

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 573.2,57.017.6

МОДЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ БЕЛКОВ CLV1, CLV2, CLV3 И WUS
В РЕГУЛЯЦИИ СТРУКТУРЫ АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ ПОБЕГА¹

© 2007 г. С. В. Николаев*, А. В. Пененко**, В. В. Лавреха*, Э. Д. Мелснесс***, Н. А. Колчанов*

*Институт цитологии и генетики СО РАН

630090 Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 10

**Институт вычислительной математики и математической геофизики СО РАН

630090 Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 6

***Институт геномики и биоинформатики, Университет Калифорнии

Ирвайн, СА 92607, США

E-mail: nikolaev@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 30.05.2007 г.

Для выяснения роли белков CLV1, CLV2, CLV3 и WUS в механизме поддержания компартментной структуры (пространственное расположение зон синтеза белков-маркеров) апикальной меристемы побега была построена модель такого механизма. Вычислительные эксперименты приводили к биологически правдоподобным решениям только тогда, когда синтез вещества W в пространстве между организующим центром и верхушкой меристемы ограничивался по механизму, основанному на взаимодействии белка CLV3 с мембранным рецептором CLV1/CLV2, а нижняя граница зоны синтеза W определялась изолинией соответствующего порогового уровня концентрации вещества Y. Показано, что рассматриваемая модель типа “реакция-диффузия”, формализующая представления о роли белков CLV3, CLV1/CLV2 и WUS, может описывать основу механизма регуляции компартментной структуры апикальной меристемы побега и позиционирования организующего центра в определенном месте клеточного ансамбля такой меристемы.

Ключевые слова: морфогенез, апикальная меристема побега, модель типа “реакция-диффузия”.

Согласно принятым в настоящее время представлениям (Sharma et al., 2003), в апикальной меристеме (АМ) побега центральная зона (ЦЗ) является источником стволовых клеток, а периферическая зона (ПЗ) и организующий центр (ОЦ) – зонами переходных делящихся клеток. В вегетативной АМ побега ЦЗ расположена в трех-четырех верхних слоях меристемы (Reddy, Meyerowitz, 2005) в радиусе двух-четырех клеток от вертикальной оси АМ (Clark, 1997). ОЦ находится прямо под ЦЗ, и его толщина в вертикальном направлении составляет две-три клетки. В клетках ЦЗ экспрессируется ген *CLV3* (Clark et al., 1995), а в клетках ОЦ – ген *WUS* (Laux et al., 1996). Вокруг зоны, где наблюдается экспрессия *WUS*, расположена область, в которой синтезируется мембран-

ный комплекс CLV1/CLV2, являющийся рецептором для белка CLV3. CLV3, связываясь с комплексом CLV1/CLV2, подавляет экспрессию гена *WUS* (Sharma et al., 2003). Таким образом, регуляция компартментной структуры АМ побега сводится к установлению границ между ЦЗ и ПЗ, а также ЦЗ и ОЦ, в последнем случае – это установление границы между компартментами экспрессии генов *CLV3* и *WUS*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Учитывая литературные данные о предполагаемой роли белков CLV1/CLV2, CLV3 и WUS в регуляции компартментной структуры АМ побега, построили математическую модель такой регуляции на двумерной области, состоящей из клеток. На основе модели была разработана программа в среде MATLAB7, которая использовалась для вычислительных экспериментов с целью поиска набора параметров, дающих решения, качественно согласующиеся с литературными данными.

Предпосылки модели. Как упоминалось выше, белок CLV3 синтезируется в стволовых клетках ЦЗ АМ побега и распространяется из них по меристеме (Lenhard, Laux, 2003), что позволяет мо-

¹ Работа поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (Госконтракт № 02.467.11.1005), Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-07-98012), Российской академией наук (проекты № 10104-34/П-18/155-270/1105-06-001/28/2006-1 и “Компьютерное моделирование и экспериментальное конструирование генных сетей”), Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, СО РАН (Интеграционный проект № 115) и Национальным научным фондом США (FIBR EF-0330786 “Моделирование развития и биоинформатика”).

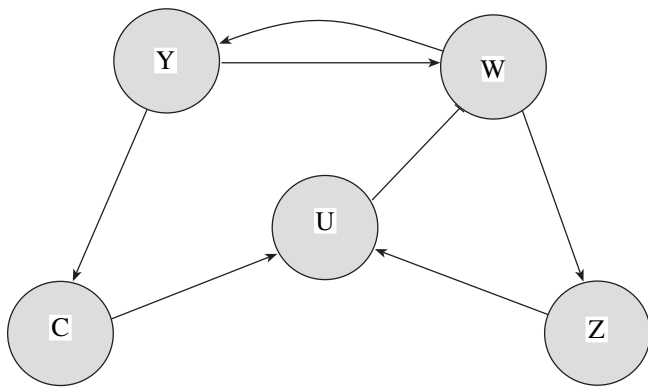


Рис. 1. Схема “локальной” регуляции динамики концентраций веществ Y , C , Z , U , W в модели (см. в тексте). (\longrightarrow) – активация, ($\longrightarrow|$) – ингибирование.

делировать такое распространение диффузией. Мембранным рецептором для CLV3 является белковый комплекс CLV1/CLV2, который локализуется в поверхностных слоях корпуса, а внутри зоны его локализации находится ОЦ (область экспрессии гена WUS). Когда диффундирующий белок CLV3 достигает зоны локализации CLV1/CLV2, он связывается с рецептором CLV1/CLV2 и образует белковый комплекс, запускающий каскад передачи сигнала для подавления экспрессии WUS в клетках на границе ОЦ (Rojo et al., 2002; Lenhard, Laux, 2003). Включение этого механизма в модель позволило изучать его роль в формировании и позиционировании ОЦ в АМ побега.

Ранее было показано (Николаев и др., 2006), что позиционирование экспрессии WUS на определенном расстоянии от верхушки АМ побега можно обеспечить с помощью механизма, основанного на взаимной активации экспрессии WUS и некоторого гипотетического гена Y продуктами их экспрессии. Вещество Y синтезируется в первом слое АМ и диффундирует по клеточному ансамблю АМ побега. Важная роль верхнего слоя АМ побега в формировании ЦЗ показана в работе Рейнхарда и др. (Reinhardt et al., 2003), поэтому мы приняли предположение об активирующей роли Y и в представленной здесь модели.

Так как, с одной стороны, мы предположили, что WUS активирует экспрессию Y в удаленных от ОЦ клетках, а с другой стороны, нет свидетельств того, что WUS обнаруживается за пределами ОЦ, мы принимаем, что этот белок в синтезирующих его клетках активирует синтез некоторого диффундирующего вещества – непосредственного активатора экспрессии Y . Для упрощения модели белок WUS и WUS -зависимый активатор для Y отождествлены в веществе W .

Модель. Двухмерный клеточный массив, рассматриваемый в модели, представляет собой вертикальный срез АМ побега; здесь будем обсуждать вариант, когда область клеток ограничена параболой (аппроксимация формы вертикального разреза меристемы параболой использовалась, например, в работе Мейсенхеймера (Meisenheimer, 1979)). Предположим, что верхний слой клеток является местом синтеза диффундирующего вещества Y . Этот синтез регулируется веществом W , которое распространяется из зоны своего синтеза. Предположим также, что при концентрациях Y больше пороговой может происходить синтез диффундирующего вещества C , которое в нашей модели представляет белок CLV3. Синтез вещества W регулируется по следующему механизму. W может синтезироваться в клетках области, где концентрация Y больше некоторого порога, причем этот порог не больше порога синтеза C , таким образом зона разрешенного синтеза W простирается от источника Y дальше аналогичной зоны для C . Предположим, что везде, где концентрация W превышает некоторый порог, может синтезироваться вещество Z , которое не диффундирует и представляет в модели мембранный комплекс CLV1/CLV2. Далее, согласно вышеизложенным представлениям, предположим, что C и Z могут необратимо образовывать комплекс U , который подавляет экспрессию W .

Суть предполагаемого механизма регуляции синтеза W состоит в следующем. В то время как Y стимулирует синтез W , последний создает механизм для подавления своего синтеза, активируя синтез Z . При распространении W против градиента своей концентрации, например путем диффузии, вещество Z будет синтезироваться в некоторой области, внутри которой находится область синтеза W . Если область синтеза C не совпадает с таковой для W , то можно представить, что C диффундирует снаружи в “пятно” Z и при этом “поглощается” в результате образования комплекса U . При некоторых соотношениях скоростей диффузии C , его “поглощения” и скорости возобновления уровня Z внутри “пятна” Z будет поддерживаться зона без C и, следовательно, без U . В этой внутренней зоне и будет разрешен синтез W . На рис. 1 показана схема “локальной” регуляции динамики концентраций веществ Y , C , Z , U , W .

Уравнения модели. Рассмотрим двухмерный массив из n клеток; клетки i и j разделены межклеточными границами (клеточные стенки и плазмалеммы) площади S_{ij} , через которые может происходить перенос веществ Y , C и W . Межклеточные границы характеризуются коэффициентами проницаемости β_Y , β_C и β_W соответственно. В клетках могут происходить реакции синтеза веществ k , $k \in \{W, C, Y, Z\}$, со скоростями изменения

соответствующих концентраций $p^k, p^k \in \{y, c, w, z\}$, зависящими от присутствия других веществ:

$$\frac{dp^k}{dt} = \frac{1}{\tau_k} g(x^k),$$

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

$$x^k = \sum_j E_{kj} p^j + h_k, \quad k, j \in \{Y, C, W, Z\}.$$

Здесь p^k – концентрация k -го вещества; E_{kj} – коэффициенты чувствительности регуляции > 0 , если вещество j стимулирует синтез вещества k , и < 0 – если угнетает; τ_k – коэффициенты, обратные максимальной скорости экспрессии. Параметры h_k определяют пороговые значения функции $g(x^k)$. Таким образом, x^k – безразмерная управляющая переменная функции зависимости скорости синтеза вещества k от концентраций других веществ, присутствующих в клетке. Для описания скоростей экспрессии (синтеза) в предлагаемой модели в качестве $g(x)$ используется сигмоидная функция:

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

Пусть диффузия описывается законом Фика и пусть коэффициент диффузии внутри клеток много больше, чем таковой между клетками, так что внутри клетки концентрации веществ везде одинаковы. За время Δt в клетке i количество вещества P изменится за счет: а) потоков $J_{ij}(\tau)$ вещества P между клеткой i и клетками $j, j \in \varepsilon(i)$, где $\varepsilon(i)$ – множество соседей клетки i ; б) синтеза данного вещества в клетке с удельной скоростью $g(x_i^P)$ и в) его распада в результате реакции первого порядка с коэффициентом скорости d_p . В случае диффузии $J_{ij}(\tau) = \beta^P S_{ij}(\tau)(p_j(\tau) - p_i(\tau))$, где $p(\tau)$ – концентрация вещества P . В результате можно написать уравнение баланса для вещества P :

$$\Delta P_i = \sum_{j \in \varepsilon(i) \Delta t} \int \beta^P S_{ij}(\tau)(p_j(\tau) - p_i(\tau)) d\tau + \\ + v_P g_P(x_i^P) V_i(\tau) - d_P p_i(\tau) V_i(\tau).$$

Применяя теорему о среднем для интегралов и переходя к пределу $\Delta t \rightarrow 0$, получаем:

$$\frac{1}{V_i} \frac{dP_i}{dt} = \sum_{j \in \varepsilon(i)} \frac{\beta^P S_{ij}(p_j - p_i)}{V_i} + v_P g_P(x_i^P) - d_P p_i.$$

Уравнение для концентрации находим стандартным способом из определения концентрации $p = \frac{V}{P}$ с использованием правил дифференцирования:

$$\frac{dp}{dt} = \frac{V \frac{dP}{dt} - P \frac{dV}{dt}}{V^2} = \frac{1}{V} \frac{dP}{dt} - p \frac{1}{V} \frac{dV}{dt}.$$

Подставляя вместо первого слагаемого в правую часть выражение для $\frac{1}{V} \frac{dP}{dt}$, получаем:

$$\frac{dp_i}{dt} = \sum_{j \in \varepsilon(i)} \frac{\beta^P S_{ij}(p_j - p_i)}{V_i} + v_P g_P(x_i^P) - \\ - d_P p_i - p_i \frac{1}{V_i} \frac{dV_i}{dt}.$$

Если клетки не растут, то $\frac{dV_i}{dt} = 0$ и $S_{ij} = \text{const}, V_i = \text{const}$.

Применяя эти рассуждения ко всем веществам, рассматриваемым выше, получаем модель в виде системы обыкновенных дифференциальных уравнений:

$$\frac{dy_i}{dt} = \sum_{j \in \varepsilon(i)} \frac{\beta^Y S_{ij}(y_j - y_i)}{V_i} + v_Y g_Y(x_i^Y) - d_Y y_i,$$

$$\frac{dc_i}{dt} = \sum_{j \in \varepsilon(i)} \frac{\beta^C S_{ij}(c_j - c_i)}{V_i} + v_C g_C(x_i^C) - d_C c_i - \alpha c_i z_i,$$

$$\frac{dw_i}{dt} = \sum_{j \in \varepsilon(i)} \frac{\beta^W S_{ij}(w_j - w_i)}{V_i} + v_W g_W(x_i^W) - d_W w_i,$$

$$\frac{dz_i}{dt} = v_Z g_Z(x_i^Z) - d_Z z_i - \alpha c_i z_i.$$

Здесь $v_k, k \in \{Y, W, C, Z\}$ – максимальные скорости синтеза соответствующих веществ. Предполагается, что С (CLV3) может необратимо образовывать комплекс с Z (димерный рецептор CLV2/CLV2), который и запускает механизм репрессии синтеза W.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Следствием принятых предположений, положенных в основу рассматриваемой модели, является то, что множество геометрических форм областей синтеза С, Z, U, W определяется механизмами распространения веществ (в данном случае диффузией) Y, C, W с соответствующими краевыми усло-

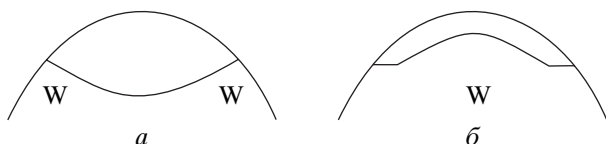
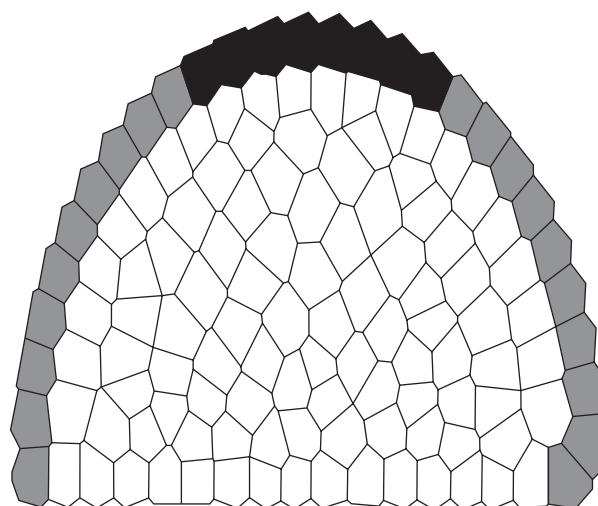


Рис. 2. Примеры расположения зоны синтеза *W*: *a* – около границы области при выпуклой границе зоны синтеза *C*; *б* – посередине при вогнутой границе зоны синтеза *C*.

виями и процессами поглощения и/или распада диффундирующих веществ. Именно изолинии концентраций этих веществ и определяют в каждый момент времени все множество форм различных зон. Исходя из этого, становится понятным, что на геометрию стационарных областей синтеза *W* сильно влияет геометрия зон синтеза *Y* и *C*. В частности, показано (Николаев и др., 2007), что если граница зоны синтеза *C* относительно верхушки области выпукла, то зоны синтеза *W* могут выходить на границы области (рис. 2, *a*), если же вогнута – то может быть посередине (рис. 2, *б*). В свою очередь граница зоны синтеза *C* либо является изолинией концентрации *Y*, соответствующей некоторому набору параметров, либо может дополнительно определяться морфологически, например, показано (Rojo et al., 2002), что синтез *C* возможен только в двух верхних клеточных слоях меристемы. В связи с этим было введено морфологическое ограничение на допустимую зону синтеза, которое запрещает синтез *C* за пределами нескольких верхних слоев клеток.

Расчет модели проводили на гипотетических двумерных клеточных пластах, построенных по описанному ниже алгоритму. На рис. 3 представлен один из таких клеточных пластов с указанием области разрешенных синтезов *Y* и *C*. Распределение клеток в области получали с помощью следующей процедуры: задавали исходную область, имеющую форму полукруга с радиусом *R*, на ней вводили полярную систему координат (*r*, φ) с центром в точке с координатами (0, 0). Далее область “заселяли” случайными (с определенной средней плотностью) точками – центрами клеток и затем строились разбиение Вороного данной области. Для этого использовали функцию *voronoi()*, входящую в библиотеку функций системы MATLAB7. Каждая клетка полученного пласта имеет свой



Структура области

Рис. 3. Пример распределения клеток в исходной области. Синтез в клетках веществ *Y* (■) и *C* (■, ■) разрешен.

уникальный индекс *i*. Концентрации рассматриваемых веществ считаются постоянными внутри одной клетки, но могут различаться в разных клетках. Концентрации веществ *W*, *Z*, *C*, *Y* внутри клетки *i* обозначаются через w_i , z_i , c_i , y_i соответственно.

Учитывая влияния геометрии на стационарные решения, которые обсуждались выше, предполагается, что синтез *C* разрешен только в клетках, координаты центров которых удовлетворяют условию:

$$r_C \leq r \leq R,$$

а синтез *Y* – в клетках, координаты центров которых удовлетворяют условию:

$$r_Y \leq r \leq R, \quad \frac{\pi}{2} - \delta \leq \varphi \leq \frac{\pi}{2} + \delta.$$

В результате исследования модели были найдены параметры, которые позволили получить стационарные распределения концентраций и скорости синтеза *W*, находящихся в качественном соответствии с экспериментально наблюдаемыми. Значения параметров представлены ниже, а полученное в результате стационарное решение для скорости синтеза *W* – на рис. 4.

Значение параметров

число клеток	D_W	d_W	τ_W	h_W	T_{WY}	T_{WU}	d_Z	α	τ_Z	h_Z	R	r_Y	T_{ZW}	D_C	d_C	τ_C	h_C	T_{CY}	D_Y	d_Y	τ_Y	h_Y	T_{YW}	r_C	δ
128	5	1	1	-88.9379	1500	-11900	1	1	1	10	100	85	0	50	1	1	-88.937	1500	50	0.2	1	-0.1	1000	70	$\frac{\pi}{6}$

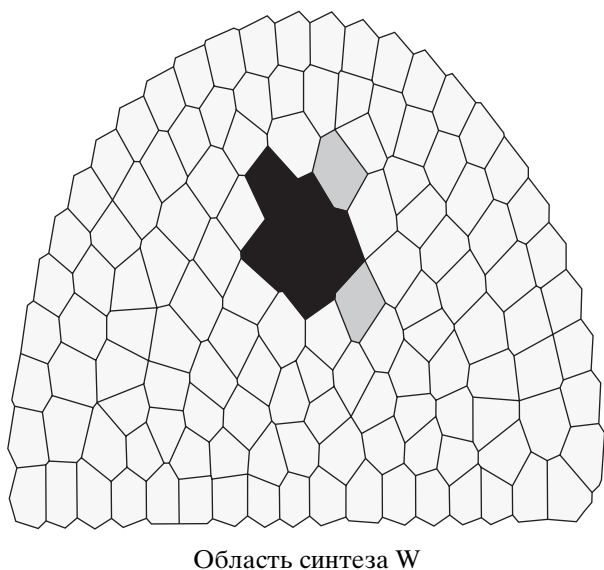


Рис. 4. Стационарное распределение уровня синтеза W для одного из модельных расчетов клеточной структуры области.

Важно отметить, что расчетные эксперименты приводили к биологически правдоподобным решениям только тогда, когда синтез W в пространстве между ОЦ (зона реального синтеза W) и верхушкой меристемы (зона потенциального синтеза W) ограничивался по механизму, описанному выше при формулировке ССW-модели. При этом во всех случаях нижняя граница зоны синтеза W определялась изолинией соответствующего порогового уровня концентрации вещества Y. В публикациях, посвященных изучению рассматриваемого здесь механизма, эта деталь не рассматривается. Как правило, при этом ограничиваются обсуждением взаимной регуляции, основанной на взаимодействии белка CLV3 с рецептором CLV1/CLV2, и изображают область синтеза CLV1/CLV2 вокруг ОЦ. Хотя в работе Ленхарда и Лаукса (Lenhard, Laux, 2003) в качестве иллюстрации механизма регуляции экспрессии WUS изображена именно та ситуация (рис. 5), которую мы выявили при модельном изучении.

Согласно постулированной распределенной регуляции взаимодействие между ОЦ и областью синтеза Y в первом (наружном) слое АМ побега является основой позиционирования ОЦ и одновременной регуляции интенсивности синтеза Y; последний в свою очередь влияет на размеры области некоторых пороговых значений Y. То, что такой механизм “работает”, дает возможность предложить следующую биологическую интерпретацию: именно Y, а не белок WUS определяет область ЦЗ – нишу стволовых клеток.

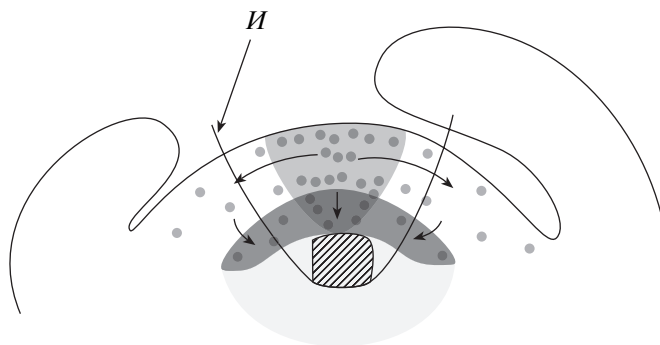


Рис. 5. Схема механизма регуляции экспрессии гена WUS (по: Lenhard, Laux, 2003, с изменениями). И – изолиния пороговой концентрации вещества Y, ниже которой нет синтеза вещества W. (■) – синтез белка CLV3, (⊕) – присутствие CLV3, (→) – распространение белка CLV3, (□) – присутствие комплекса CLV1/CLV2, (■) – комплекс CLV3 и CLV1/CLV2, (▨) – экспрессия гена WUS.

Роль диффундирующих морфогенов в формировании компартментной структуры ткани до сих пор является предметом исследования (Ashe, Briscoe, 2006). Рассматриваемая здесь модель типа “реакция-диффузия”, формализующая представления о роли белков CLV3, CLV1/CLV2 и WUS, может описывать основу механизма регуляции компартментной структуры АМ побега и позиционирования ОЦ в определенном месте клеточного ансамбля АМП. В то же время следует отметить, что большие значения коэффициентов чувствительности регуляции, которые требуются для возникновения границ компартментов, свидетельствуют о том, что скорее всего существуют дополнительные механизмы формирования границ компартментов, такие как, например, непосредственные межклеточные (juxtacrine) взаимодействия.

Авторы выражают благодарность С.И. Фадееву, Н.А. Омелянчук, В.В. Мироновой за полезные дискуссии и консультации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Николаев С.В., Колчанов Н.А., Фадеев С.И. и др. Исследование одномерной модели регуляции размеров возобновительной зоны в биологической ткани // Вычислит. технологии. 2006. Т. 11. № 2. С. 67–81.

Николаев С.В., Фадеев С.И., Пененко А.В. и др. Системный подход к исследованию морфогенеза *Arabidopsis thaliana*. II. Моделирование регуляции структуры меристемы побега // Биофизика. 2007. (в печати)

Ashe H.L., Briscoe J. The interpretation of morphogen gradients // Development. 2006. V. 133. P. 385–394.

- Clark S.E. Organ formation at the vegetative shoot meristem // *Plant Cell*. 1997. V. 9. P. 1067–1076.
- Clark S.E., Running M.P., Meyerowitz E.M. CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA // *Development*. 1995. V. 121. P. 2057–2067.
- Laux T., Mayer K.F.X., Berger J., Jürgens G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis* // *Ibid.* 1996. V. 122. P. 87–96.
- Lenhard M., Laux T. Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1 // *Ibid.* 2003. V. 130. P. 3163–3173.
- Meicenheimer R.D. Relationships between shoot growth and changing phyllotaxy of *Ranunculus* // *Am. J. Botan.* 1979. V. 66. P. 557–569.
- Reddy G.V., Meyerowitz E.M. Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex // *Science*. 2005. V. 310. P. 663–667.
- Reinhardt D., Frenz M., Mandel T., Kuhlemeier C. Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem // *Development*. 2003. V. 130. P. 4073–4083.
- 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.
- Sharma V.K., Carles C., Fletcher J.C. Maintenance of stem cell populations in plants // *PNAS*. 2003. V. 100. P. 11823–11829.

A Model Study of the Role of Proteins CLV1, CLV2, CLV3, and WUS in Regulation of the Structure of the Shoot Apical Meristem

© 2007 г. S. V. Nikolaev*, A. V. Penenko**, V. V. Lavrekha*,
E. D. Melsness***, and N. A. Kolchanov*

* *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

** *Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrent'eva 6, Novosibirsk, 630090 Russia*

*** *Institute of Genomics and Bioinformatics, University of California, Irvine, CA 92607 USA*

E-mail: nikolaev@bionet.nsc.ru

Received May 30, 2007

Abstract—In order to elucidate the role of proteins CLV1, CLV2, CLV3, and WUS in the mechanism underlying the maintenance of compartmental structure (spatial arrangement of the zones of biosynthesis of marker proteins) of the shoot apical meristem, a model of such mechanism was developed. Computational experiments led to biologically plausible solutions only when synthesis of substance W in a space between the organizing center and meristem apex was limited by the mechanism based on interaction of CLV3 with membrane receptor CLV1/CKV2 and lower boundary of the zone of W synthesis was determined by isoline of the corresponding threshold level of substance Y concentration. The model of the “reaction-diffusion” type formalizing the role proteins CLV1, CLV2, CLV3, and WUS can describe the basis of the mechanism underlying regulation of the compartmental structure of the shoot apical meristem and positioning of the organizing center in a certain site of the cell ensemble of such meristem.

Key words: morphogenesis, shoot apical meristem, model of reaction-diffusion type.