное изучение роли белков **CLV1**, **CLV2**, **CLV3** и **WUS** в регуляции структуры апикальной меристемы побега // Онтогенез. 2007. Т. 38. Вып. 6. С. 457–462.
- Чуб В.В., Синюшин А.А. Фасциация цветка и побега: от феноменологии к построению моделей преобразования апикальной меристемы // Физиол. растений. 2012. Т. 59. Вып. 4. С. 1–17.
- Barton M.K. Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo // Dev. Biol. 2010. V. 341. P. 95–113.
- Brand U., Fletcher J.C., Hobe M. *et al.* Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity // Science. 2000. V. 289. P. 617–619.
- Brand U., Grunewald M., Hobe M., Simon R. Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 565–575.
- Brand U., Hobe M., Simon R. Functional domains in plant shoot meristems // Bioessays. 2001. V. 23. P. 134–141.
- Bowman J.L., Eshed Y. Formation and maintenance of the shoot apical meristem // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 110–115.
- Chickarmane V.S., Gordon S.P., Tarr P.T. *et al.* Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical–basal axis of the growing *Arabidopsis* shoot meristem // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. No. 10. P. 4002–4007.
- Fujita H., Toyokura K., Okada K., Kawaguchi M. Reaction-diffusion pattern in shoot apical meristem of plants // PLoS ONE. 2011. V. 6. e18243.
- Geier F., Lohmann J.U., Gerstung M. *et al.* A quantitative and dynamic model for plant stem cell regulation // PLoS ONE. 2008. V. 3. e3553.
- Gordon S.P., Chickarmane V.S., Ohno C., Meyerowitz E.M. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 16529–16534.
- Gross-Hardt R., Laux T. Stem cell regulation in the shoot meristem // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 1659–1666.
- Hohm T., Zitzler E., Simon R. A dynamic model for stem cell homeostasis and patterning in *Arabidopsis* meristems // PLoS ONE. 2010. V. 5. e9189.
- Jönsson H., Gruel J., Krupinski P., Troein C. On evaluating models in computational morphodynamics // Curr. Opin. Plant Biol. 2012. V. 15. P. 103–110.
- Jönsson H., Heisler M., Reddy G.V. *et al.* Modeling the organization of the WUSCHEL expression domain in the shoot apical meristem // Bioinformatics. 2005. V. 21 (Suppl. 1) P. i232–i240.
- Jönsson H., Shapiro B., Meyerowitz E., Mjolsness E. Signaling in multicellular models of plant development // On Growth Form and Computers / Ed. S. Kumar, P. Bentley. L.: Acad. Press, 2003. P. 156–161.
- Kerstetter R.A., Bollman K., Taylor R.A. *et al.* KANADI regulates organ polarity in *Arabidopsis* // Nature. 2001. V. 411. P. 706–709.
- Kwiatkowska D. Structural integration at the shoot apical meristem: models, measurements, and experiments // Am. J. Bot. 2004. V. 91. P. 1277–1293.
- Lenhard M., Laux T. Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1 // Development. 2003. V. 130. P. 3163–3173.
- Mjolsness E., Sharp D.H., Reinitz J. A connectionist model of development // J. Theor. Biol. 1991. V. 152. P. 429–453.
- Newman I.V. Pattern in the meristems of vascular plants. III. Pursuing the patterns in the apical meristem where no cell is a permanent cell // J. Linn. Soc. (Botany). 1965. V. 59. P. 185–214.
- Ogawa M., Shinohara H., Sakagami Y., Matsubayashi Y. *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain // Science. 2008. V. 319. P. 294.
- Reddy V.G., Meyerowitz E.M. Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex // Science. 2005. V. 310. No. 5748. P. 663–667.
- Rojo E., Sharma V.K., Kovaleva V. *et al.* CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* CLAVATA stem cell signaling pathway // Plant Cell. 2002. V. 14. P. 969–977.
- Sablowski R. Plant stem cell niches: from signalling to execution // Curr. Opin. Plant Biol. 2011. V. 14. P. 4–9.
- Sahlin P., Melke P., Jönsson H. Models of sequestration and receptor cross-talk for explaining multiple mutants in plant stem cell regulation // BMC Syst. Biol. 2011. V. 5. 2.
- Schoof H., Lenhard M., Haecker A. *et al.* The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes // Cell. 2000. V. 100 P. 635–644.
- Sharma V.K., Carles C., Fletcher J.C. Maintenance of stem cell populations in plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100 (Suppl 1) P. 11823–11829.
- Traas J., Doonan J.H. Cellular basis of shoot apical meristem development // Int. Rev. Cytol. 2001. V. 208. P. 161–206.
- Williams L., Fletcher J.C. Stem cell regulation in the *Arabidopsis* shoot apical meristem // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. P. 582–586.
- Yadav R.K., Girke T., Pasala S. *et al.* Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 4941–4946.
- Yadav R.K., Perales M., Gruel J. *et al.* WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex // Genes Dev. 2011. V. 25. P. 2025–2030.
- Yadav R.K., Perales M., Gruel J. *et al.* Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program // Mol. Syst. Biol. 2013. V. 9. P. 654.

MODELS OF STEM CELL NICHE STRUCTURE REGULATION IN SHOOT APICAL MERISTEM

U.S. Zubairova, S.V. Nikolaev

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: ulyanochka@bionet.nsc.ru

Summary

The experimental data obtained to date provided grounds for certain concepts of the stem cell niche regulation in shoot apical meristem. Mathematical modeling is used for checking their consistency and coherence with experimental evidence. In this paper, we summarize mathematical models of stem cell niche regulation offered by different authors, analyze the experimental base and working hypotheses formalized in these models, and identify methodological differences in the approaches to the construction of these models.

Key words: shoot apical meristem, stem cell niche, CLAVATA3, WUSCHEL, mathematical model.