

**Слайд 1.**

Название лекции: «Компьютерный дизайн гипотетических генных сетей»

**Слайд 2.**

Определение генной сети: Генная сеть это - группа координировано функционирующих генов, контролирующая выполнение определенной молекулярной, биохимической, физиологической и т.д. функции организма.

**Слайд 3.**

Генная сеть онтогенеза бактериофага  $\lambda$  – умеренного фага *E. Coli* – кишечной палочки. Фаг  $\lambda$ , в зависимости от энергетического состояния клетки выбирает литический (активное размножение и уничтожение – лизис – зараженной клетки) либо лизогенный (встраивание ДНК фага в хромосому *E. Coli* до лучших времен) путь развития.

**Слайд 4.**

Для конструирования и визуализации генных сетей в системе GeneNet разработаны специальные обозначения ключевых элементарных структур и событий, значимых для функционирования генных сетей

**Слайд 5.**

База данных GENENET: фрагмент генной сети, контролирующей процесс клеточной смерти - апоптоза

**Слайд 6.**

База данных GENENET: центральный фрагмент генной сети биосинтеза холестерина в клетке (регуляция по механизму отрицательной обратной связи). Следствием наличия отрицательной обратной связи является стабилизация значения параметра, в данной сети – концентрации холестерина в крови.

**Слайд 7.**

База данных GENENET: генная сеть регуляции дифференциации эритроидной клетки при активации эритропоэтином.

**Слайд 8.**

База данных GENENET: генная сеть ответа на тепловой шок

**Слайд 9.**

База данных GENENET: генная сеть регуляции клеточного цикла. MAP-киназа трансформирует сигнал.

**Слайд 10.**

Примеры анализа генных сетей с использованием методов теории графов: сильносвязные вершины соответствуют транскрипционным факторам - центральным регуляторам генных сетей. На слайде представлены репрессия и активация генов генной сети регуляции клеточного цикла факторами

E2F1/DP1/pRB и И E2F1/DP1, а также регуляция HSF1-фактором сети температурного шока и фактором GATA1 регуляции генной сети дифференциации эритроцитов.

**Слайд 11.**

Пример взаимодействия генных сетей. Генная сеть регуляции уровня свободных радикалов и кассетная активация взаимодействующих с ней генных сетей

**Слайд 12.**

Пример графического изображения взаимодействия локальных генных сетей и прохождения волны активации через глобальную генную сеть

**Слайд 13-14.**

Обобщенный химико-кинетический метод моделирования (ОХКММ) ориентирован на формализованное, в первую очередь портретное, описание функционирования произвольных биосистем. Формализация осуществляется на основе блочного принципа, согласно которому моделируемая система расчленяется на элементарные подсистемы, каждая из которых описывается изолированно от других. Описание элементарных подсистем проводится в терминах элементарных процессов. Элементарные процессы описываются на основе формальных блоков. Формальные блоки однозначно характеризуются упорядоченным списком формальных динамических переменных  $\bar{X}$ , упорядоченным списком формальных параметров  $\bar{P}$  и законом преобразования информации  $\bar{F}$ . На слайдах приведено несколько формальных блоков. Третий блок описывает формальную бимолекулярную реакцию. Список  $\bar{X}$  данного блока состоит из трех формальных переменных  $x_1$ ,  $x_2$  и  $x_3$ , имеющих смысл концентраций продуктов реакции. Список  $\bar{P}$  включает два формальных параметра  $k_1$  и  $k_2$ , имеющих смысл констант скоростей прямой и обратной реакции, соответственно. Закон переработки информации  $\bar{F}$  в данном блоке задается системой обыкновенных автономных дифференциальных уравнений, которые определяют мгновенные скорости изменения значений концентраций  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ . В остальных блоках законы переработки информации также задаются системами дифференциальных уравнений, которые получены из химико-кинетических соображений в условиях идеального перемешивания.

**Слайд 15.**

Пример - фрагмент генной сети метаболизма *E. Coli* – кишечной палочки.

**Слайд 16.**

Представление моделей генных сетей в виде двудольных ориентированных графов. Красные кружочки – биологические объекты, синие квадратики – промежуточные стадии (процессы). Двудольный ориентированный граф: вершины двух разных типов, ребра – направленные стрелки.

**Слайд 17.**

Двудольный граф компьютерной модели цикла трикарбоновых кислот Escherichia Coli k-12: Метаболическая компонента без регуляторных процессов.

**Слайд 18.**

Двудольный граф компьютерной модели цикла трикарбоновых кислот Escherichia Coli k-12: Регуляторная компонента без метаболических процессов.

**Слайд 19.**

Двудольный граф компьютерной модели Escherichia Coli k-12: Метаболическая компонента без регуляторных процессов.

**Слайд 20.**

Оценки сложности моделей «электронной клетки» Escherichia Coli различной степени подробности.

**Слайд 21.**

Гипотетические генные сети (ГГС) есть теоретические конструкции (модели) построенные из «генетических элементов» (ГЭ) - элементарных структурных единиц ГГС, с помощью «регуляторных связей».

**Слайд 22.**

ГГС – молекулярный триггер с обратной связью через белок.

**Слайд 23.**

ГГС – молекулярный осциллятор.

**Слайд 24.**

Примеры более сложно устроенных ГГС.

**Слайд 25.**

Четыре типа регулирования эффективности экспрессии генетических элементов.

К **первому типу** отнесем регуляторные механизмы, которые удовлетворяют следующим специальным условиям: (i) регуляторами являются *гомомультимеры* продуктов, (ii) ингибирование является конкурентным. ГГС, в которых каждый продукт кодируется единственным ГЭ, а все регуляторные механизмы относятся к первому типу, составляют **первый класс**.

Ко **второму типу** отнесем механизмы, удовлетворяющие следующим дополнительным условиям: (i) регуляторы являются *гомомультимерами* продуктов, (ii) ингибирование не является конкурентным. Ко **второму классу** будем относить только такие ГГС, в которых каждый продукт кодируется единственным ГЭ, а механизмы относятся ко второму типу регулирования.

К **третьему типу** отнесем механизмы, удовлетворяющие следующим дополнительным условиям: (i) регуляторами являются *гетеромультимеры* продуктов, (ii) для каждого ГЭ имеется не больше одного регулятора его активности. По-прежнему, будем считать, что в ГГС **класса 3** каждый продукт синтезируется единственным ГЭ, а механизмы относятся к третьему типу регулирования.

К **классу 4** отнесем ГГС, в которых регуляторные механизмы относятся к **четвертому типу** действия, т.е. (i) регуляторами являются *гомомультимеры* белков, (ii) для каждого ГЭ имеется не больше одного регулятора его активности. При конструировании ГГС **класса 4** допускается, что продукт может синтезироваться более чем одним ГЭ.

Введенные типы являются составными элементами реально существующих в природе регуляторных механизмов. Например, типичным механизмом репрессии транскрипции в прокариотах является взаимодействие репрессора(ов) с определенным(и) сайтом(ами), что приводит к маскировке на ДНК соответствующего сайта посадки РНК-полимеразы. При этом могут встречаться одиночные и множественные сайты связывания репрессоров, сайты могут стерически взаимопересекаться или не иметь пересечений, репрессоры могут быть гомо-мультимерами или гетеро-мультимерами, могут существовать множественные сайты инициации транскрипции. Многочисленные конкретные примеры можно найти, например, в базе EcoCyc (<http://biocyc.org>)

#### **Слайды 26-27.**

Математические модели из обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающие ГГС всех четырех вышеуказанных классов.

#### **Слайд 28.**

Если приравнять друг другу указанные на слайде константы, т.е. сделать системы уравнений симметричными, то полученные системы будем называть каноническими ГГС классов 1-4 без авторегуляций.

#### **Слайд 29.**

Все возможные гипотетические генные сети, состоящие из двух генетических элементов. Их структурные графы, соответствующие системы диф. уравнений и стационарные состояния.

#### **Слайд 30.**

Гипотетическая генная сеть, состоящая из трех генетических элементов с полным структурным графом и ее математическая модель.

#### **Слайд 31.**

Простейшая гипотетическая генная сеть, имеющая область значений параметров с незатухающими колебаниями (осциллятор). Имеет стабильный предельный цикл. Показаны графики траекторий как функций от времени и фазовый портрет.

#### **Слайд 32.**

Структурные графы 8 ГГС, состоящих из 4 ГЭ. В зависимости от регуляторных связей, ГГС может иметь: 2 устойчивые точки покоя (2P), 1 устойчивую точку покоя (1P) или 1 устойчивый предельный цикл (1C).

#### **Слайд 33.**

Гипотетическая генная сеть, состоящая из четырех генетических элементов, которая имеет область, в которой существует два качественно различных режима

поведения. В зависимости от начальных данных траектории могут попадать в устойчивую точку покоя (выходить на плато) или в режим осцилляции (устойчивый предельный цикл).

#### **Слайд 34.**

Пример гипотетической генной сети, содержащей 6 генетических элементов, которая имеет 2 различных стабильных предельных цикла. Голубой цвет – одна и та же траектория в различных предельных циклах.

#### **Слайд 35.**

Пример ГГС из 7 ГЭ (2 тройки ГЭ, «сильно связанные» через седьмой ГЭ), которая имеет в своем фазовом портрете 1 устойчивую точку покоя, 3 устойчивых предельных цикла, 5 неустойчивых предельных циклов.

#### **Слайд 36.**

Пример ГГС из 9 ГЭ (тройка ГЭ и пятерка ГЭ, «сильно связанные» через девятый ГЭ), которая имеет квазипериодический режим функционирования.

#### **Слайд 37.**

Элемент гипотетической генной сети, предназначенный для суммирования в двоичном числе двух битов младшего разряда. Элемент состоит из 4 молекулярных триггеров, каждое из 2-х возможных состояний которых интерпретируется как бинарные 0 или 1. Используя соответствующие регуляторные связи, можно использовать эти молекулярные триггеры как элементарные ячейки памяти.

#### **Слайд 38.**

Элемент гипотетической генной сети, предназначенный для суммирования в двоичном числе двух битов старших разрядов. Обозначения аналогичны слайду 37.

#### **Слайд 39.**

Гипотетическая генная сеть, которая суммирует четырех- разрядные двоичные числа.

#### **Слайд 40.**

ЭКСПЕРИМЕНТ

#### **Слайд 41.**

В экспериментальной работе по синтезу молекулярного триггера и молекулярного осциллятора были использованы гены и их промоторы:

• Ген *LacI E.coli*

• LacI-репрессор контролирует экспрессию лактозного оперона

• Ген *TetR* из тетрациклиноустойчивого транспозона *Tn10*

• TetR-репрессор контролирует экспрессию генов, обеспечивающих устойчивость грамотрицательных бактерий к тетрациклину

• Ген *CI фага λ*

• CI-репрессор промоторов литического пути фага. Обеспечивает лизогенное состояние

• Ген GFP (green fluorescent protein) из медузы *Aequorea Victoria*.

Зеленый флуоресцентный белок. Длина волны возбуждения 475 нм, испускания – 510 нм.

**Слайд 42.**

Гипотетическая генная сеть (ГГС), состоящая из двух генетических элементов и двух регуляторных связей – молекулярный триггер. Принципиальная схема и структурный граф.

**Слайд 43.**

Регуляторными элементами триггера являются два репрессора и два конститутивных промотора. Транскрипция с каждого из промоторов блокируется белком-репрессором, РНК которого считывается с противоположного промотора, что обеспечивает бистабильность системы. Теоретически, бистабильность возможна и в конструкции с только одним автокаталитическим промотором, но равновесие в такой системе будет менее строгим и его сложнее проверить экспериментально. В отсутствие индуктора возможны два стабильных состояния:

- 1) с промотора P1 транскрибируется репрессор R2;
- 2) с промотора P2 транскрибируется репрессор R1.

Переключение происходит при добавлении индуктора, который связывается с действующим репрессором, лишая его возможности взаимодействовать с соответствующим промотором. Так, индуктор обеспечивает транскрипцию другого репрессора, пока он полностью не зарепрессирует изначально активный промотор. В дальнейшем это состояние сохраняется в отсутствие индуктора.

Несмотря на то, что вся сеть находится в одной плазмиде, ее части могут быть разнесены в две разные плазмиды, и это не изменит функционирования триггера.

**Слайд 44 и 45.**

*Результаты функционирования синтезированного молекулярного триггера.*

Все триггеры выполнены на плаزمиде *E.coli*. За изменением состояния триггеров следили по изменению уровня экспрессии GFP- белка, находящегося под контролем P<sub>trc-2</sub> промотора. Для наблюдения за изменением уровня флуоресценции был использован флуориметр.

Были созданы два класса триггерных плазмид pIKE и pTAK. Оба класса имеют ген lacI. Репрессор Lac (R2) связывается с промотором P<sub>trc-2</sub> (P2) и образует первую пару промотор-репрессор. В качестве второй пары (P1, R1) в плаزمиде pTAK используется промотор P<sub>Ls1con</sub> и термочувствительный репрессор cIts фага λ, а в плазмиде pIKE - ген tetR, кодирующий белок-репрессор TetR, связывающийся с промотором P<sub>LtetO-1</sub>. Переключение в плазмиде pTAK происходит при добавлении в среду ИПТГ, который взаимодействует с репрессором LacI или при увеличении температуры. Плазмиды pIKE переключаются при добавлении в среду ИПТГ или тетрациклина.

Во всех плазмиде триггера ген GFP расположен как второй цистрон под промотором P<sub>trc-2</sub> и, следовательно, репрессия P1 сопровождается экспрессией GFPmut3. Второе возможное состояние наблюдается, когда с P<sub>Ls1con</sub> идет транскрипция, а P<sub>trc-2</sub> репрессирован.

Для демонстрации бистабильности клетки выращивали в течение нескольких часов в присутствии ИПТГ, затем переносили в свежую среду без индуктора и выращивали  $n$  часов, при этом состояние, когда происходит экспрессия GFP, сохранялось даже в отсутствие индуктора. Затем клетки выращивали при температуре 42°C (pTAK плазмиды) или переносили в среду, содержащую тетрациклин Tc (pICE плазмиды). В таких условиях происходило переключение триггеров в функциональное состояние, при котором отсутствует экспрессия GFP. Клетки отмывали от тетрациклина Tc или выращивали при стандартной температуре, при этом экспрессия репортерного белка отсутствовала. Это состояние стабильно наследовалось последующими поколениями клеток. На слайдах в качестве примера приведены зависимость уровня экспрессии GFP от времени и от наличия/отсутствия индукторов.

#### **Слайд 46.**

ГГС, состоящая из трех генетических элементов и трех регуляторных связей – молекулярный осциллятор (репрессилатора). Принципиальная схема и структурный граф.

#### **Слайд 47.**

Более сложная система из трех репрессоров была сконструирована для создания осциллятора. Эта цепь периодически индуцирует синтез репортерного белка (GFP). Получаемая осцилляция имеет определенный период, который больше, чем время клеточного цикла, так что состояние осциллятора передается из поколения в поколение. Элементы те же, что и в случае триггеров.

В этой сети: первый репрессор LacI ингибирует транскрипцию второго репрессорного гена TetR, белковый продукт которого, в свою очередь, ингибирует экспрессию третьего гена, cI, белок cI ингибирует экспрессию гена lacI. Такая петля негативной регуляции приводит ко временным колебаниям концентраций компонентов генной сети. В зависимости от концентрации регуляторных белков, возможны два состояния системы - стабильное состояние равновесия или нестабильное состояние, ведущее к осцилляции. Осцилляция обусловлена сочетанием сильных промоторов с эффективными сайтами связывания рибосом, жесткой репрессией транскрипции, положительной кооперативностью репрессоров и сравнимыми скоростями деградации мРНК и белка.

#### **Слайд 48.**

Сеть состоит из двух плазмид: низкокопийного репрессилатора и высококопийного репортера. В репортерной плазмиде расположен ген GFP под тем же промотором, что и cI. Таким образом, репрессилатор периодически индуцирует синтез GFP одновременно с синтезом  $\lambda$  cI.

#### **Слайд 49.**

Клетки, содержащие репрессилатор, выращивали в соответствующей среде, затем помещали на предметное стекло и изменение уровня флуоресценции GFP регистрировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Приведена типичная зависимость относительной флуоресценции GFP в клетке, содержащей репрессилатор.

Временная осцилляция в данном случае сопровождается общим увеличением уровня флуоресценции. Период осцилляции составляет примерно 150 мин. Это примерно в 3 раза больше, чем время типичного клеточного цикла. То есть состояние сети передается из поколения в поколение. Замечено, что после деления уровень GFP в двух дочерних клетках часто коррелирует на протяжении длительного периода времени.

Следует отметить, что амплитуда и период осцилляции может варьировать от клетки к клетке.

**Слайд 50.**

Принципиальная схема авторепрессирующегося оперона с достаточно большим запаздыванием.

**Слайд 51.**

Принципиальная схема функционирования дважды авторепрессирующегося оперона с двумя запаздываниями. Эта система имеет хаотический режим функционирования.

**Слайд 52.**

Дифференциальное уравнение, описывающее дважды авторепрессирующийся оперон с двумя запаздываниями. График решения.

**Слайд 53.**

Принципиальная схема синхронизации клеточной культуры с помощью ГГС релаксационного генератора (релаксатора).