

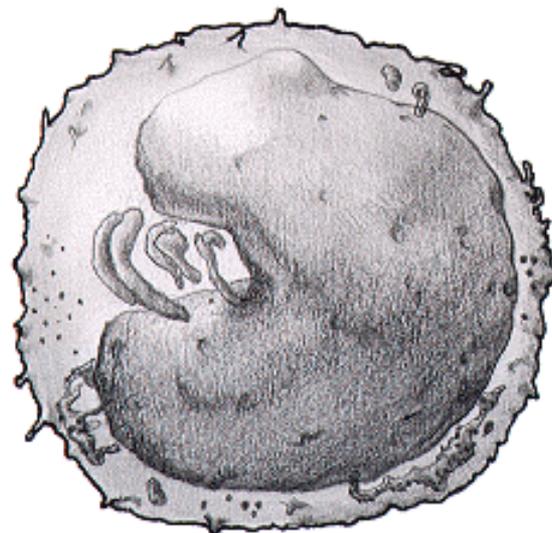
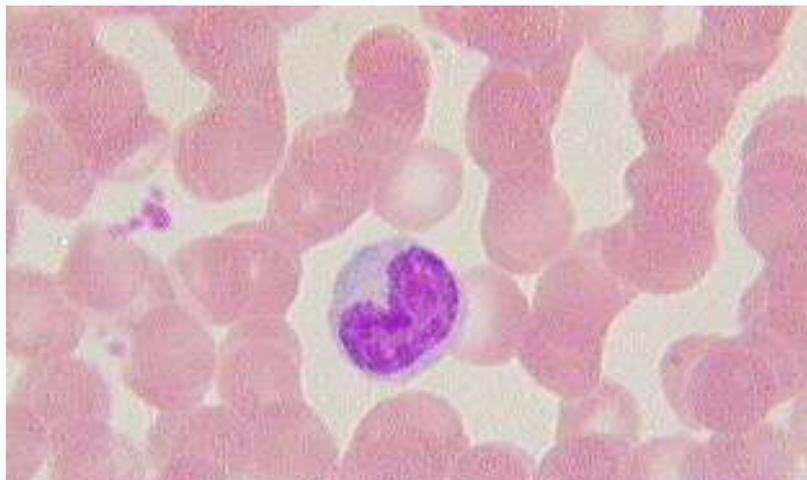
# Оптимизация математической модели генной сети активации макрофага

Недосекина Евгения

Лихошвай Виталий Александрович

Ананько Елена Анатольевна

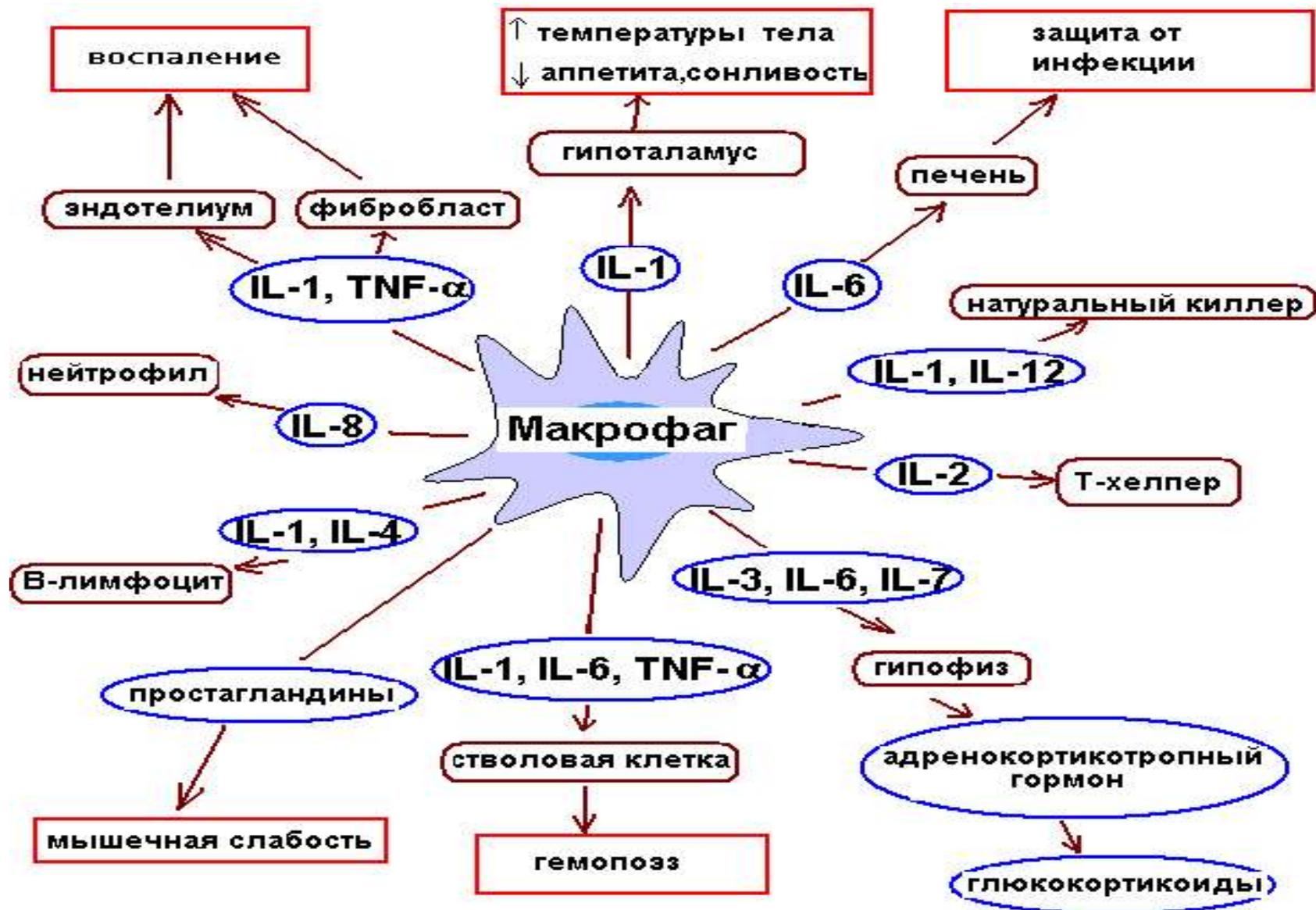
# Происхождение макрофагов



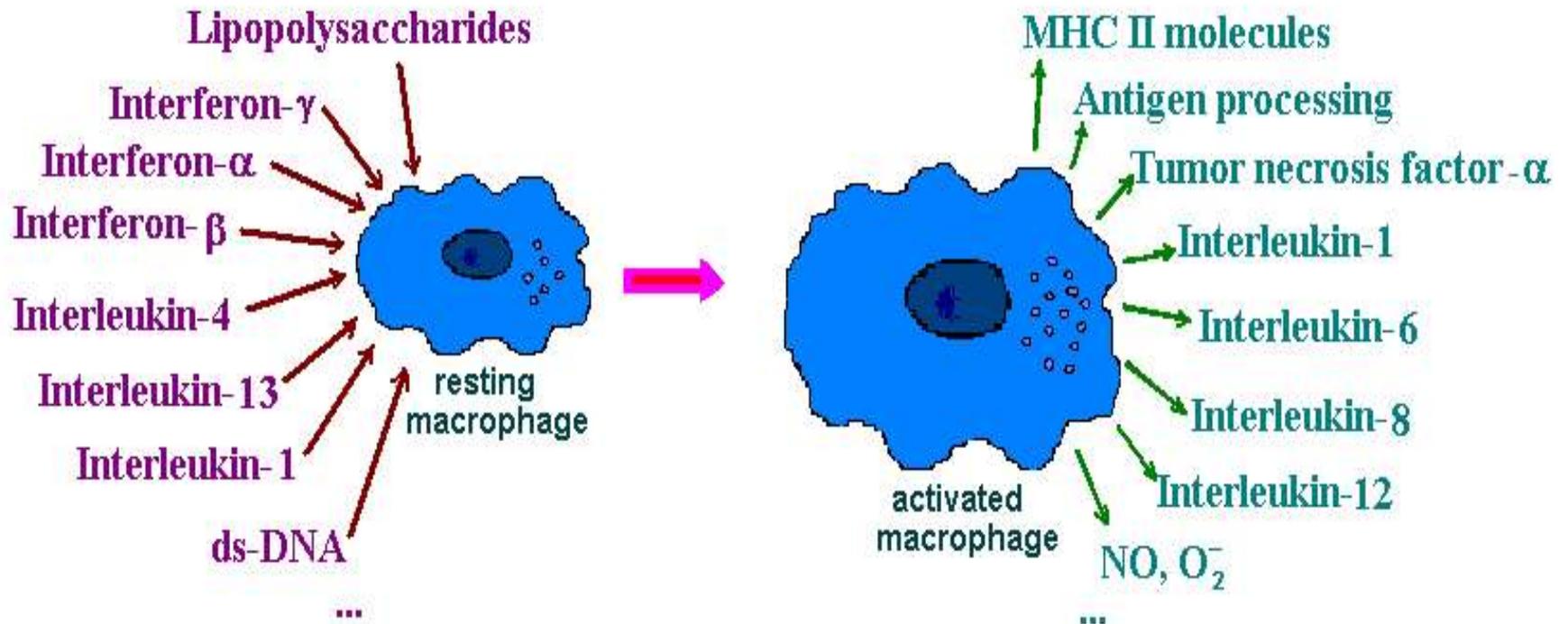
[Tagliasacchi D. and Carboni G. Blood Cells]

- **Моноциты** – это предшественники **макрофагов**. Это самые большие клетки крови. Из красного костного мозга они проникают в циркулирующую кровь, где находятся 24-36 часов. Затем моноциты мигрируют в ткани организма, где становятся макрофагами.

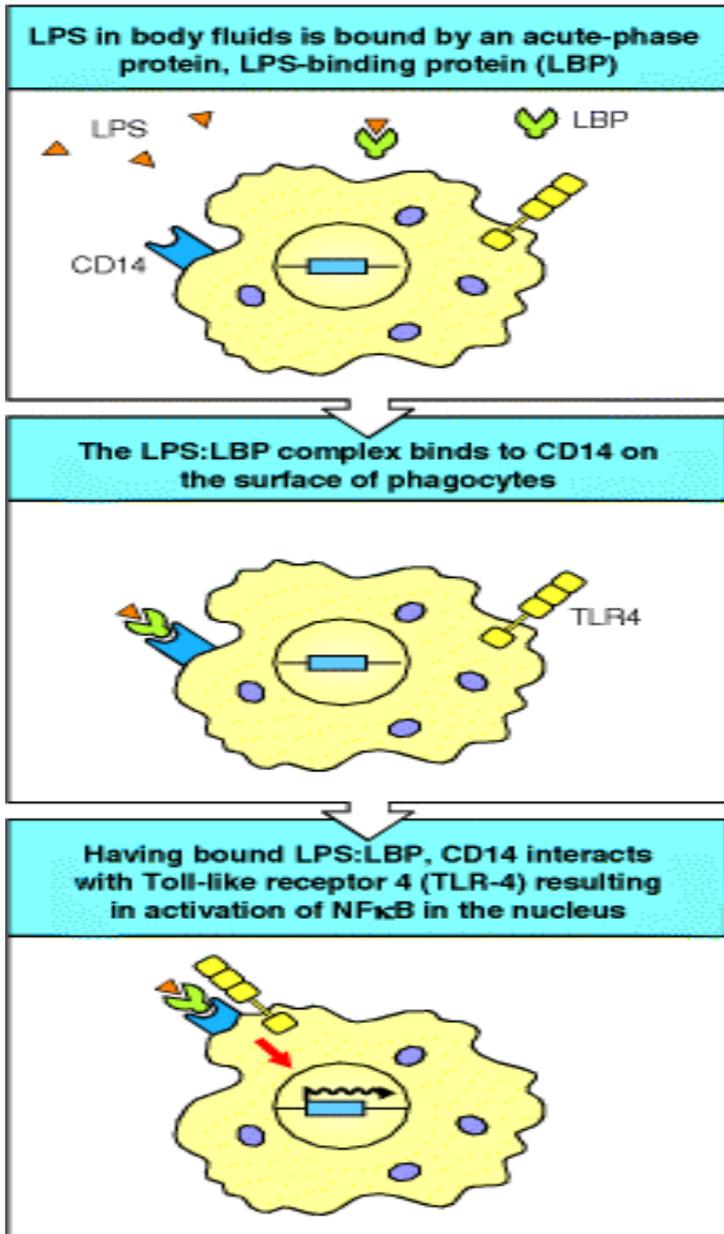
# Функции макрофагов



# Индукторы макрофагов и продукты активированных клеток



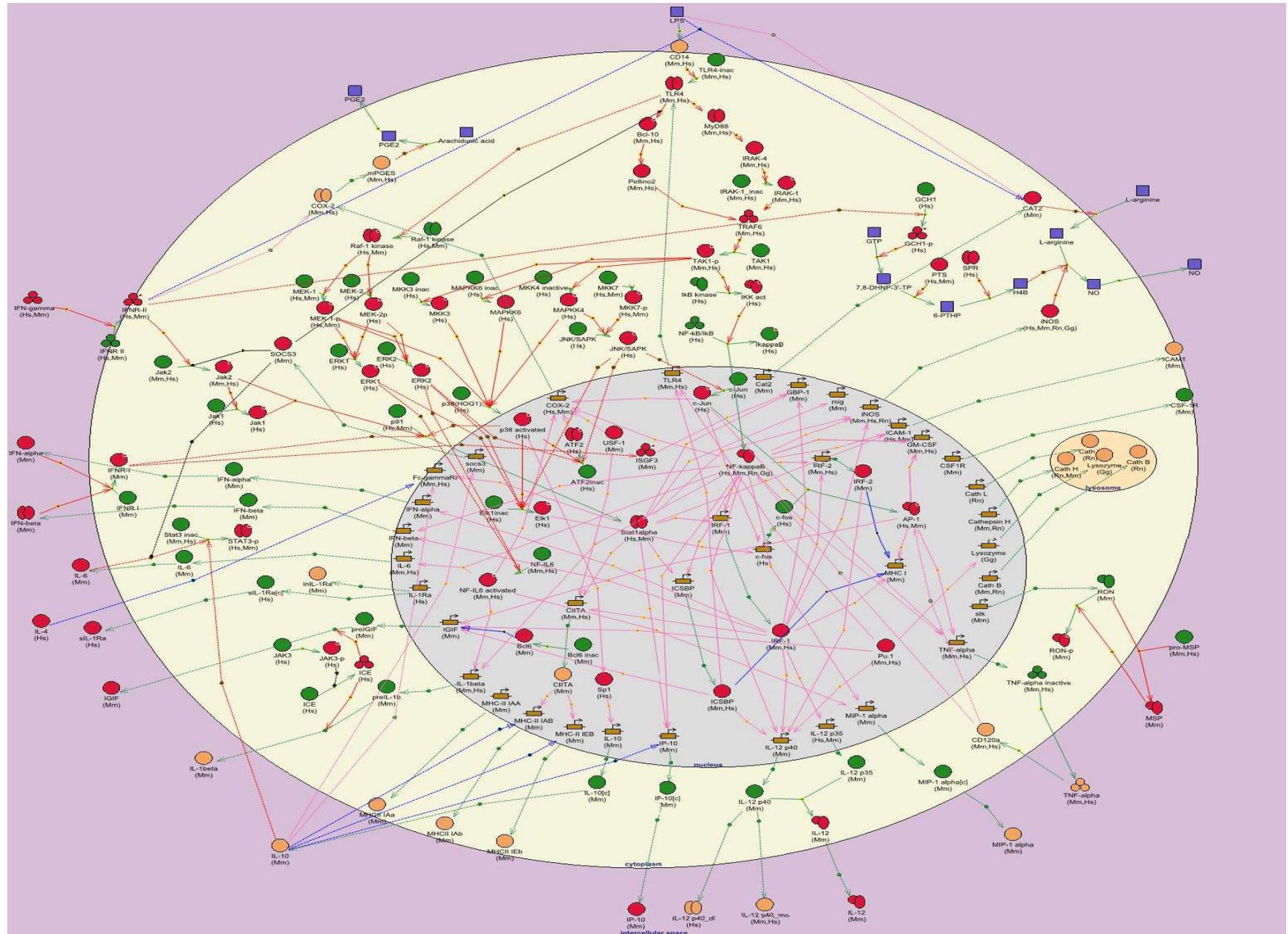
# Взаимодействие макрофага с бактериальным продуктом LPS



- **LPS** – липополисахарид
- **LBP** – LPS-связывающий белок
- **CD14** – рецептор LPS
- **TLR4** – toll-like рецептор, взаимодействует с CD14 после его связывания с LPS

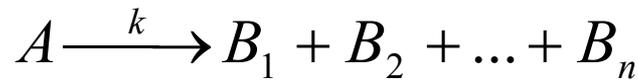
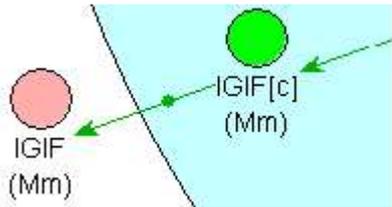
[C. Janeway. Immunobiology]

# Генная сеть активации макрофага



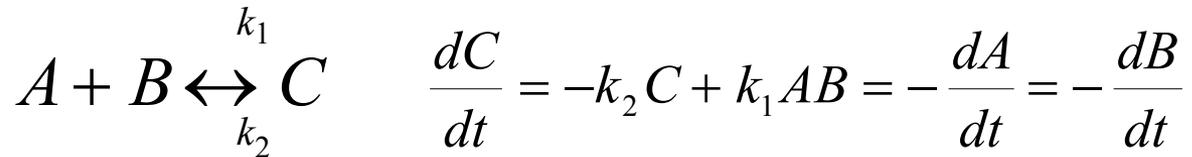
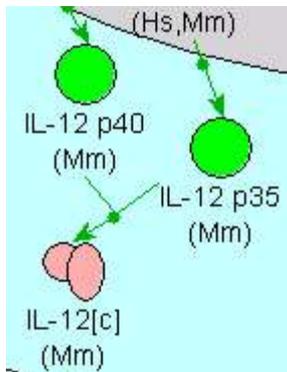
# Описание генной сети в рамках обобщенного химико-кинетического метода моделирования

Перенос белка из клетки (секреция) – необратимая мономолекулярная реакция

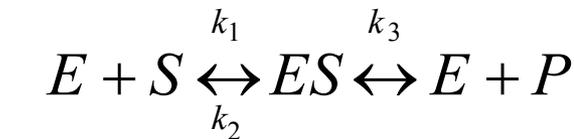
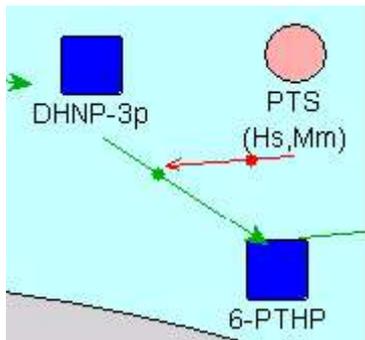


$$\frac{dA}{dt} = -\frac{dB_1}{dt} = -\frac{dB_2}{dt} = \dots = -\frac{dB_n}{dt} = -kA, n \geq 0.$$

Образование гетеродимера – обратимая бимолекулярная реакция



Ферментативная реакция



$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad V_{\max} = k_3 [E]_{total}, K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

## **Информационное содержание генной сети активации макрофага в базе данных GeneNet**

- **36 генов**
- **130 белков**
- **12 низкомолекулярных соединений**
- **306 реакций**

## **Содержание математической модели генной сети активации макрофага**

- **150 динамических переменных;**
- **450 констант реакций.**

# Источники информации количественных характеристик для моделирования

Базы данных, содержащие информацию о функционировании генных сетей и их отдельных компонентов

BRENDA: Entry of Nitric-oxide synthase(EC-Number 1.14.13.39) - Microsoft Internet Explorer

Address: http://brenda.bc.uni-koeln.de/php/result\_flat.php3?ecno=1.14.13.39

**BRENDA**  
The Comprehensive Enzyme Information System

Entry of Nitric-oxide synthase (EC-Number 1.14.13.39)

TURNOVER NUMBER	TURNOVER NUMBER MAXIMUM	SUBSTRATE	ORGANISM	COMMENTARY	LITERATURE	IMAGE
65	-	L-arginine	Rattus norvegicus	-	Z	2D-image
39	-	nitroblue tetrazolium	Rattus norvegicus	NADPH-diaphorase activity	Z	2D-image

SPECIFIC ACTIVITY	SPECIFIC ACTIVITY MAXIMUM	ORGANISM	COMMENTARY	LITERATURE
1.9	-	Rattus norvegicus	-	24
1.62	-	Mus musculus	-	17
1.06	-	Mus musculus	-	12
		Rattus		

Экспериментальные опубликованные работы: константы реакций, динамика концентраций компонентов генных сетей

Adobe Acrobat - [Hambleton-1996.pdf]

sonate protein lysates were precipitated with protein A-Sepharose (Pharmacia) and then incubated with anti-JNK antibody overnight at 4°C. The immunoprecipitates were washed twice with lysis buffer and once with kinase assay buffer (25 mM Hepes, pH 7.4/20 mM MgCl<sub>2</sub>/20 mM β-glycerophosphate/0.1 mM sodium orthovanadate/2 mM dithiothreitol). Immunocomplex kinase assays were performed as described (15) with the exception that reactions were performed at 30°C for 15 min using 15–25 μg of GST or GST-c-Jun substrate.

**In-Gel Kinase Assay.** The kinase activity of JNK was also assessed by an in-gel kinase assay, wherein GST-c-Jun, the JNK substrate, was copolymerized into the polyacrylamide gel as described (16).

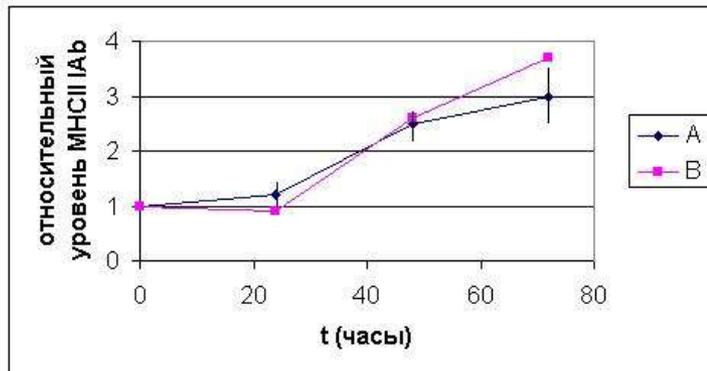
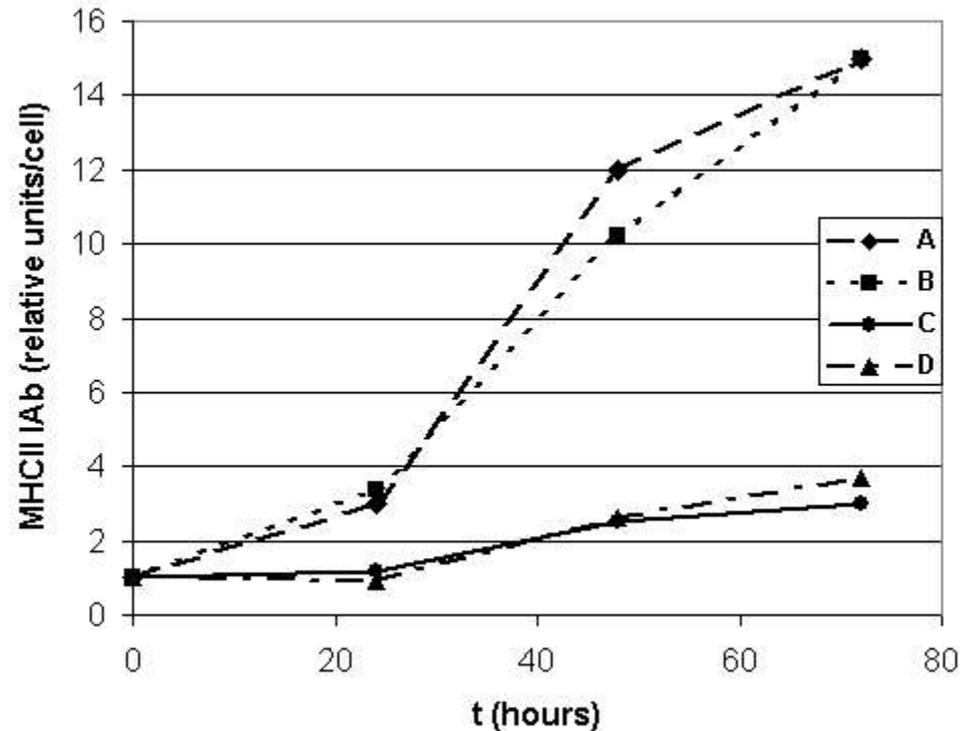
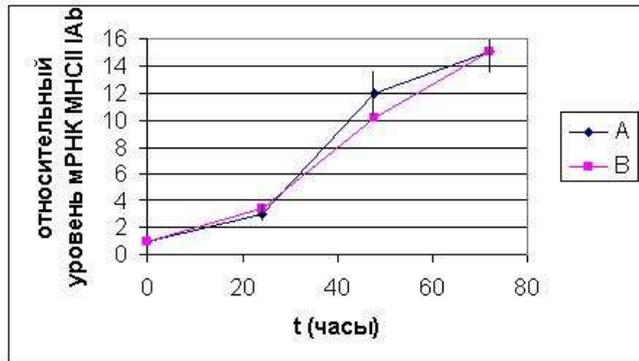
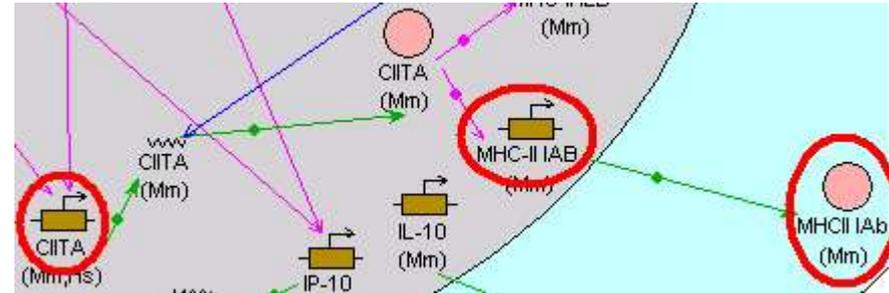
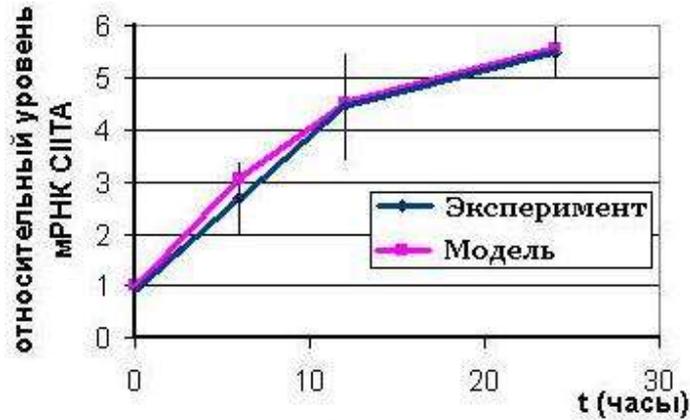
**Transient Transfection.** The AP-1 luciferase reporter plasmid, AP-1lux, was generously provided by G. Crabtree (Stanford University, Palo Alto, CA). This plasmid, derived from X<sub>3</sub>CAT, contains the luciferase gene under the transcriptional control of three synthetic AP-1 sites and the simian virus 40 early promoter (17). For transfection experiments, RAW 264.7 cells were dislodged from tissue culture dishes with a rubber policeman and transiently transfected in suspension using DEAE-dextran as described (18). Briefly, pools of 3 × 10<sup>7</sup> cells were each transfected with 22.5 μg of AP-1lux in DEAE-dextran (0.2 mg/ml). Following a 90-min incubation and 3-min 10% dimethyl sulfoxide shock, all of the cells were pooled and then split onto 10-cm tissue culture dishes (10<sup>7</sup> cells per dish). Approximately 40 hr posttransfection, the dishes were treated with LPS or PMA as indicated. At the completion of the stimulation, the cells were lysed and the luciferase activity in each lysate was measured with an Optocomp 1 luminometer (MGM Instruments, Hamden, CT) according to the manufacturer's protocol (luciferase assay system catalog no. E1500; Promega).

LPS-induced phosphorylation of GST-c-Jun was likely not due to activated p38 MAP kinase as purified p38 does not phosphorylate this substrate (22). Finally, we previously demonstrated that activation of a fusion protein between oncogenic Raf-1 and the ligand-binding domain of the estrogen receptor, ΔRaf-1:ER, expressed in RAW 264.7 cells was sufficient to activate ERK1 and ERK2 (11); however, it did not activate JNK (Fig. 2). The phorbol ester PMA, which also

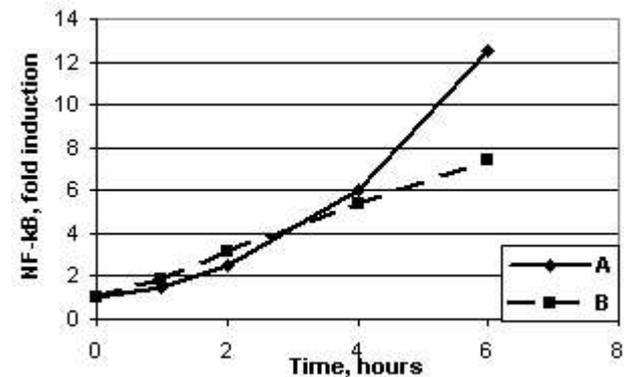
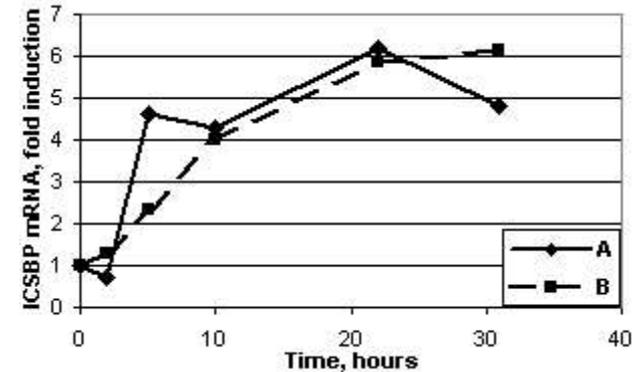
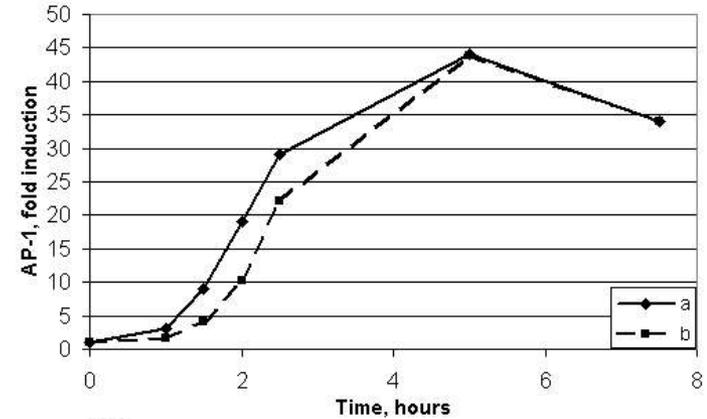
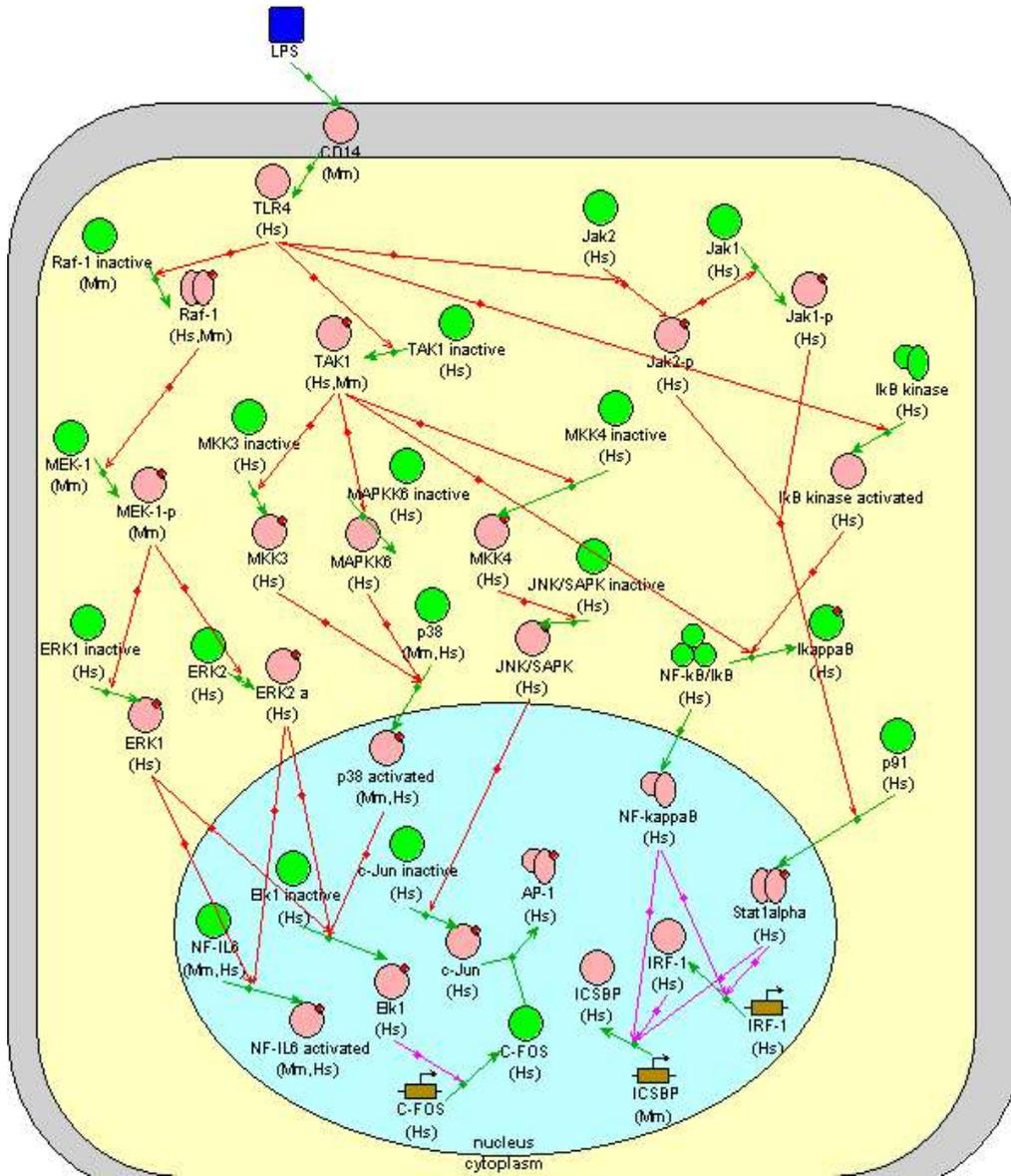
Time (h)	LPS (1 μg/ml)	PMA (100 nM)
0	0	0
1	~10	~5
2	~35	~15
3	~60	~25
4	~80	~35
5	~90	~45
6	~85	~55
7	~75	~65
8	~70	~75

Fig. 1. LPS stimulates AP-1 transactivation in RAW 264.7 macrophages. Cells were transiently transfected with an AP-1-regulated luciferase plasmid, pooled, and then evenly split onto tissue culture dishes. Approximately 40 h after transfection, the cells were treated with *S. typhimurium* R595 LPS (1 μg/ml) or 100 nM PMA for the indicated times. Following stimulation, the cells were lysed and the luciferase activity was measured with a luminometer. Each data point is the average of two independent samples; error bars indicate range. Two additional experiments gave similar results.

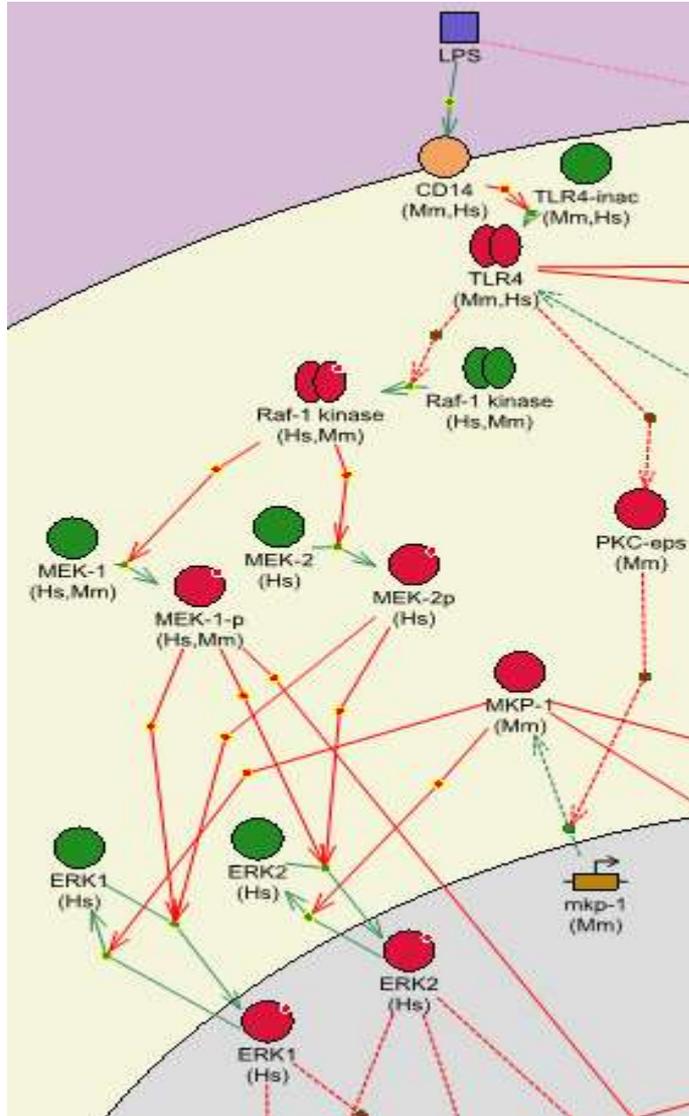
# Зависимость количества мРНК и белкового продукта гена MHC II IAb



# Моделирование путей передачи сигналов и активации транскрипционных факторов



# Фрагмент генной сети активации макрофага - сигнальный путь CD14/TLR4/RAF1/MEK/ERK



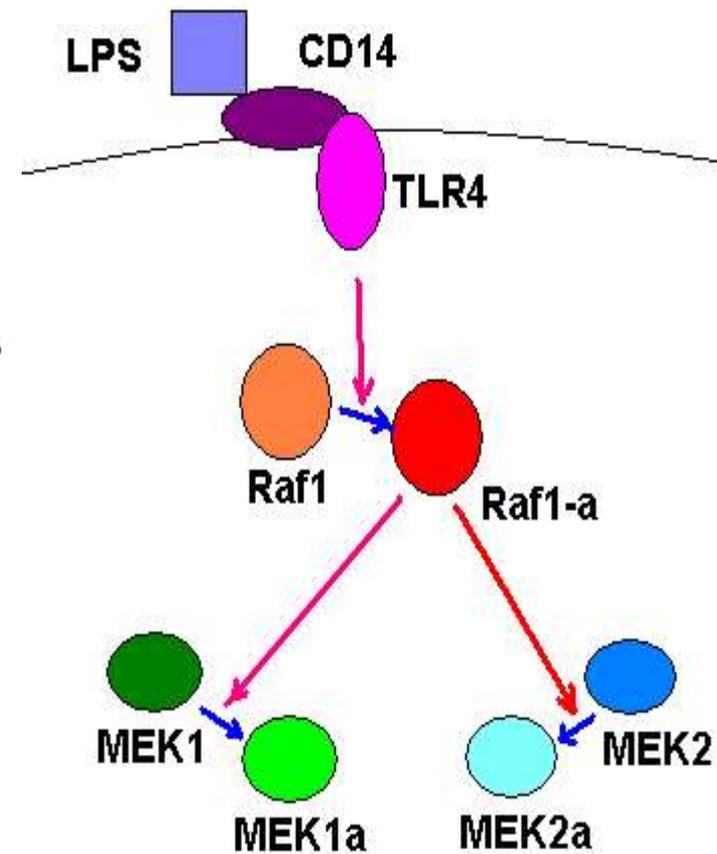
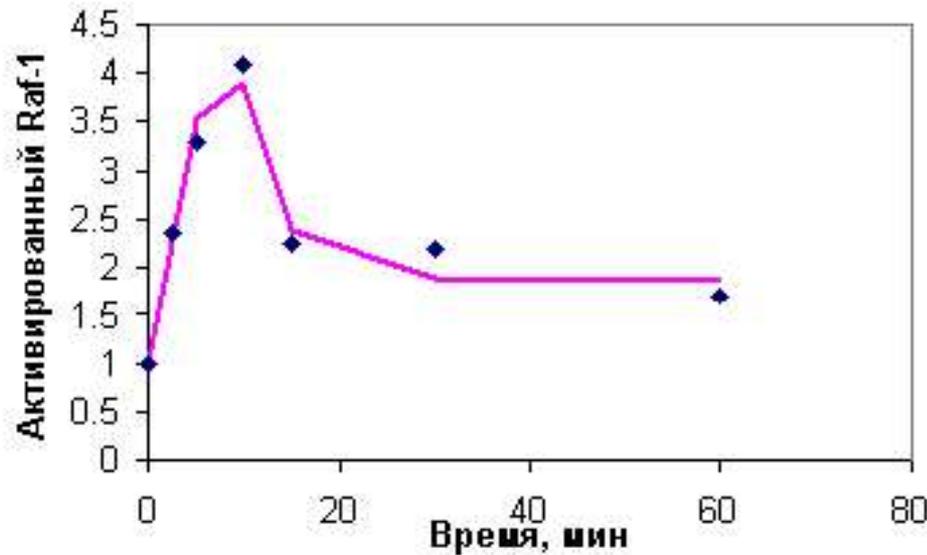
## Начальные концентрации некоторых компонентов в математической модели:

Название вещества      Концентрация

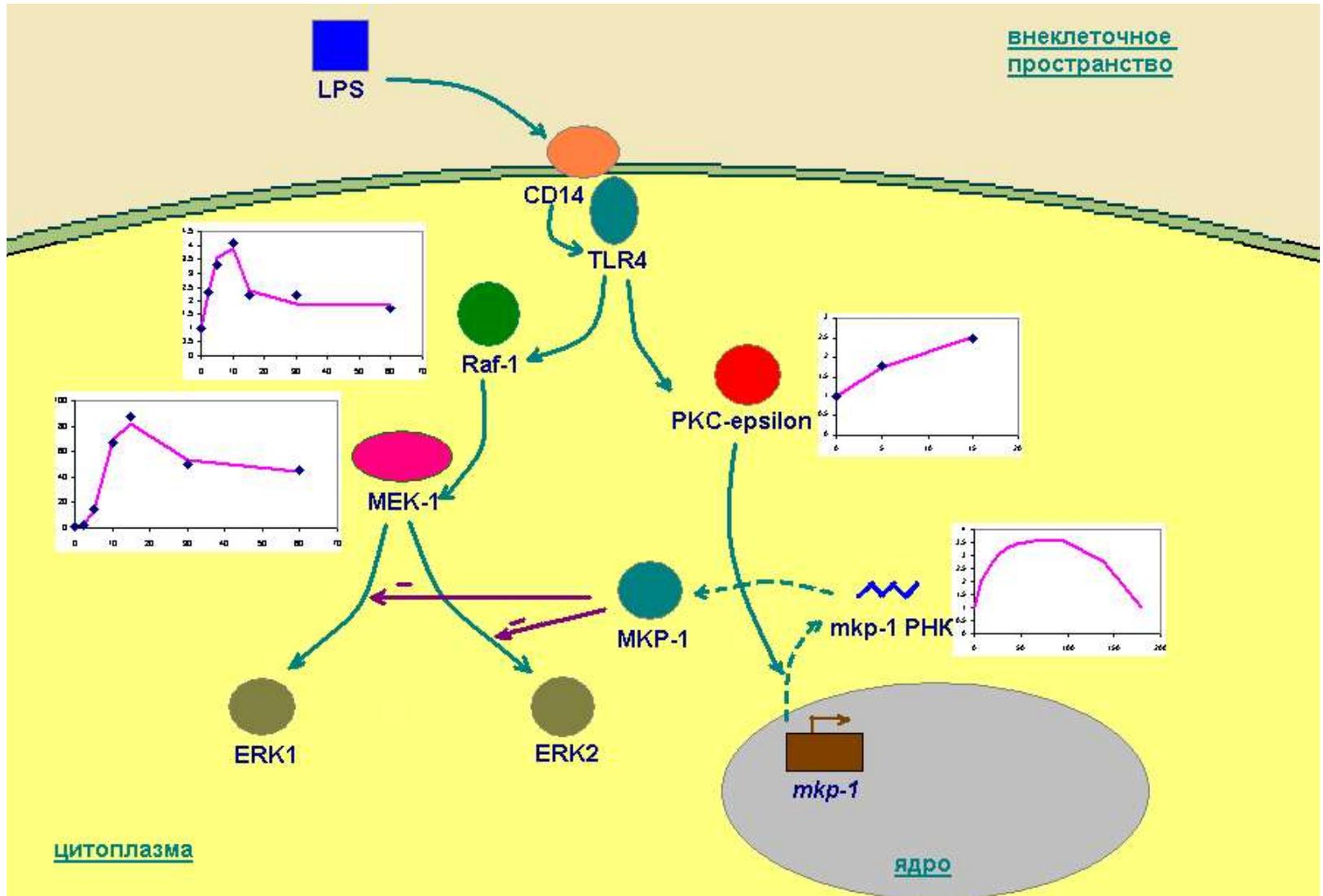
TLR4 предшественник	5000
CD14 предшественник	5000
RAF-1 предшественник	1000
MEK-1 предшественник	1000
MEK-2 предшественник	1000
TLR4 активатор	28
ERK1 предшественник	500
ERK2 предшественник	500
МАРК р38 предшественник	500
Elk-1 предшественник	500
NF-IL6 предшественник	500
ATF-2 предшественник	500
PKC-epsilon предшественник	1000
МКР-TF предшественник	1000
<i>mkr-1</i> ген	1

# Подбор параметров для описания динамики концентрации активной формы Raf-1

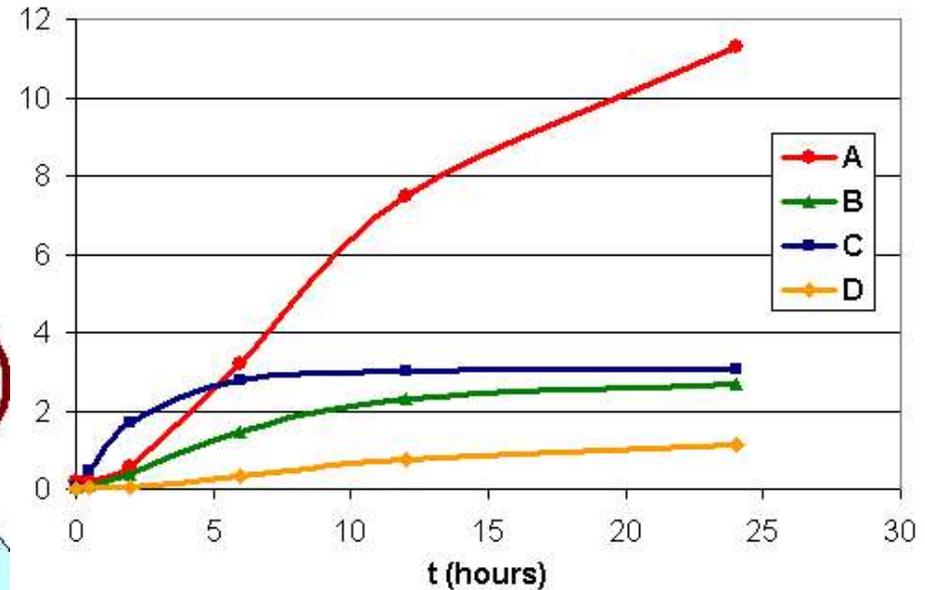
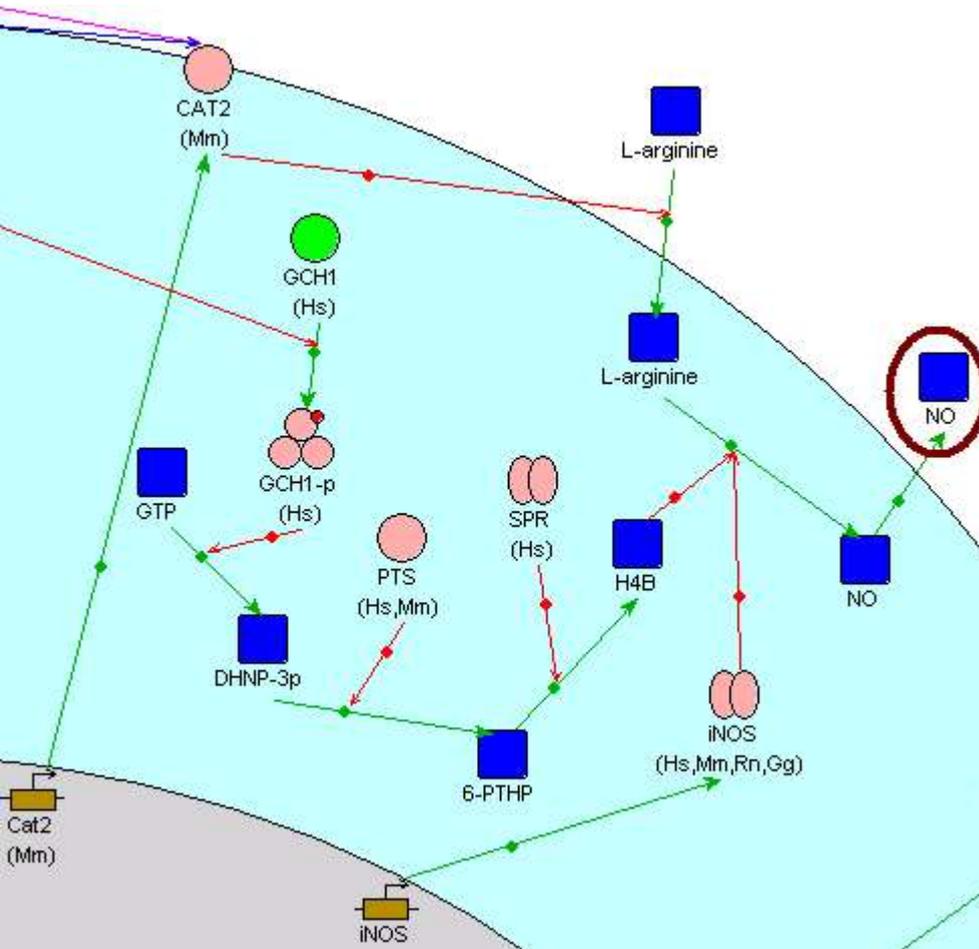
- Синтез неактивной формы Raf-1 –  $K_s$
- Дегградация неактивной формы Raf-1 –  $K_{deg1}$
- Активация Raf-1 активированным TLR4 –  $K_{o1}$
- Дегградация активированного Raf-1 –  $K_{deg2}$
- Активация MEK1 и MEK2 активным Raf-1 –  $K_{o2}$ ,  $K_{o3}$



# Моделирование сигнального пути CD14/TLR4/RAF1/MEK/ERK



# Моделирование гипотетических мутаций. Синтез NO.



**A** – в норме;

**B** – при мутации, уменьшающей в 10 раз  $K_o$  GCH1;

**C** – при мутации, уменьшающей в 10 раз  $K_o$  iNOS и увеличении базальной транскрипции гена iNOS на 4 порядка;

**D** – при мутации, уменьшающей  $K_o$  iNOS.

## Сложности, возникающие при моделировании

- Недостаток количественных данных
- Данные получены при разных условиях
- Неполная картина знаний о структуре геномной сети

# Возможное применение модели генной сети активации макрофага

- прогнозирование качественных и количественных характеристик функционирования генной сети в норме;
- оценка влияния мутаций и особенностей поведения генных сетей при различных патологиях;
- проверка альтернативных гипотез о недостающих звеньях и/или регуляторных связях;
- оценка влияния лекарственных препаратов с известными эффектами на остальные компоненты и процессы в генной сети.