

## МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЗМА АУКСИНА В КЛЕТКЕ МЕРИСТЕМЫ ПОБЕГА РАСТЕНИЯ

И.Р. Акбердин<sup>1</sup>, Ф.В. Казанцев<sup>1</sup>, Н.А. Омелянчук<sup>1</sup>, В.А. Лихошвай<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: akberdin@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Разработана структурная модель генной сети метаболизма ауксина в клетке растения с учётом генетической регуляции (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/systems/mgl/genenet/>). На основе структурной модели и литературных данных разработана база математических моделей 235 элементарных подсистем: ферментативных реакций метаболизма ауксина и генетической регуляции экспрессии кодирующих их генов. Проведен компьютерный анализ динамики режимов нормального и аномального функционирования системы регуляции метаболизма ауксина; продемонстрирована адекватность теоретических расчетов к экспериментальным данным.

**Ключевые слова:** ауксин, математическая модель, компьютерный анализ, конъюгация, *Arabidopsis thaliana* L.

### Введение

Гормон ауксин (класс низкомолекулярных соединений, относящихся к производным индола) является одним из важнейших веществ, участвующих в регуляции различных биологических процессов растений, особенно их морфогенеза. Координация ауксином процессов роста и развития растений осуществляется через контролируемое формирование паттернов распределения ауксина и дозозависимых механизмов его действия. Изучение регуляции, действия и взаимодействий ауксина с другими фитогормонами и рецепторами является актуальной проблемой биологии развития растений. Применение технологий математического моделирования позволяет провести теоретический анализ движения и распределения паттернов ауксина в развивающейся ткани; исследовать *in silico* альтернативные гипотезы относительно роли ауксина как одного из сигналов развития и сравнить их с данными, полученными *in vivo*; проанализировать влияние и роль мутаций, связанных с изменением функционирования системы метаболизма и транспорта фитогормона, регулирующих рост и развитие растений.

В настоящей работе реконструируется математическая модель и проводится теоретический анализ механизмов регуляции метаболизма ауксина при развитии меристемы побега *Arabidopsis thaliana* L.

### Материалы и методы

Для реконструкции генной сети внутриклеточной регуляции метаболизма ауксина использованы база данных и модуль визуализации генных сетей *GeneNet* (Ananko *et al.*, 2005), разработанные в Институте цитологии и генетики СО РАН.

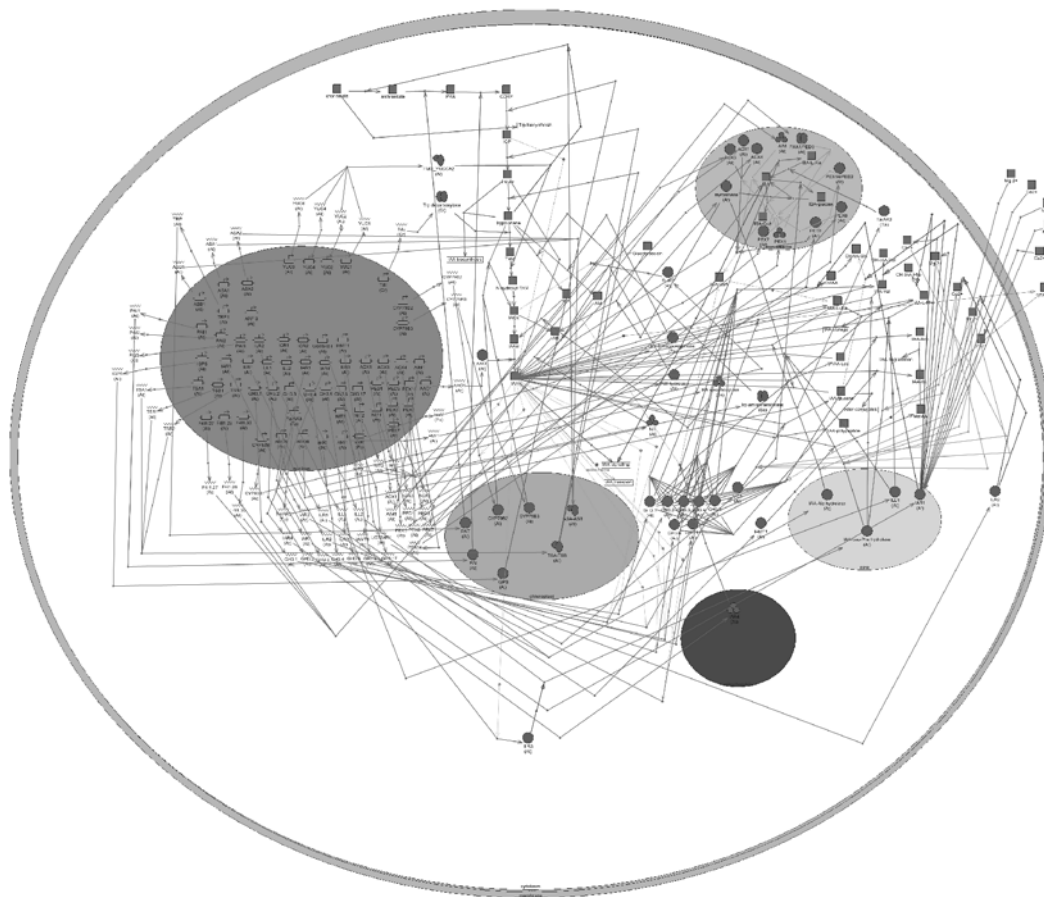
Автоматическая генерация базы элементарных моделей молекулярно-генетических систем осуществлялась на основе программного модуля MGSgenerator (Kazantsev *et al.*, 2008a), который является промежуточным звеном в процессе генерации математических моделей. Его цель – построение математической модели по имеющемуся структурно-функциональному описанию генной сети (ГС) и некоторой дополнительной информации. Модуль имеет собственный стандарт организации данных и программный интерфейс (API), с помощью

которого возможно разрабатывать модули генерации математических моделей для различных источников, описывающих ГС. Используемая в исследовании версия генератора полностью построена по технологии «Plug-in». Такая организация позволяет минимальными усилиями наращивать и изменять функциональность существующей системы и интегрировать ее с новыми. Для реконструкции и анализа комплексной математической модели генной сети метаболизма ауксина использовалась компьютерная система MGSmodeller (Kazantsev *et al.*, 2008b), которая разработана на языке Java. Данная система содержит следующие модули: «конструктор/редактор моделей», «расчет моделей», «обратная задача», «оптимальное управление». Многофункциональность системы основывается на возможностях каждого модуля. Модуль

«конструктор/редактор моделей» позволяет создавать и редактировать модели, используя оригинальный стандарт спецификации моделей «SiBML». Пользовательский интерфейс системы MGSmodeller позволяет иерархически отображать данные, редактировать их и наглядно отображать результаты расчета и анализа математических моделей.

### Результаты и обсуждение

**Разработка и адаптация модели.** На основе разработанной в Институте цитологии и генетики СО РАН базы данных и модуля визуализации генных сетей *GeneNet* (Ananko *et al.*, 2005) реконструирована структурная модель генной сети внутриклеточной регуляции метаболизма ауксина (рис. 1). Для реконструкции исполь-



**Рис. 1.** Структурная модель генной сети метаболизма ауксина. Структура генной сети реконструирована на основе 107 литературных источников и содержит 62 гена (□), 56 мРНК (~~~~) и 44 белка (●). Она включает 245 молекулярно-генетических процессов, распределенных по 8 компартментам: цитоплазма, клеточная мембрана, ядро, пероксисома, эндоплазматический ретикулум, митохондрия, хлоропласт и внеклеточное пространство.

зованы данные из 107 научных публикаций. В табл. 1 приведена статистика компонентов структурной модели генной сети метаболизма ауксина.

**Таблица 1**  
Компоненты генной сети  
метаболизма ауксина\*

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

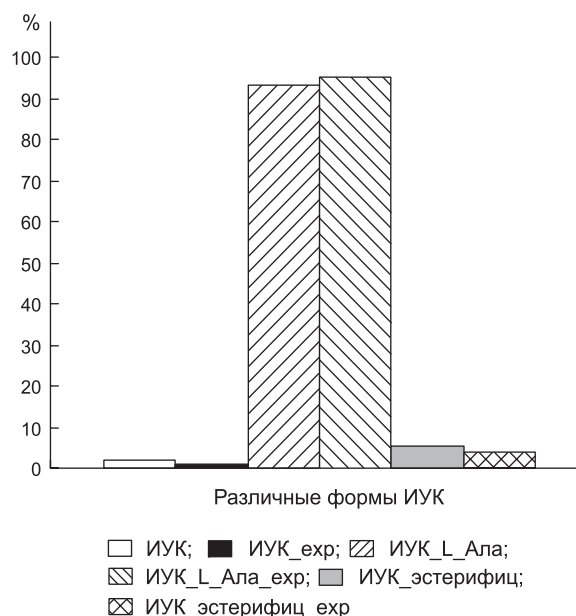
\* Комментарии к таблице в тексте.

Структурная модель описывает основной триптофан-зависимый путь биосинтеза ауксина и триптофан-независимый путь его биосинтеза из индола, а также включает описание основных путей конъюгации и деградации ауксина в клетках меристемы побега и корня. Основной путь биосинтеза ауксина содержит две отрицательные обратные связи: 1) триптофан аллостерически ингибирует ферментативную реакцию превращения хоризмата в антранилаат (предшественники триптофана); 2) ауксин активирует транскрипцию мРНК GH3 белков, которые являются ферментами реакций конъюгации ауксина.

Метаболизм ауксина распределен по многим компартментам клетки (рис. 1). Это позволяет предположить, что молекулярно-генетическая система гомеостаза ауксина в клетке растения сформировалась до образования некоторых органелл клетки. В результате эволюционных процессов происходило усложнение и компартментное распределение метаболических реакций. Данная гипотеза частично подтверждается экспериментальными наблюдениями (Cooke *et al.*, 2002).

Математическая модель регуляции внутриклеточного метаболизма ауксина *Arabidopsis thaliana*, автоматически реконструированная на основе структурной модели генной сети (рис. 1) с использованием технологии, представленной в разделе «Материалы и методы»,

описывает внутриклеточный уровень реализации морфогенетических механизмов регуляции развития АМП (апикальная меристема побега). Реконструированная математическая модель содержит порядка двухсот параметров. Значения большинства параметров модели взяты из литературных источников для *A. thaliana*, кукурузы и риса. Оставшаяся часть оптимальных значений параметров была подобрана численно. В результате было достигнуто соответствие модели экспериментальным данным относительно содержания различных форм ауксина в клетке (рис. 2). В экспериментах *in silico* так же, как и в экспериментах *in vivo* в клетках побега арабидопсиса, свободная форма ауксина и его эстерифицированная форма составляют около 1 % и меньше 4 % от общего пула ауксина соответственно. Оставшийся пул ауксина (95 %) составляют его амидные формы (Park *et al.*, 2001). Одним из свойств рассматриваемой молекулярно-генетической системы (МГС) является ее способность к быстрому увеличению концентрации ауксина в клетке растения при внешних стрессовых условиях. Вероятно, за эту способность как раз и отвечает пул амидных



**Рис. 2** Результаты моделирования процентного содержания различных форм ауксина в клетке меристемы побега.

По оси у – проценты, по оси х – форма ИУК (индол-3-уксусная кислота, или ауксин); exp – процентное содержание формы ауксина из экспериментальных данных.

форм ауксина, из которого происходит быстрое высвобождение ауксина в результате реакций деконъюгации. С другой стороны, низкий процент (всего 1 %) внутриклеточного содержания свободной формы ауксина в нормальных условиях предполагает ключевую роль сигнальных путей и транспорта данного фитогормона в формировании наблюдаемых паттернов роста и развития всего растения.

**Теоретический анализ молекулярно-генетических механизмов гомеостаза ауксина в клетке.** В данной молекулярно-генетической системе особую роль в поддержании гомеостаза внутриклеточного содержания ауксина занимают механизмы регуляции реакций конъюгации. Как уже говорилось выше, именно пул конъюгированных форм ауксина определяет изменения концентрации ауксина в клетке при внешних воздействиях. Ферменты, которые осуществляют реакции конъюгации ИУК (индол-3-уксусной кислоты) с аминокислотами, кодируются белками семейства GH3, которые в свою очередь кодируются ауксин-индуцируемыми генами. В результате накапливание GH3 транскриптов индуцируется ауксином (Hagen *et al.*, 1984). Помимо этого, существует огромное число видов растений, которые имеют GH3 гены, реагирующие на присутствие ауксина. По крайней мере, некоторые ИУК-индуцируемые гены GH3 кодируют ферменты, осуществляющие реакции конъюгации ИУК в ИУК-аминокислоту (Staswick *et al.*, 2005). Таким образом, индукция ауксином GH3 генов, вероятно, обеспечивает ослабление сигнала ауксина инактивацией ИУК через конъюгацию.

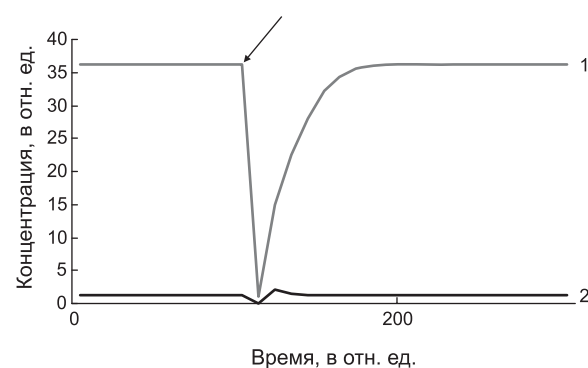
Эксперименты *in silico* по индукции ауксином GH3 генов проводили с помощью следующей процедуры: в системе, находящейся в стационарном состоянии, изменяли значения концентрации ИУК и GH3 белка и рассчитывали значения этих концентраций вновь до стационарной фазы. На рис. 3 представлен один из экспериментов *in silico*. Как видно из рис. 3, происходит качественное повышение концентрации GH3 белка в клетке, который в свою очередь опосредует уменьшение концентрации ауксина. Аналогичные графики распределения получены при различных начальных значениях.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что независимо от начальных значений

концентраций ауксина и продукта GH3 транскриптов в заданном диапазоне относительных единиц концентрации происходит активация ауксином наработки продукта GH3 транскриптов, который ослабляет сигнал ауксина инактивацией ИУК через конъюгацию.

Несомненно, что на поддержание гомеостаза внутриклеточного содержания ауксина влияют механизмы, регулирующие ферментативные реакции метаболического пути биосинтеза ИУК. Мутанты арабидопсиса *trp3-1* и *trp2-1* имеют нарушения в триптофансинтазах  $\alpha$  и  $\beta$  соответственно (Last *et al.*, 1991; Radwanski *et al.*, 1996), которые в свою очередь осуществляют реакции превращения триптофана и его предшественников в индол. Мутанты данных типов накапливают амидные формы ауксина (Normanly *et al.*, 1993; Ouyang *et al.*, 2000), несмотря на низкий уровень триптофана (Muller, Weiler, 2000; Ouyang *et al.*, 2000). Однако триптофансинтаза  $\alpha$  способна производить индол без участия  $\beta$ -субъединицы. Индол в свою очередь в последующем преобразуется в определенные «защитные» вещества (Frey *et al.*, 1997, 2000; Melanson *et al.*, 1997) или в ауксин.

Мутантные фенотипы *trp3-1* и *trp2-1* так же, как и фенотип двойного мутанта *trp3-1 trp2-1*, были имитированы в экспериментах *in silico* путем уменьшения значений констант скорости синтеза мРНК и их продуктов триптофансинтаз  $\alpha$  и  $\beta$  в 100 000 раз по сравнению с исходными. В табл. 2 суммированы результаты расчета рав-



**Рис. 3.** Результаты моделирования динамики изменения концентрации ИУК и GH3 белка в норме.

По оси Y — концентрация в отн. ед., по оси X — время расчета в отн. ед. Стрелкой указан момент перевода системы из стационарного состояния в состояние с измененными концентрациями GH3 белка и ИУК (1 и 0,01 соответственно); 1 — динамика изменения концентрации GH3 белка, 2 — динамика изменения концентрации ИУК.

Таблица 2

Концентрации ИУК-аланина (ИУК\_Ала) в норме и при мутациях (*trp2-1*, *trp3-1*)

| Фенотип   | <i>trp2-1</i> | <i>trp2-1 trp3-1</i> |
|---|---------------|----------------------|
| Концентрация ИУК_Ала (в процентном содержании от нормы) | 102,45        | 103,67               |

новесных концентраций ИУК-аланина (ИУК\_Ала) в норме и при мутациях (*trp2-1*, *trp3-1*).

Из представленных в табл. 2 результатов можно сделать вывод, что несмотря на резкое уменьшение скорости наработки ферментов, осуществляющих реакции превращения промежуточных веществ в ИУК, в одиночном и двойном мутантах наблюдается заметное увеличение стационарной концентрации конъюгатной формы ауксина, что качественно соответствует экспериментальным данным. Эксперименты *in silico* подтверждают, что незначительное изменение стационарной концентрации ИУК\_Ала в мутантах по сравнению с нормой принципиально связано со стратегией хранения различных форм ауксина, компенсирующих нарушения основного пути биосинтеза ИУК у высших растений (Sztein *et al.*, 2000). В экспериментах *in silico* также выявляется более значимый вклад в изменение содержания амидной формы ауксина, вносимый нарушением *trp3-1* в суммарный вклад двойного мутанта *trp3-1 trp2-1*, что соответствует экспериментальным представлениям о важности триптофансинтазы  $\alpha$ , которая может функционировать в данной МГС без  $\beta$ -субъединицы (Park *et al.*, 2001).

Математическая модель регуляции внутриклеточного метаболизма ауксина *A. thaliana*, реконструированная на основе структурной модели соответствующей геномной сети, отражает внутриклеточный иерархический уровень морфогенетических механизмов регуляции развития АМП. Полученные результаты подтверждают адекватность разработанной математической модели МГС регуляции гомеостаза ауксина внутри клетки. Проведённые эксперименты *in silico* свидетельствуют о качественно быстрых процессах молекулярно-генетической регуляции поддержания гомеостаза исследуемой системы в ответ на изменение концентрации ауксина в клетке.

Ранее нами была разработана математическая модель развития меристемы побега *A. thaliana* в терминах клеточного автомата, которая является пространственно-распределенной моделью (Akberdin *et al.*, 2007). Несмотря на «простоту» принципов (типы клеток, параметры клеток и т. д.), которые являются основой пространственно-распределенной модели, клеточный автомат позволяет описать ряд феноменологических экспериментальных наблюдений и предоставляет возможности изучения мутантных фенотипов *in silico*. С другой стороны, модель метаболизма ауксина в клетке меристемы побега растения описывает внутриклеточный иерархический уровень развития растения в целом и меристемы побега в частности. Следующим этапом в применении методов математического моделирования к исследованию законов роста и развития меристемы побега *A. thaliana* будет объединение пространственно-распределенной модели и модели внутриклеточного метаболизма ауксина. Результаты этого этапа позволят исследовать причинно-следственные связи между молекулярно-генетическими событиями в клетках растения и природой морфологических изменений в структуре и функционировании отдельных органов и всего растения.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность К.Д. Безматерных, В.В. Мироновой, И.А. Гайновой и С.И. Фадееву за обсуждение и консультации в ходе данной работы. Работа поддержана грантом НШ-2447.2008.4.

### Литература

- Akberdin I.R., Ozonov E.A., Mironova V.V. *et al.* A cellular automaton to model the development of primary shoot meristems of *Arabidopsis thaliana* // J. of Bioinformatics and Computational Biol. 2007. V. 5. 02B. P. 641–650.
- Ananko E.A., Podkolodny N.L., Stepanenko I.L. *et al.* GeneNet in 2005 // Nucl. Acids Res. 2005. V. 1. № 33. Database Issue: P. 425–427.
- Cooke T.J., Poli D., Sztein A.E., Cohen J. Evolutionary patterns in auxin action // Plant Mol. Biol. 2002. V. 49. P. 319–338.
- Frey M., Chomet P., Glawischnig E. *et al.* Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses // Science. 1997. V. 277. P. 696–699.

- Frey M., Stettner C., Parer P.W. *et al.* An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 14801–14806.
- Hagen G., Kleinschmidt A., Guilfoyle T. Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections // Planta. 1984. V. 162. P. 147–153.
- Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Bezmaternykh K.D., Likhoshvai V.A. MGSgenerator – the tool for automatic generation of molecular genetic system mathematical models on basis of gene networks structure // Abstr. of the Sixth Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2008), Novosibirsk, Russia, June 22–28, 2008a. P. 114.
- Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Bezmaternykh K.D. *et al.* A computer system for reconstruction, calculation and analysis of mathematical models of molecular genetic system // Abstr. of the Sixth Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2008). Novosibirsk, Russia, June 22–28, 2008b. P. 113.
- Last R.L., Bissinger P.H., Mahoney D.J. *et al.* Tryptophan mutants in Arabidopsis: The consequences of duplicated tryptophan synthase b genes // The Plant Cell. 1991. 3. P. 345–358.
- Melanson D., Chilton M.-D., Masters-Moore D., Chilton W.S. A deletion in an indole synthase gene is responsible for the DIMBO Adeficient phenotype of bxbx maize // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 13345–13350.
- Muller A., Weiler E.W. Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana* // Planta. 2000a. 211. P. 855–863.
- Normanly J., Cohen J.D., Fink G.R. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 10355–10359.
- Ouyang J., Shao X., Li J. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 2000. V. 24. P. 327–333.
- Park S., Walz A., Momonoki Y.S., Slovin J.P. *et al.* Partial characterization of major amide-linked conjugates of IAA in Arabidopsis seed (Abstr. #321) // Final Program July 2001, Amer. Soc. of Plant Biologists, Canad. Soc. of Plant Physiol. meeting, Providence, Rhode Island, 2001. P. 81–82.
- Radwanski E.R., Barczak A.J., Last R.L. Characterization of tryptophan synthase alpha subunit mutants of *Arabidopsis thaliana* // Mol. General Genet. 1996. V. 253. P. 353–361.
- Staswick P.E., Serban B., Rowe M. *et al.* Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid // The Plant Cell. 2005. V. 17. P. 616–627.
- Sztein A.E., Cohen J.D., Cooke T.J. Evolutionary patterns in the auxin metabolism of green plants // Int. J. Plant Sci. 2000. V. 161(6). P. 849–859.

## MATHEMATICAL MODEL OF AUXIN METABOLISM IN MERISTEM CELLS OF PLANT SHOOTS

I.R. Akberdin<sup>1</sup>, F.V. Kazantsev<sup>1</sup>, N.A. Omelyanchuk<sup>1</sup>, V.A. Likhoshvai<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: akberdin@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

### Summary

Indole-3-acetic acid (IAA) is physiologically active in the form of the free acid, but can also be found in conjugated forms in plant tissues. IAA can be degraded and redundant pathways lead to its synthesis. Auxin participates in regulation of cell differentiation in development of embryo, leaves, vascular tissue, fruit, primary and lateral root and in controlling apical dominance and tropisms. The regulation of the IAA metabolism (synthesis, conjugation and degradations) is an enough complex process and may explain in some aspects how this simple substance is able to influence such diverse processes. Mathematical modeling of IAA metabolic gene network can help reveal the main factors governing this complex process. To reach this aim, we first reconstructed a gene network of auxin biosynthesis, conjugation degradation by annotating experimental data from 107 published papers into GeneNet computer system. This gene network after reduction was input into converter to generate the mathematical model of auxin metabolism. We have reconstructed the gene network and develop the mathematical model of auxin metabolism in Arabidopsis shoots. The model allows to reproduce some phenomenological and molecular-genetic aspects of the auxin role in the plant development.