

Подсистема «Морфогенез»: изучение морфогенеза растений на примере модельного растения *Arabidopsis thaliana*.

Структура документа (оглавление).

1. Цель и задачи подсистемы «Морфогенез».....	1
2. Использование методов и подходов биоинформатики в исследовании развития организма: структура подсистемы «Морфогенез» и детальное руководство по ее применению.....	3
2.1. База данных AGNS (Arabidopsis GeneNet Supplementary DataBase), по генетически-контролируемому развитию растений (на примере <i>Arabidopsis thaliana</i>)..	3
2.1.1. Описание работы в интерфейсе базы данных AGNS.....	5
2.1.1.1 Вход в систему.....	5
2.1.1.2. Навигация по базе данных AGNS.....	5
2.1.1.3. Навигация по контролируемым словарям.....	6
2.1.1.4. Осуществление автоматических запросов к AGNS Expression DataBase..	7
2.1.1.5. Осуществление автоматических запросов к AGNS Phenotype DataBase....	9
2.2. Программная компонента для исследования одномерной модели функционирования меристемы растения.....	11
2.2.1. Описание работы в системе для моделирования компартиментализации возобновительной зоны биологической ткани. Одномерный вариант.....	15
2.2.1.1. Начальные условия.....	15
2.2.1.2. Поиск стационарных решений.....	16
2.2.1.3. Исследование устойчивости решений (задача Коши).....	16
2.2.1.4. Обратная задача.....	17
3. Полезные ссылки:.....	18

1. Цель и задачи подсистемы «Морфогенез».

Подсистема «Морфогенез» предназначена для изучения морфогенеза растений, как студентами биологических факультетов университетов, так и специалистами, работающими в области функциональной геномики, молекулярной биологии и генетики, трансгенеза и моделирования процессов морфогенеза. В первую очередь, подсистема «Морфогенез» будет полезна как справочник для планирования и описания результатов экспериментов, связанных с изменениями активности генов в процессе развития растений, в число которых входит трансгенез, мутагенез, генетический анализ мутантов и трансгенных растений и другие эксперименты. Подсистема представляет собой также руководство по созданию новых морфотипов при трансгенезе, справочник по изучению и описанию фенотипов трансгенных и мутантных растений и изменений экспрессии генов в процессе развития растений. Подсистема «Морфогенез» предоставляет возможность получить всю необходимую информацию о генах, регулирующих морфогенез, и промоделировать основное событие морфогенеза на клеточном уровне, дифференцировку клеток определенного типа в клетки нового типа. Подсистема «Морфогенез» содержит информацию о генах, контролирующих развитие модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Однако, как показали результаты полного секвенирования генома риса, подсистема может быть применена и как платформа для исследования генетической регуляции морфогенеза других растений, так как 71% генов, кодирующих белки у риса, имеют гомологи у арабидопсиса и 90% белков арабидопсиса имеют гомологов в протеоме риса (International Rice Genome Sequence Project, 2005). Такое высокое подобие позволяет предполагать, что клеточные и биохимические функции генов риса и других видов могут

быть интерпретированы на основе экспериментов, проведенных на арабидопсисе. Более того, результаты ряда экспериментов на арабидопсисе показали, что это растение может служить моделью для процессов, на первый взгляд не имеющих отношение к данному виду. Так, арабидопсис, однолетнее растение семейства крестоцветных, высотой не более 20 см, заведомо не имеет древесины и не способен, как и другие крестоцветные, к симбиотической фиксации азота. Тем не менее, показано, что стебель соцветия арабидопсиса формирует камбиум и в нем проходят процессы вторичного утолщения, лежащие в основе формирования древесины. Более того, значительная часть генов, экспрессирующихся в ходе вторичного утолщения и связанных с активностью камбия, высоко гомологичны у арабидопсиса и тополя (Hertzberg et al. 2001). Как и бобовые виды *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* и *Pisum sativum*, арабидопсис, не смотря на свою принадлежность к крестоцветным, имеет основные генные сети симбиотической фиксации (например, Ca^{2+} -и тримерным G-белком опосредованные пути передачи сигналов и полярный рост клетки) с гомологичными белками и консервативными функциями этих белков (Limpens and Bisseling 2003).

Информация о процессах морфогенеза состоит из качественных и количественных данных следующих типов:

- описание стадий развития организма и его анатомических элементов;
- морфология и анатомия растений;
- паттерны экспрессии генов;
- описание фенотипических аномалий, при нарушениях морфогенеза.

Входящая в подсистему морфогенез база данных AGNS (Arabidopsis GeneNet Supplementary DataBase) является первой в мире базой данных, которая, на основе аннотирования опубликованных статей, систематизирует, интегрирует и, тем самым, подготавливает для логического анализа и моделирования следующих типы данных (Рис. 1): а) описание нормального развития растения; б) анатомию и морфологию растения; в) паттерны экспрессии генов в диком типе; г) паттерны экспрессии генов в мутантных и трансгенных растениях; д) фенотипические аномалии мутантных и трансгенных растений.

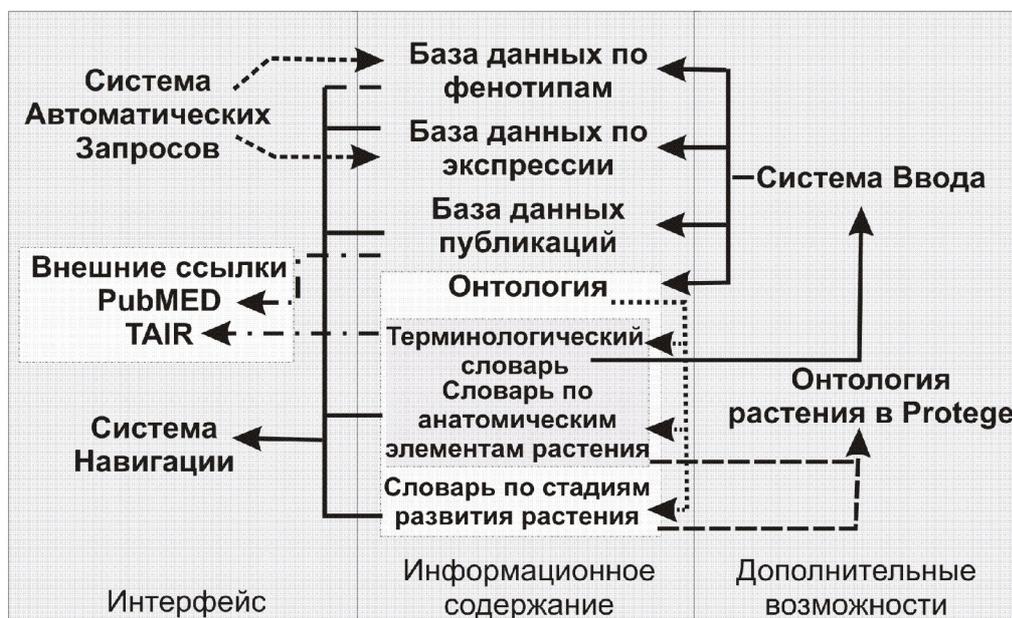


Рисунок 1. Схема базы данных AGNS. Компоненты интерфейса, информационное содержание и дополнительные возможности.

Интерфейс и данные AGNS могут служить платформой для различных развития моделей. В данном случае, разработана одномерная модель функционирования меристемы растения.

2. Использование методов и подходов биоинформатики в исследовании развития организма: структура подсистемы «Морфогенез» и детальное руководство по ее применению.

Подсистема «Морфогенез» представляет собой информационно-программный комплекс, содержащий базу данных результатов экспериментов по морфогенезу, аннотированных из опубликованных статей, системы для их интеграции и анализа, реализованные в виде запросов к базе данных и компьютерную систему моделирования первого этапа процесса дифференцировки клеток с определением границы между материнской популяцией клеток и их потомками с новым типом дифференцировки.

Ниже будут рассмотрены компоненты подсистемы «Морфогенез» и приведено детальное (пошаговое) описание использования этих компонентов

2.1. База данных AGNS (Arabidopsis GeneNet Supplementary DataBase), по генетически-контролируемому развитию растений (на примере *Arabidopsis thaliana*).

Основными компонентами базы данных AGNS являются онтология, база данных по экспрессии генов (AGNS_ED) (Рис. 2) и база данных по фенотипическим аномалиям (AGNS_PD) (Рис. 3).

Онтология морфогенеза состоит из двух частей: онтологии анатомических элементов (область растения, где экспрессируется ген или происходит фенотипическая аномалия) и онтологии стадий развития (когда во время жизни растения происходит экспрессия гена или развивается фенотипическая аномалия). Онтология AGNS служит каркасом для описания событий морфогенеза как на уровне экспрессии генов (AGNS_ED), так и на уровне фенотипа (AGNS_PD). С использованием онтологии построена работа навигационной системы и ряда поисковых запросов. Онтология содержит утвержденные международным консорциумом термины для анатомических элементов и стадий развития от оплодотворенной зиготы до взрослого организма (онтология TAIR). Контролируемые словари онтологии содержат детальное описание каждого термина, составленное на основе аннотирования научных публикаций, со ссылками на публикации и список синонимов. Использование детальной информации из онтологии повышает эффективность и точность выбора нужного термина. Таким образом, онтология AGNS сама по себе является базой знаний и справочником по морфогенезу арабидопсиса. Имеющаяся в онтологии система поиска повышает эффективность нахождения необходимого термина и информации о нем.

База данных по экспрессии генов (AGNS_ED) (Рис. 2).

AGNS_ED с помощью автоматических запросов осуществляет логический анализ имеющихся данных и предоставляет пользователю ответы на следующие вопросы:

1. Как экспрессируется ген в диком типе? Приводятся интегрированные данные из всех аннотированных статей о стадиях развития и доменах, в которых в норме экспрессируется ген.
2. Какие гены регулируют экспрессию данного гена? На какой стадии, в каком анатомическом элементе имеет место регуляция и на что влияет ген регулятор?
3. Экспрессию каких генов регулирует данный ген? На какой стадии, в каком анатомическом элементе имеет место регуляция и на что влияет ген регулятор?
4. Какие гены экспрессируются на определенной стадии развития растения и в каких анатомических элементах?
5. Какие гены экспрессируются в определенном анатомическом элементе и на каких стадиях?
6. Экспрессия каких генов регулируется на определенной стадии, какими генами и в каких анатомических элементах?

7. Экспрессия каких генов регулируется в определенном анатомическом элементе, какими генами и на каких стадиях?
8. Какие гены коэкспрессируются с определенным геном? Результатом запроса является список генов, паттерны экспрессии которых совпадают с паттерном экспрессии заданного гена, приводится стадия развития и анатомический элемент, в котором это происходит.
9. Какие гены, экспрессируются перед началом экспрессии данного гена в доменах его экспрессии?
10. Какие гены начинают экспрессироваться после начала экспрессии заданного гена в домене его экспрессии?

Таким образом, AGNS_ED предоставляет следующую информацию для реконструкции и моделирования генных сетей развития растений: 1) состав участников генной сети, осуществляющей морфогенез определенного органа, 2) регуляторные взаимодействия между участниками этой генной сети 3) изменения в генной сети при развитии органа.

Название поля	Пример описания экспрессии гена CLV3 в диком типе (1)	Пример описания экспрессии гена CLV3 в мутантах wus-1 и stm-11 (2)	
Аллель/ Аллели	Wild type [Fletcher J.C. et al., 1999]	wus-1 [Brand U. et al., 2002] stm-11 [Brand U. et al., 2002]	
Эксперимент	mRNA, AR	mRNA, GUS	
Стадия развития	Heart stage	Mature embryo	
Орган	Embryo, the apical domain, the presumptive SAM	embryo, SAM	
Уровень экспрессии	present	absent	
Аномалия		wus-1, all embryos lacked the SAM [Brand U. et al., 2002] stm-11, most mutant embryos lacked the SAM and did not express the CLV3::GUS reporter. However, in six of 86 stm-11 mutant embryos analyzed weak GUS staining was observed in two to four cells between the cotyledons [Brand U. et al., 2002]	
Комментарии	CLV3 mRNA expression is first detected in heart stage embryos, in a patch of cells between the developing cotyledons predicted to give rise to the SAM [Fletcher J.C. et al., 1999]		

Рисунок 2. Структура и формат базы данных по экспрессии генов AGNS_ED. Описана экспрессия гена CLV3 в норме (левая колонка) и при мутации генов WUS и STM (правая колонка) на эмбриональных стадиях. На рисунках справа - изображения, полученные в эксперименте. Ген экспрессируется в закладывающейся меристеме апикальной части зародыша в норме (1) и экспрессии нет при мутации (2).

База данных по фенотипическим аномалиям (AGNS_PD) (Рис. 3).

AGNS_PD с помощью автоматических запросов осуществляет логический анализ имеющихся данных и предоставляет пользователю ответы на следующие вопросы:

1. В каких органах, и на каких стадиях мутации/трансгены данного гена вызывают фенотипические аномалии, и какие это аномалии?
2. Мутации/трансгены каких генов наряду с данным геном приводят к тем же фенотипическим аномалиям, в каких органах и на каких стадиях?
3. Мутации/трансгены каких генов приводят к фенотипическим аномалиям данного органа, на каких стадиях и какие это аномалии?

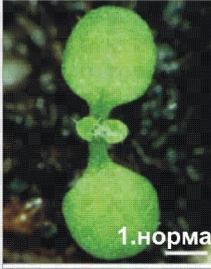
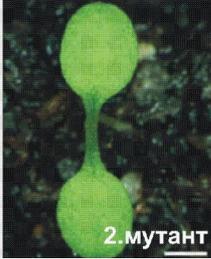
Название поля	Пример описания фенотипической аномалии (2)	
Аллель/ Аллели	cuc2 [Aida M. et al., 1997], cuc2 cuc1/+ [Aida M. et al., 1997], cuc2 cuc1 [Aida M. et al., 1997], stm-1 [Barton M.K. and Poethig R.S., 1993] [Clark S.E. et al., 1996] [Byrne M.E. et al., 2002], stm-1 as-1 knat1-bp [Byrne M.E. et al., 2002], zll-pnh-2 [Lynn K. et al., 1999], zll-3 wus-1 [Moussian B. et al., 2003]	
Стадия развития	<i>Mature embryo</i> <i>Seedling</i>	
Орган	Primary SAM	
Аномалия	absent or very strongly reduced and not restored at germination	
Комментарии	Cuc2, in 0.08% of plants, all these seedlings have cotyledons fused along one side. Some of the heart-type seedlings did not produce shoots (two of 13 heart-type seedlings). These heart-type seedlings lacked a SAM [Aida M. et al., 1997]	

Рисунок 3. Структура и формат базы данных по фенотипическим аномалиям AGNS_PD. Описание в формате базы аномалии остановки развития, при которой меристема отсутствует или уменьшена и не появляется после прорастания (Absent or very strongly reduced and not restored at germination). На рисунках справа вид мутантов (2) на стадии проростка и нормальное растение с формирующимися листьями (1).

Таким образом, AGNS_PD предоставляет информацию об основных участниках морфогенеза, необходимую для установления их роли в этом процессе и последующего моделирования.

2.1.1. Описание работы в интерфейсе базы данных AGNS.¹

2.1.1.1 Вход в систему

На главной странице в интерфейсе AGNS находится текст описания структуры, содержания и функций базы данных на английском языке. В верхней части страницы располагаются закладки для перехода на отдельные разделы базы (Рис. 4).

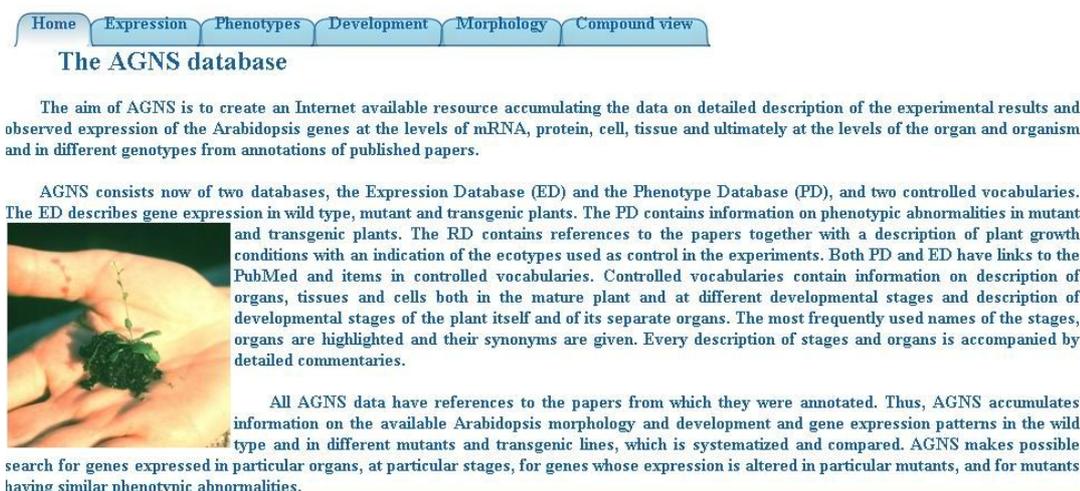


Рисунок 4. Главная страница базы данных AGNS.

2.1.1.2. Навигация по базе данных AGNS

¹ Подробнее описание работы в базе данных AGNS смотри в Руководстве пользователя АСНИ-2, 4.2.8.2.

По имеющимся закладкам в верхней части страницы (Рис. 4) пользователю предоставляется возможность навигации по 4 разделам базы. Переход возможен как с главной страницы, так и со страниц основных разделов AGNS.

По закладке «Expression» пользователь заходит в раздел «AGNS Expression DataBase», где ему предоставляется осуществить несколько автоматических запросов к этому разделу базы.

По закладке «Phenotype» пользователь заходит в раздел «AGNS Phenotype DataBase», где ему предоставляется осуществить 2 автоматических запроса к этому разделу базы.

При обзоре результатов автоматических запросов пользователю предоставляется возможность просмотра содержания «AGNS Expression DataBase» и «AGNS Phenotype DataBase».

По закладке «Morphology» пользователь имеет возможность просмотреть содержимое контролируемого словаря по анатомии и морфологии.

По закладке «Development» пользователь имеет возможность просмотреть содержимое контролируемого словаря по стадиям развития растения.

2.1.1.3. Навигация по контролируемым словарям

По закладкам «Morphology» и «Development» пользователь может просмотреть содержание контролируемых словарей по анатомии и морфологии и по стадиям развития растения, соответственно (Рис. 5). Структура и представление словарей организованы сходным образом. В левой части страницы располагается разворачивающееся дерево, в котором в иерархическом виде представляется содержимое словаря. Вложенность в интерфейсе обозначается при помощи символов: темный кружок на узле графа около термина контролируемого словаря обозначает, что имеются вложенные, располагающиеся иерархически ниже, термины. Светлый кружок на узле графа около термина - вложенность полностью раскрыта. Отсутствие кружка - вложенных объектов нет. Для удобства обзора графа пользователем, реализовано автоматическое сворачивание неиспользуемых участков графа.

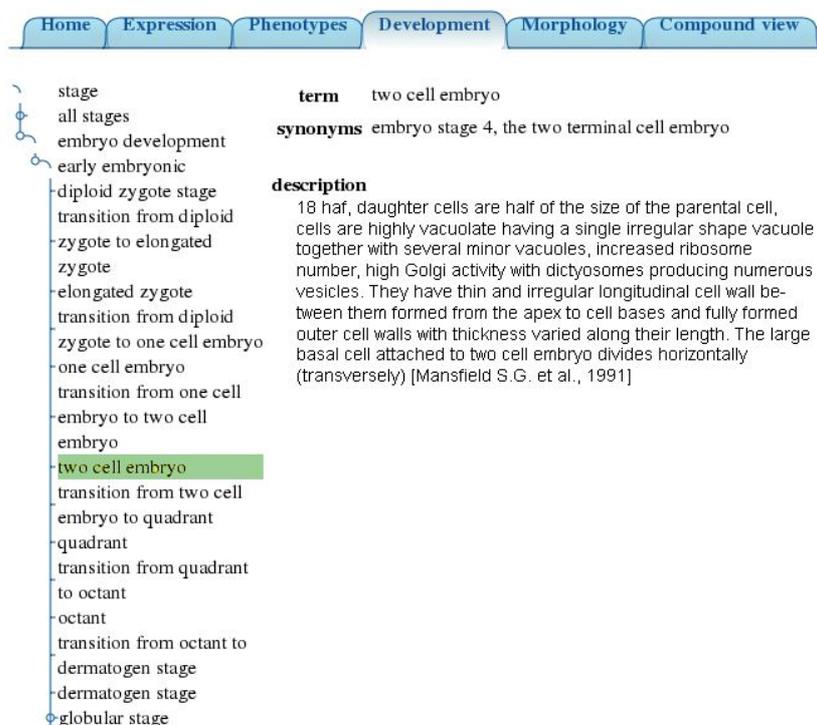


Рисунок 5. Обзор содержания контролируемого словаря по стадиям развития на закладке «Development».

Справа находится окошко с описанием термина, который на данный момент просматривается. Предоставлена информация о полном названии анатомического элемента или стадии развития, их синонимах и описании, найденных в литературе. В случае контролируемого словаря по анатомии и морфологии, полное название содержит в себе путь до описываемого анатомического элемента, что важно при описании мелких деталей.

2.1.1.4. Осуществление автоматических запросов к AGNS Expression DataBase.

По закладке «Expression» пользователь может зайти в раздел AGNS Expression DataBase. Здесь слева находится перечень имеющихся автоматических запросов к этому разделу базы (Рис. 6). В командной строке пользователь может набрать ключевое слово по интересующему его запросу. Так же пользователь может выбрать некоторые настройки запроса:

Галочка у «Substring» - поиск осуществляется внутри строки, иначе - требование полного совпадения слов.

Галочка у «case insensitive»- нечувствительный к регистру поиск.

Галочка у «regular expression»- поиск по регулярному выражению.

Также пользователь может выбрать количество результатов на страницу в окошке «Show me __ results per page».

Сохранение настроек осуществляется после нажатия пользователем кнопки «Submit»

В результатах запроса пользователь может производить сортировку данных по типу столбца (Ген, Анатомический Элемент, Стадия развития, Аномалия экспрессии), нажав на соответствующий столбец.

Результаты запроса могут быть выведены в txt файл.

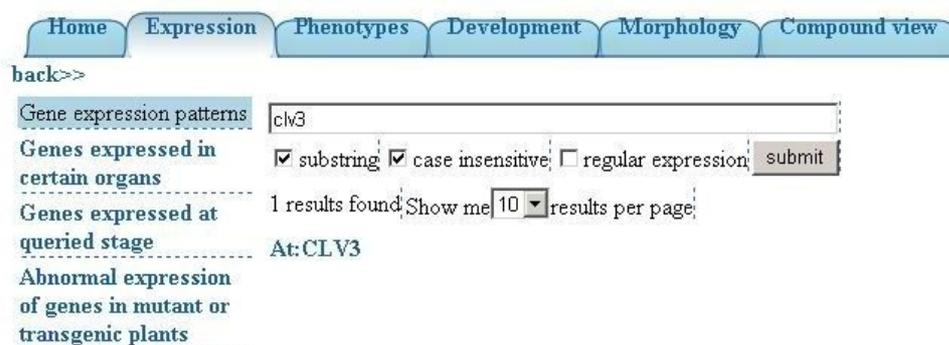


Рисунок 6. Выбор автоматических запросов к разделу базы данных AGNS Expression DataBase. Выбран запрос «Gene expression pattern» для гена CLV3.

Описание имеющихся запросов:

Запрос «Gene expression patterns»

В командной строке пользователь набирает название интересующего гена. Первым результатом запроса является список найденных генов со сходными названиями или «No results». Из данного списка пользователь выбирает интересующий его ген. Вторым результатом является список описания паттернов экспрессии гена. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития». Что соответствует описанию экспрессии данного гена в определенном органе, на определенной стадии.

Запрос «Genes expressed in certain organs»

В командной строке пользователь набирает название интересующего анатомического элемента. Результатом запроса является список паттернов экспрессии различных генов,

определенных для данного органа или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития».

Запрос «Genes expressed at queried stage»

В командной строке пользователь набирает название интересующей стадии развития. Результатом запроса является список паттернов экспрессии различных генов, определенных для данной стадии развития или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития».

Запрос «Abnormal expression of genes in mutant and transgenic plant»

В командной строке пользователь набирает название интересующего гена. Результатом запроса является список паттернов экспрессии различных генов при мутации заданного или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Allele:** Аллель **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития **Anomaly:** изменение экспрессии».

Запрос «Mutations or transgenes changing the gene expression pattern»

В командной строке пользователь набирает название интересующего гена. Результатом запроса является список мутаций и трансгенов, вызывающих аномальную экспрессию заданного гена или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Allele:** Аллель **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития **Anomaly:** изменение экспрессии» (Рис. 7).

Mutations or transgenes changing the gene expression pattern

stm

<< < 1 to 11 of total 33 results > >>

Show results per page

Gene	Allele	Organ	Stage	Anomaly
At:STM fil-8	yab3-2	leaf primordium	leaf development	normal
At:STM	yab3-2	rosette leaf	seedling	ectopic
At:STM fil-8	yab3-2	rosette leaf	seedling	ectopic
At:STM fil-8		rosette leaf	seedling	ectopic
At:STM fil-8	yab3-2	primary SAM	seedling	normal
At:STM esr1-drm-D		shoot apex, the subapical region	seedling	ectopic
At:STM esr1-drm-D		primary SAM	seedling	absent
At:STM 35S::TBP-2		shoot	adult phenotype	decreased
At:STM as2	se	shoot apex	all stages of the wt expression	normal
At:STM as2		shoot apex	all stages of the wt expression	normal

Рисунок 7. Пример результата работы запроса в интерфейсе AGNS. Запрос: «Mutations or transgenes changing the gene expression pattern» по поиску аномалий экспрессии гена STM.

Запрос «Genes with abnormal expressions in mutants or transgenic plants in certain organs».

В командной строке

пользователь набирает название интересующей стадии развития растения. Результатом запроса является список генов, экспрессия которых меняется на заданной стадии развития в мутантах и трансгенных растениях или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Allele:** Аллель **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития **Anomaly:** изменение экспрессии»

Запрос «Genes with abnormal expressions in mutants or transgenic plants at the certain stage»

В командной строке пользователь набирает название интересующего анатомического элемента растения. Результатом запроса является список генов, экспрессия которых меняется в определенном органе в мутантах и трансгенных растениях или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Allele:** Аллель **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития **Anomaly:** изменение экспрессии»

Запрос «Genes with concurred expression patterns»

В командной строке пользователь набирает название интересующего гена. Результатом запроса является список генов, паттерн экспрессии которых частично или полностью совпадают с паттерном экспрессии заданного гена или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития»

Запрос «Genes expressed before definite gene switch on»

В командной строке пользователь набирает название интересующего гена. Результатом запроса является список генов, начало экспрессии которых, описано до начальной стадии развития заданного гена или “Data about first step of definite gene expression isn't described in annotated publication”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития»

Запрос «Genes expressed after definite gene switch on»

В командной строке пользователь набирает название интересующего гена. Результатом запроса является список генов, начало экспрессии которых, описано после начальной стадии развития заданного гена или “Data about first step of definite gene expression isn't described in annotated publication”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития»

2.1.1.5. Осуществление автоматических запросов к AGNS Phenotype DataBase.

По закладке «Phenotypes» пользователь может зайти в раздел AGNS Phenotype DataBase. Здесь слева находится перечень имеющихся автоматических запросов к этому разделу базы. В командной строке пользователь может набрать ключевое слово по интересующему его запросу, в любом регистре. Так же пользователь может выбрать некоторые настройки запроса:

Галочка у «Substring» - поиск осуществляется внутри строки, иначе - требование полного совпадения слов.

Галочка у «case insensitive»- нечувствительный к регистру поиск.

Галочка у «regular expression»- поиск по регулярному выражению.

Также пользователь может выбрать количество результатов на страницу в окошке «Show me __ results per page».

Сохранение настроек осуществляется после нажатия пользователем кнопки «Submit»

В результатах запроса пользователь может производить сортировку данных по типу столбца (Ген, Анатомический Элемент, Стадия развития, Фенотип), нажав на соответствующий столбец.

Результаты запроса могут быть выведены в txt файл.

Описание имеющихся запросов:

Запрос «Mutations resulted in phenotypic abnormalities of the selected organs»

В командной строке пользователь набирает название интересующий анатомический элемент. Результатом запроса является список фенотипических аномалий, наблюдаемых в различных мутантах в данном анатомическом элементе или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития **Anomaly:** Фенотип».

Запрос «Mutations induced the same abnormalities»

В командной строке пользователь набирает название интересующего гена. Результатом запроса является список генов вызывающих сходные аномалии или спектр сходных аномалий или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Allele:** Аллель **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития **Anomaly:** Фенотип» (Рис. 8).

Mutations induced the same abnormalities

stm

<< < 1 to 11 of total 298 results > >>

Show results per page

Allele	Stage	Organ	Anomaly
35S::KNAT2	seedling	cotyledon	epinastic
35S::WUS 35S::STM	seedling	cotyledon	epinastic
35S::WUS	seedling	cotyledon	epinastic
tsd3	seedling	cotyledon	epinastic
35S::CUC1	seedling	cotyledon	fused
35S::mTCP4	seedling	cotyledon	fused
cuc1	seedling	cotyledon	fused
cuc1 cuc2	seedling	cotyledon	fused
cuc2	seedling	cotyledon	fused
stm-11	seedling	cotyledon	fused

Рисунок 8. Пример результата автоматического запроса в базе данных AGNS Phenotype DataBase. Запрос «Mutations induced the same abnormalities» для гена STM.

Запрос «Phenotype of the mutant»

В командной строке пользователь набирает название интересующего гена. Результатом запроса является список фенотипических аномалий, описанных для данного гена или “No results”. Результат представляется в виде списка строк заданного формата: «**Gene:** Ген **Organ:** Анатомический элемент **Stage:** Стадия развития **Anomaly:** Фенотип»

2.2. Программная компонента для исследования одномерной модели функционирования меристемы растения.

Стволовые клетки и их ниши.

Основную часть клеток взрослого организма составляют дифференцированные клетки. Каждая дифференцированная клетка, как правило, не делится и специализирована для выполнения некоторой функции в составе определенной ткани органа. Но, наряду с дифференцированными клетками, во взрослом организме существуют клетки, которые не дифференцированы, хотя могут быть “преддетерминированы”, т. е. судьба их в какой-то степени предопределена в том смысле, что они могут стать клетками определенного типа или некоторого ограниченного множества типов. Эти клетки, называемые стволовыми, продолжают с определенной скоростью делиться. Стволовые клетки имеют большое значение для жизни взрослого организма. В тканях животных они являются источником клеток для постоянно обновляющихся тканей (например, кожи), а у некоторых растений стволовые клетки меристемы побега (верхушки растения) обеспечивают рост растения на протяжении всей его жизни

Апикальная меристема растения – пример стволовых клеток и их ниши.

В качестве примера стволовых клеток и их ниши можно рассмотреть верхушечную меристему побега растения. На протяжении всей жизни растение поддерживает определенные группы клеток в недифференцированном состоянии. Главнейшей среди них является группа клеток на верхушке вегетативного побега растения, которая называется апикальной меристемой побега (АМП). Она содержит стволовые клетки, которые постоянно делятся, и, в конечном счете, дают начало всем клеткам растения. Хотя клетки АМП не дифференцированы, они детерминированы в отношении экспрессии определенных генов, и на этом основании АМП подразделяют на несколько компартментов, находящихся в определенном пространственном расположении друг относительно друга на протяжении всей жизни растения. Клетки, расположенные в 3-4 верхних слоях центральной зоны (ЦЗ) в радиусе 2–4 клетки от вертикальной оси АМП экспрессируют белок CLV3. Клетки нижних слоев ЦЗ экспрессируют белок WUS. Их относят к организационному центру (ОЦ), толщина которого в вертикальном направлении может составлять 2–3 клетки. Такое постоянство структуры АМП, как полагают, необходимо для поддержания пула стволовых клеток. Механизмы, обеспечивающие постоянство структуры АМП, являются предметом интенсивных экспериментальных и теоретических исследований. В частности, предполагается, что вокруг зоны, где наблюдается экспрессия WUS, имеется зона, где синтезируется мембранный комплекс CLV1/2, который является рецептором для CLV3. CLV3 может распространяться от места синтеза и, связываясь с комплексом CLV1/2, подавляет экспрессию WUS. На рис. 9 изображен поперечный срез апикальной меристемы побега *Arabidopsis*. Здесь L1 — наружный слой клеток, L2 — второй слой клеток, L3 — условно называется третьим слоем. Фактически в результате того, что клетки, находящиеся ниже второго слоя, делятся во всех плоскостях, это уже не слой, а скопление клеток, CZ — центральная зона, PZ — периферическая зона, RZ — риб-зона, здесь клетки начинают дифференцироваться в клетки сосудистой системы растения.

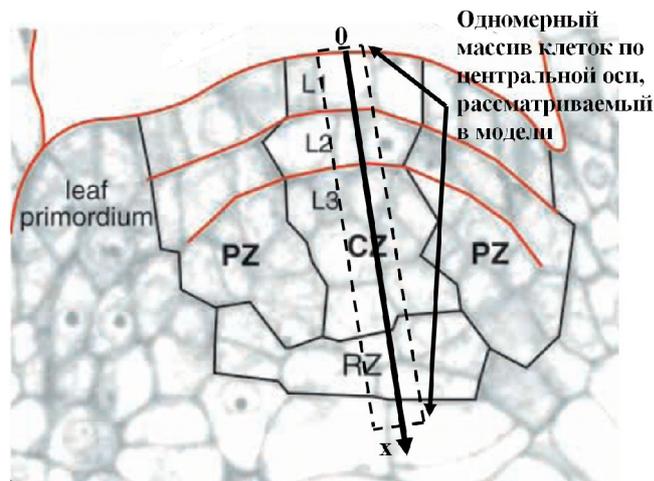


Рисунок 9. Поперечный срез апикальной меристемы побега *Arabidopsis*. Показана вертикальная ось, вдоль которой выделен одномерный массив клеток. На этом массиве клеток рассматривается обсуждаемая модель.

На основе анализа экспериментальных данных и представлений о типах взаимодействия между *CLV1*, *CLV2*, *CLV3* и *WUS*, принимая упрощающие предположения, можно построить простую одномерную модель с двумя морфогенами, которая имеет стационарные решения с хорошей биологической интерпретацией. Такая модель будет описана ниже в качестве примера постановки задачи моделирования регуляции размеров возобновительной зоны и последующего применения «Системы для моделирования компартиментализации возобновительной зоны биологической ткани».

Формулировка модели.

На рисунке 9 ось $0x$ направлена вниз от верхушки побега. Клетки вдоль оси принимаются за одномерный массив рассматриваемой модели. В данной модели исследуются возможные механизмы стабилизации положения организационного центра в вертикальном направлении относительно верхней точки меристемы в условиях смены резидентных клеток, и регуляции размера возобновительной зоны (расстояние от верхушки меристемы до ОЦ).

Для простоты рассмотрим вертикальный столбец клеток на оси меристемы. Две верхние клетки не делятся вертикально. Начиная с третьей клетки, могут делиться вертикально, а, следовательно, они создают поток клеток вниз по столбцу. Это позволяет в простейшем варианте рассматривать одномерную модель структуры меристемы.

В качестве возможного механизма мы будем рассматривать детерминацию клеток, управляемую позиционной информацией.

В модели мы предполагаем, что физическим носителем позиционной информации являются поля концентраций веществ, распространяющихся из различных источников (например, путем диффузии). В самом простом случае размер некоторой “выделенной” зоны от “начала системы отсчета” может определяться пороговым значением концентрации некоторого диффундирующего из начала отсчета вещества Y (например, зона активации W) (Рис. 10). Но если скорость синтеза вещества, “определяющего систему координат”, изменится, то изменится и размер зоны.

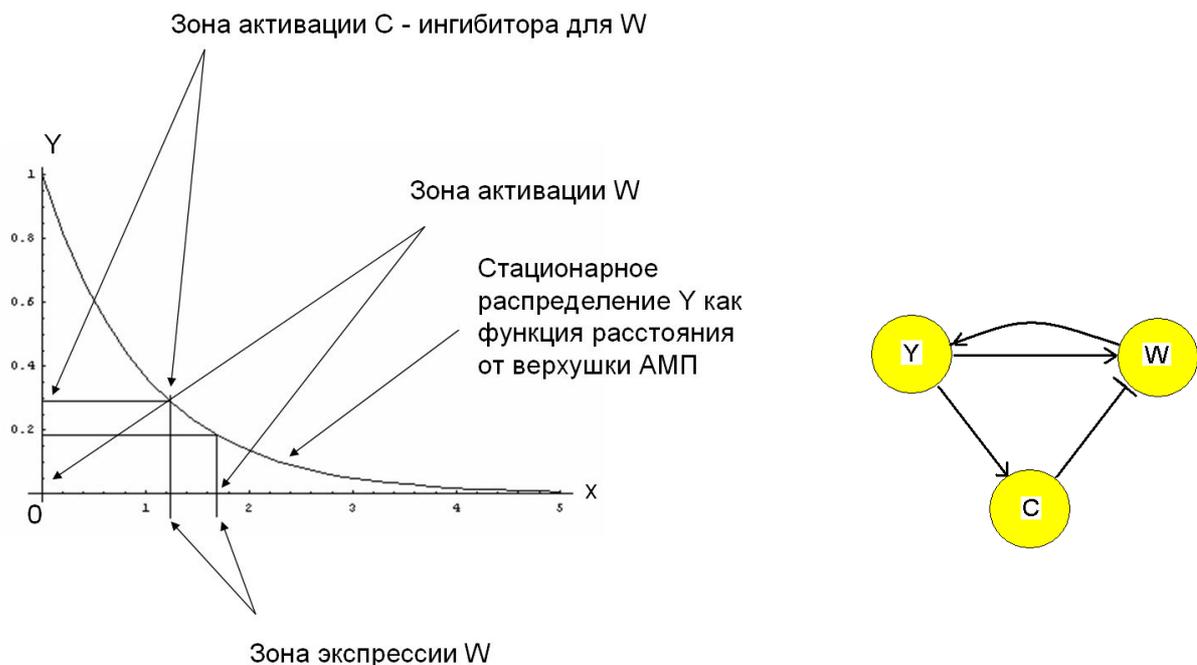


Рисунок 10. Схема одномерной модели. (а) Распределение Y в зависимости от расстояния от верхушки меристемы и его пороговые значения, при которых активируется экспрессия C и W. (б) Схема локальных взаимодействий между переменными модели.

В случае, когда при некоторой концентрации (довольно узкой) индуцируется “стабильный” источник W, его сигнал в начале координат может быть использован для “измерения” его расстояния от начала отсчета. Узкую зону индукции синтеза сигнала можно создать при наличии его ингибитора при больших концентрациях Y. В такой системе уровень W в начале координат может интерпретироваться как расстояние от начала координат до его источника: чем слабее сигнал, тем дальше зона его синтеза. Если скорость синтеза Y пропорциональна сигналу, то удаление сигнала будет приводить к снижению скорости синтеза Y, а следовательно, к “приближению” зоны синтеза сигнала.

Увеличение уровня сигнала в начале координат вызовет увеличение скорости синтеза Y, что приведет к “отодвиганию” источника сигнала от начала координат.

На рис. 10 “начало отсчета” связано с зоной активации Y. Здесь по оси $0x$ отложено расстояние в условных единицах вниз по вертикальной оси, проходящей через центр верхушки побега, по оси y — концентрация некоторого морфогена Y, распространяющегося из верхушки побега (из точки 0). В результате диффузии Y и его постоянного распада устанавливается некоторое стационарное распределение (убывающая функция от x). Вещество Y при концентрациях выше пороговых может активировать экспрессию генов, кодирующих вещества C и W. Причем порог активации для C выше порога активации для W. Предполагается, что C является репрессором экспрессии гена W. Поэтому экспрессия W подавляется, там, где происходит экспрессия C. Следовательно, экспрессия гена W реально происходит в зоне, удаленной от верхушки побега (от начала координат).

Описанные взаимодействия между веществами Y, C, W составляют основу простой модели, которую условно назовем «YW-модель».

Уравнения модели.

Рассмотрим одномерный массив из n клеток, разделенных клеточными стенками одинакового размера S , через которые между клетками массива может происходить перенос веществ Y, W. Клеточные стенки характеризуются обратными удельными

сопротивлениями переносу β_Y и β_W соответственно. В клетках могут происходить реакции синтеза веществ со скоростью зависящей от присутствия других веществ:

$$\frac{du_k}{dt} = \frac{1}{\tau_k} g(x), \quad x = \sum_j E_{kj} u_j + h_j.$$

Здесь E_{ij} - коэффициенты чувствительности регуляции, которые больше нуля, если вещество j стимулирует синтез вещества k , и меньше нуля – если угнетает; τ_k - коэффициенты, обратные максимальной скорости экспрессии. Параметры h_k , как и E_{ij} , определяют пороговые значения функции $g(x)$:

$$g(x) = \begin{cases} 0, & x \rightarrow -\infty \\ 1, & x \rightarrow +\infty \end{cases}$$

Для описания скоростей реакций в предлагаемой модели используется сигмоидная функция:

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

Далее, предполагается, что вещество Y синтезируется в клетке 1, и диффундирует в другие клетки массива. Скорость его синтеза зависит от концентрации вещества W в клетке 1. В зависимости от концентрации Y в других клетках может синтезироваться вещество S , которое не диффундирует, а только распадается. В тех же клетках, в зависимости от концентрации веществ Y и S , может синтезироваться вещество W , которое диффундирует по клеточному массиву, и, достигая клетки 1, регулирует синтез вещества Y .

Пусть диффузия описывается законом Фика, и пусть коэффициент диффузии внутри клеток много больше, чем коэффициент диффузии между клетками, так что внутри клетки концентрации веществ везде одинаковы. За время Δt в клетке i , количество вещества U изменится за счет (а) процессов диффузии между клетками $i-1$, i и $i+1$, (б) синтеза данного вещества в клетке с удельной скоростью $g(x)$ и (в) его распада в результате реакции первого порядка с коэффициентом скорости a_u :

$$\Delta U_i = \int_{\Delta t} \beta_u \cdot [u_{i-1}(\tau) - 2 \cdot u_i(\tau) + u_{i+1}(\tau)] \cdot S \cdot d\tau + \int_{\Delta t} [g(x, \tau) - a_u \cdot u(\tau)] \cdot l_i \cdot S \cdot d\tau.$$

Если длины всех клеток постоянны и одинаковы, $l_i = l$, то, деля все уравнения на $l \cdot S$, в пределе $\Delta t \rightarrow 0$ получаем дифференциальные уравнения для «сосредоточенных» концентраций:

$$u_i = b_u \cdot (u_{i-1} - 2 \cdot u_i + u_{i+1}) + g(x) - a_u \cdot u,$$

где $b_u = \frac{\beta_u}{l}$ – обратные сопротивления переносу.

В результате предлагаемая модель процесса формулируется как задача Коши для автономной системы уравнений следующего вида:

$$\frac{dy_i}{dt} = -a_y y_i + b_y (y_2 - y_1) + \frac{1}{\tau_y} g(X_1), \quad X_1 = h_y + E_{yw} w_1$$

$$i = 2, 3, \dots, n-1$$

$$\frac{dy_i}{dt} = -a_Y y_i + b_Y (y_{i-1} - 2y_i + y_{i+1}) \quad (1,1)$$

$$\frac{dy_n}{dt} = -a_Y y_n + b_Y (y_{n-1} - y_n)$$

$$i = 1, 2, \dots, n,$$

$$\frac{dc_i}{dt} = -a_C c_i + \frac{1}{\tau_C} g(U_i), \quad U_i = h_C + E_{CY} y_i \quad (1,2)$$

$$\frac{dw_1}{dt} = -a_W w_1 + b_W (w_2 - w_1) + \frac{1}{\tau_W} g(V_1), \quad V_1 = h_W + E_{WY} y_1 + E_{WC} c_1$$

$$i = 2, 3, \dots, n-1,$$

$$\frac{dw_i}{dt} = -a_W w_i + b_W (w_{i-1} - 2w_i + w_{i+1}) + \frac{1}{\tau_W} g(V_i), \quad V_i = h_W + E_{WY} y_i + E_{WC} c_i \quad (1,3)$$

$$\frac{dw_n}{dt} = -a_W w_n + b_W (w_{n-1} - w_n) + \frac{1}{\tau_W} g(V_n), \quad V_n = h_W + E_{WY} y_n + E_{WC} c_n$$

Начальные условия при $t = 0$:

$$y_i = y_i^0, \quad c_i = c_i^0, \quad w_i = w_i^0, \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (2)$$

Здесь y_i, c_i, w_i – концентрации веществ Y_i, C_i, W_i в i -ой клетке;
 a_Y, a_C, a_W – коэффициенты распада; b_Y, b_W – обратные сопротивления; определение параметров $\tau_Y, \tau_C, \tau_W, h_C, h_W, E_{CY}, E_{WY}, E_{WC}$ было дано выше.

2.2.1. Описание работы в системе для моделирования компартиментализации возобновительной зоны биологической ткани. Одномерный вариант.²

2.2.1.1. Начальные условия.

Поскольку в системе используется описанная выше модель, то основная задача пользователя – правильно интерпретировать изучаемую ситуацию в рамках принятой модели (по сути, «сформулировать» модель своей системы так, чтобы она совпала по структуре с данной моделью), и изучить ее поведение при заданных параметрах.

Начиная работу с приложением нужно обратить внимание на установленные параметры модели (Рис. 11). Их значения определяют свойства модели и её решений.

Введите параметры модели:

NC = <input style="width: 40px;" type="text" value="30"/>	<input type="button" value="Параметры по умолчанию"/>				
TAUy = <input style="width: 40px;" type="text" value="1"/>	Hu = <input style="width: 40px;" type="text" value="-5"/>	Eyw = <input style="width: 40px;" type="text" value="40"/>	Ay = <input style="width: 40px;" type="text" value="0.1"/>	By = <input style="width: 40px;" type="text" value="6"/>	
TAUw = <input style="width: 40px;" type="text" value="1"/>	Hw = <input style="width: 40px;" type="text" value="-30"/>	Ewy = <input style="width: 40px;" type="text" value="60"/>	Ewc = <input style="width: 40px;" type="text" value="-80"/>	Aw = <input style="width: 40px;" type="text" value="0.75"/>	Bw = <input style="width: 40px;" type="text" value="1.5"/>
TAUc = <input style="width: 40px;" type="text" value="1"/>	Hc = <input style="width: 40px;" type="text" value="-20.5"/>	Ecy = <input style="width: 40px;" type="text" value="20"/>	Ac = <input style="width: 40px;" type="text" value="1"/>	<input type="button" value="Установить параметры"/>	

² Подробнее о работе с данной программной компонентой смотри в Руководстве пользователя АСНИ-02, 4.2.8.3.

Рисунок 11. Меню выбора расчетных параметров в модели.

2.2.1.2. Поиск стационарных решений.

Основной вопрос, который прежде всего интересует при моделировании возобновительной зоны биологической ткани – существуют ли решения в виде стабильных во времени пространственных распределений некоторых характеристик, которые являются маркерами компартментов возобновительной зоны. Такие стабильные во времени решения называются «стационарными решениями». Для их поиска нужно выбрать закладку «Исследование» (Рис. 12).



Рисунок 12. Меню поиска стационарных решений модели.

2.2.1.3. Исследование устойчивости решений (задача Коши).

В данном случае нас интересует устойчивость стационарного решения к «возмущениям», которым подвергаются пространственные распределения концентраций при делениях клеток. Их «деление» имитируется выбором «клетки, которая делится» и выбором числа клеток, которые «возникают в процессе деления». Такая биологически некорректная процедура позволяет имитировать «одновременно» происшедшие деления и «нарушение» стационарного распределения. В результате решения задачи Коши – интегрирования динамической системы с «возмущенными» распределениями в качестве начальных условий, получается некоторая траектория динамики концентраций во времени в выбранной клетке. Эта траектория позволяет судить о типе устойчивости системы к данному возмущению. На рисунке 13 приведен пример колебательного режима, возникшего при некотором возмущении.

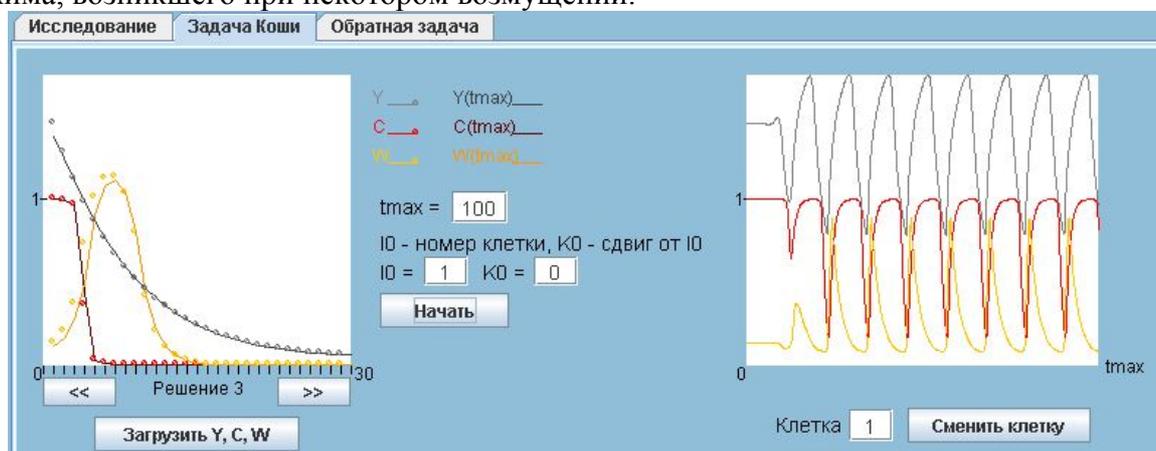


Рисунок 13. Результат расчета устойчивости стационарного решения. Решение не устойчиво.

4.2.1.4. Обратная задача.

Возможно, наиболее важно с прикладной точки зрения выяснить вопрос о существовании таких параметров, при которых данная модель согласуется с наблюдаемым распределением концентраций-маркеров. Этот вопрос в данной системе позволяет решить опция «Обратная задача» (Рис. 14).

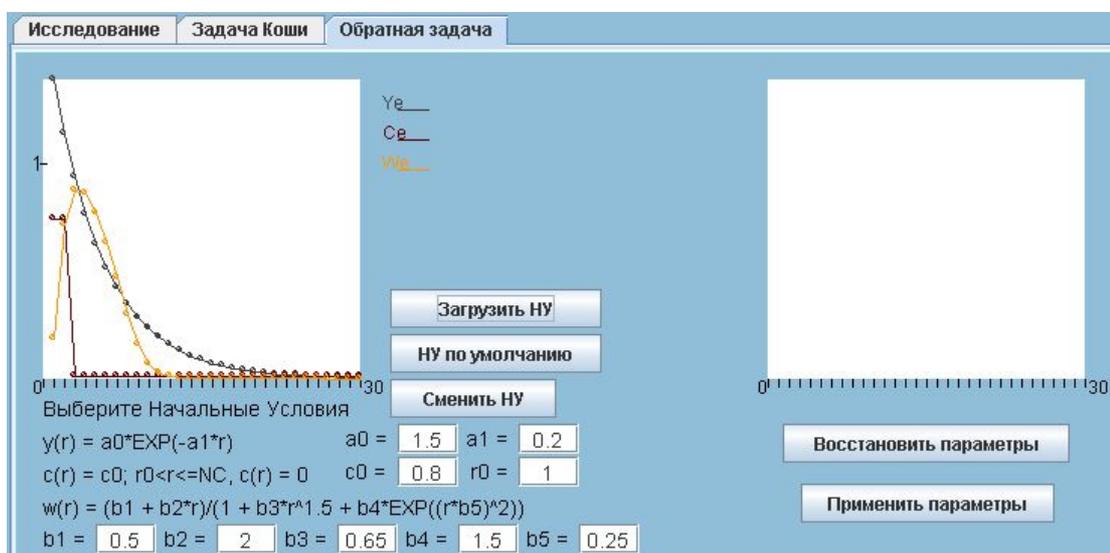


Рисунок 14. Меню решения обратной задачи по нахождению параметров модели.

К одномерной модели данного типа можно прийти, рассматривая протяженную плоскую ткань в направлении оси, перпендикулярной плоскости. Другой ситуацией применения данной модели может быть система с осевой симметрией, как в разобранный выше примером с меристемой растения. В этом случае может понадобиться рассмотрение дополнительных механизмов для моделирования динамики в других пространственных измерениях.

Таким образом, в подсистеме «Морфогенез» демонстрируется эффективность применения системного подхода к исследованиям механизмов морфогенеза. Системный подход осуществляется за счет:

- систематизации и интеграции информации о процессах морфогенеза в базе данных;
- логического анализа накопленной в базе данных информации с помощью эффективных систем навигации в базах данных, приводящий к извлечению новых знаний за счет интегративного анализа материала;
- компьютерного моделирования процессов морфогенеза на основе проведенного логического анализа.

База данных AGNS, уникальная по своей структуре и содержанию, является первым звеном в общей методологии системного изучения морфогенеза растения. База данных обеспечивает интеграцию данных о фенотипических аномалиях и молекулярных процессах, лежащих в их основе, и позволяет сравнивать аномалии в мутантах и трансгенных растениях с процессами, происходящими в нормальном растении. Имеющиеся в AGNS автоматические запросы осуществляют систематизацию данных, необходимую для их дальнейшего компьютерного логического анализа и моделирования.

Примером моделирования на основе данных AGNS является модель структурно-функциональной организации возобновительной зоны на примере апикальной меристемы побега, которая рассматривает установление границы между популяцией клеток и потомками этих клеток, вставших на новый путь дифференцировки. Гипотезы о действии морфогена и пространственно разобщенных контуров регуляции активности генов в этой

модели построены на основе данных по генетической регуляции активности генов WUSCHEL и CLAVATA3 у арабидопсиса.

3. Полезные ссылки:

1. International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome. // Nature. 2005. V. 436 N. 7052 P. 793-800.
2. Hertzberg M et al. A transcriptional roadmap to wood formation. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. V. 98. N. 25 P. 14732-7.
3. Limpens E, Bisseling T. Signaling in symbiosis. // Curr Opin Plant Biol. 2003. V. 6 N. 4 P. 343-50.
4. С.В. Николаев, Н.А. Колчанов, С.И. Фадеев, В.В. Когай, Э. Мйолснесс. Исследование Одномерной Модели Регуляции Размеров Возобновительной Зоны в Биологической Ткани. // *Вычислительные технологии*. 2006. Н. 11. Стр. 65-79.