

Феноменология управления в природных генных сетях: онтогенез и клеточный цикл

Введение: типы генных сетей и режимы их функционирования	2
Феноменология управления в генных сетях клеточного цикла различных эукариотических организмов.....	2
I. Молекулярно-биологические требования к процессу клеточного цикла.....	2
I. Моделирование клеточного цикла почкующихся дрожжей	2
II. Моделирование клеточного цикла делящихся дрожжей	3
III. Клеточный цикл млекопитающих	4
Феноменология управления в генных сетях онтогенеза.	5
I. Молекулярно-биологические особенности процесса онтогенеза	5
II. Моделирование ранних этапов развития <i>Drosophila</i> : как пример моделирования развития в бесклеточной, континуальной среде	5
II. Развитие на клеточной основе	6
1. Основные особенности генных сетей развития на клеточной основе	6
2. Моделирование процессов развития на клеточной основе	6
Выводы.	8
Приложения.....	9

Введение: типы генных сетей и режимы их функционирования

Как вам известно из курса “Генные сети”, прочитанного в прошлом году, весь спектр генных сетей детерминирующих огромное множество различных процессов в живом организме будь то бактерии, растения, или животного можно подразделить на 4 группы (слайд 2): генные сети гомеостаза, отличительной чертой которых является поддержание контролируемого параметра (например, концентрации какого-либо метаболита) на определенном уровне, стресса – быстрое отклонение параметра от заданного уровня, циклических процессов – циклическое изменение состояния системы, онтогенеза – плавные, как правило, необратимые изменения параметров. Позволю вам также напомнить, что режим функционирования любой генной сети определяется: набором элементарных структур входящих в генную сеть, совокупностью элементарных процессов, а также начальным состоянием переменных этой генной сети. Все структурно-функциональные особенности генной сети можно описать в терминах теории графов: графы генных сетей различных процессов жизнедеятельности организма отличны друг от друга набором вершин соответствующим элементарным структурам, и набором ребер – элементарным процессам (слайд 1).

Сегодня наша лекция будет посвящена феноменологии управления в природных генных сетях онтогенеза и клеточный цикла. Феноменология управления в генных сетях гомеостаза была вам прочитана в предыдущих лекциях Александром Владимировичем Ратушным, об управлении в генных сетях стрессового ответа вам было поведено еще в курсе “Генные сети” Ириной Лембитовой Степаненко.

Феноменология управления в генных сетях клеточного цикла различных эукариотических организмов.

I. Молекулярно-биологические требования к процессу клеточного цикла

Кратко напомню вам основные вехи процесса клеточного цикла (курс “Генетика клеточного цикла” читается Леонидом Владимировичем Омельянчуком): 1) лицензирование репликации в промежутке между митозом и началом синтетической фазы – на этом этапе лицензионные факторы, связываясь с ориджинами репликации ДНК становятся затравкой для дальнейшей инициации репликации; 2) на границе между пресинтетической и синтетической фазами циклин-зависимые киназы активируются и начинают репликацию с лицензированных участков на ДНК, одновременно ингибируя лицензионные факторы; 3) завершение синтеза ДНК является главным требованием для входа клетки в митоз; 4) выравнивание хромосом - главным требованием для активации Anaphase-promoting complex (APC) который инициирует деградацию белковых компонентов ингибирующих расхождение сестринских хроматид (когезинов) и митотических циклинов, что позволяет вновь накапливаться лицензионным факторам на ориджинах хромосом (слайд 4).

I. Моделирование клеточного цикла почкующихся дрожжей

Наиболее хорошо изученным на молекулярном уровне на сегодня является клеточный цикл дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*. Важно, что клеточный цикл почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* упрощен по отношению к клеточному циклу высших эукариот следующими обстоятельствами - синхронным прохождением через синтетическую фазу и фазу митоза без заметной конденсации хромосом (в этом случае завершение репликации ДНК не требуется для начала ранних событий фазы митоза). Поэтому клеточный цикл почкующихся дрожжей можно рассматривать как чередование между двумя самоподдерживающимися состояниями – предсинтетической фазы, в которой активен APC, неактивны циклин-зависимые киназы, ориджины репликации лицензированы и способны инициировать синтез ДНК и фазы S/M в которой наоборот APC неактивен, циклин-зависимые киназы активны, а ориджины уже не способны вновь инициировать синтез ДНК. Схема событий обуславливающих процесс клеточного цикла *Saccharomyces cerevisiae*, включающая в себя контуры отрицательных и положительных обратных связей, тесно переплетенных друг с другом, приведена на слайде 5. На том же слайде приведено краткое описание молекулярных процессов клеточного цикла почкующихся дрожжей.

Имея принципиальную схему молекулярных событий клеточного цикла можно построить простейшую математическую модель клеточного цикла в терминах химической кинетики и/или просто закона действия масс. Модель клеточного цикла *Saccharomyces cerevisiae* была построена группой Тайсона. На слайде 6 вы можете увидеть поведение концентраций ключевых молекулярных компонентов клеточного цикла дрожжей во времени и дифференциальные уравнения, описывающие динамику концентрации некоторых из приведенных на предыдущем слайде компонентов.

В общем виде, главная идея модели группы Тайсона – это бистабильность и гистерезис молекулярной машины клеточного цикла *Saccharomyces cerevisiae*: при высокой концентрации Cln2 и низкой концентрации Cdc20, система находится в фазе S/M, наоборот при низкой концентрации Cln2 и высокой концентрации Cdc20 система находится в предсинтетической фазе (слайд 7). Когда концентрации как Cln2 так и Cdc20 малы система находится в нейтральном состоянии (бистабильность), однако биологически такое состояние не имеет места быть. Реальная система “ходит по кругу петли гистерезиса” за счет пульсирования активностей Cln2 (стадии a и b) и Cdc20 (стадии c и d).

II. Моделирование клеточного цикла делящихся дрожжей

Той же группой авторов во главе с Тайсоном была построена модель клеточного цикла другого рода дрожжей – делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*. Клеточный цикл *Schizosaccharomyces pombe* так же упрощен по отношению к клеточному циклу высших эукариот: деление клетки регулируется всего лишь одной группой циклинов (B-типом циклинов - Cdc13) и всего лишь одной циклин-зависимой киназой (Cdk1). Схема событий также имеющих в своей основе сеть положительных и отрицательных обратных связей, краткое описание молекулярных процессов обуславливающих процесс клеточного цикла *Schizosaccharomyces pombe*, а также введенные упрощения некоторых молекулярно-биологических событий приведены на слайде 8.

На следующем слайде вы можете увидеть поведение концентраций ключевых молекулярных компонентов клеточного цикла *Schizosaccharomyces pombe* во времени, а также систему дифференциальных уравнений, описывающую динамику их концентрации. Если при анализе математической модели клеточного цикла почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* упор был сделан на бистабильность и гистерезис поведения молекулярной машины клеточного цикла, то в модели клеточного цикла делящихся дрожжей Тайсон и соавторы проанализировали устойчивость системы в терминах

бифуркационного анализа используя в качестве бифуркационных параметров массу клетки и активность основного компонента клеточного цикла делящихся дрожжей Cdk1/Cdc13 (MPF) (слайд 10). Важно отметить, что в результате такого подхода удается очертить физиологические границы концентраций ключевых компонентов системы.

III. Клеточный цикл млекопитающих

Молекулярная машина клеточного цикла высших эукариот гораздо сложнее молекулярной машины клеточного цикла низших эукариот. Необходимость усложнения машины клеточного цикла высших эукариот становится объяснимым, если принять во внимание тот факт, что деление отдельных клеток многоклеточного организма необходимо контролировать в многоклеточном организме не допуская сбоев (поломка аппарата контроля клеточного цикла непременно приводит к бесконтрольному делению мутантных клеток - канцерогенезу). Принципиальная схема с указанием позитивных и негативных регуляторов отдельных стадий клеточного цикла высших эукариот приведена на слайде 11. На том же слайде можно увидеть динамику концентрации ключевых молекулярных компонентов клеточного цикла – циклинов и циклин-зависимых киназ.

Важнейшим звеном контроля клеточного цикла высших эукариот являются каскады фосфорилирования, приводящие либо к активации, либо к репрессии процесса клеточного цикла на определенных стадиях (слайд 12). Наглядным же примером результата молекулярно-биологических событий нормального хода клеточного цикла являются циклические преобразования компонентов клеточного цикла (слайд 13). Математическое моделирование процесса клеточного цикла высших эукариот представляет на сегодняшний день проблему – выявлены далеко не все важнейшие регуляторные контуры, обуславливающие циклирование параметров системы, не говоря о механизмах контроля клеточного цикла на отдельных фазах. Работа по выявлению таких контуров, а также построению модели клеточного цикла высших эукариот ведется в Лаборатории теоретической генетики. Начальным этапом моделирования является построение наиболее полных генных сетей описывающих молекулярно-биологические процессы клеточного цикла, а также логический анализ этих, выявляющий блоки ответственные за динамику функционирования. В лаборатории Игорем Ивановичем Турнаевым и соавторами недавно был проведен логический анализ генной сети клеточного цикла высших эукариот. Было выявлено более 40 петель положительных и отрицательных обратных связей, некоторые из них приведены на слайдах 14-16, а также два важнейших молекулярных триггера (слайд 17) – один из которых контролирует G1/S переход (из предсинтетической фазы в фазу репликации ДНК), другой контролирует переход к фазе G2 (постсинтетическую фазу). При этом важно отметить, что ключевые компоненты обоих триггеров являясь транскрипционными факторами, контролируют *альтернативную экспрессию* целой группы (кассеты) генов (слайд 18). Даже простое изучение распределения во времени числа регуляторных контуров с положительными и отрицательными обратными связями дает очень ценную информацию, а именно закономерное изменение соотношения контуров с положительными и отрицательными обратными связями в ходе клеточного цикла (слайд 19).

Моделирование клеточного цикла в Лаборатории осуществляется обобщенным химико-кинетическим методом (слайд 20), однако оно далеко до завершения в модель подобную модели клеточного цикла дрожжей группы Тайсона. Не поднятая целина интереснейших открытий ждет своих героев – вас будущие теоретические биологи.

Феноменология управления в генных сетях онтогенеза.

I. Молекулярно-биологические особенности процесса онтогенеза

Переходя ко второй части нашей лекции мне также хотелось бы отметить основные составляющие генных сетей онтогенеза (слайд 22). К ним можно отнести: 1) образование градиентов морфогенов; 2) реагирование на градиент морфогена и 3) запечатление детерминированного состояния клеток.

Практически на любом этапе развития важнейшими блоками генных сетей морфогенеза и дифференцировки являются блоки формирования иерархически организованной системы паттернов морфогенов. За формированием градиентов морфогенов следует собственно специфический ответ клеток на этот градиент (слайд 23). Важнейшее положение гипотезы “позиционной информации” предложенной Волпертом еще в 1969 году состоит в рассмотрении процесса индивидуального развития как серии последовательных морфогенетических событий, суть которых заключается в поэтапном образовании вначале градиента определенного морфогена, а затем - специфических ответов различных клеток на этот градиент в соответствии с концентрацией морфогена за их пределами. Современные молекулярно-биологические данные подтверждают и расширяют гипотезу Волперта. Практически всегда развития идет за счет межклеточных взаимодействий (слайд 24, 25). Межклеточные взаимодействия не могут осуществляться без способности определенной группы клеток отвечать на специфические индуктивные сигналы являющиеся градиентами морфогенов или межклеточными контактами физического характера (слайд 24). Важно, что ответ клеток на индуктивные сигналы осуществляется на протяжении определенного времени и в специфически очерченном пространстве, способствуя поэтапной гетерогенизации процессов развития, как во времени (гетерохронии), так и в пространстве (гетеротопии), что приводит к образованию со временем все новых и новых тканей (слайд 25).

II. Моделирование ранних этапов развития *Drosophila*: как пример моделирования развития в бесклеточной, континуальной среде

Характерной особенностью раннего эмбриогенеза дрозофилы является: 1) прохождение всех молекулярно-биологических процессов в единой клетке (синцитии) и 2) наличие специфических, ответственных только за экспрессию на ранних этапах развития энхансеров генов детерминирующих процесс развития. Внутренний механизм работы генной сети ранних этапов развития - формирование иерархически организованной системы паттернов экспрессии морфогенов. Такой механизм развития может работать только тогда, когда все процессы протекают в единой клетке, которой является яйцеклетка *Drosophila melanogaster*. Специфические, ответственные только за экспрессию на ранних этапах развития энхансеры генов, является молекулярной основой иерархической организации описываемой генной сети - сайты связывания этих энхансеров являются интеграторами, распознающими концентрацию определенных морфогенов вдоль антерио-постериорной оси тела.

На слайде 26 приведены экспериментальные данные и результаты моделирования распределения экспрессии важнейших генов раннего эмбрионального развития дрозофилы группой Рейница. Интересно отметить, что не смотря на мощь используемого

подхода моделирования модель не всегда полностью отражает реальную динамику распределения экспрессии генов, вероятно из-за неполноты данных о структуре генных сетей.

Компоненты метода группы Рейница можно увидеть на следующем слайде. В метод включены: теоретическая модель, база данных паттернов экспрессии генов и методы численной оптимизации экспериментально измеренных величин. Следует подчеркнуть, что метод использует информацию о структуре реальных генных сетей, информацию о структуре энхансеров генов и информацию о распределении компонентов системы в пространстве.

II. Развитие на клеточной основе

1. Основные особенности генных сетей развития на клеточной основе

Важнейшей особенностью процесса эмбрионального развития на клеточной основе является наличие так называемых организаторов, групп клеток, как правило, располагающиеся на границах компартментов координирующих развитие какого-либо органа.

В генных сетях формирования, например организаторов развития крыла *Drosophila*, антерио-постериорной и дорзо-вентральной границ компартментов, можно выделить следующие блоки (слайд 28): 1) блок селекторных генов обеспечивающих разнокачественность различных компартментов; 2) блок формирования и распространения белков-морфогенов координирующих развитие всего органа; 3) сигнальные каскады, обеспечивающие передачу информации между клетками (сигнальные каскады оканчиваются звеном транскрипционных факторов). Важно то, что блоки генных сетей формирования границ компартментов функционируют в различное время и в различном месте, поэтому контуры обратных связей характеризуются разнесённостью компонентов во времени и/или в пространстве.

Как и в любой другой физиологической системе важнейшую роль в функционировании молекулярных машин эмбрионального развития на клеточной основе играют (слайд 29): молекулярные триггеры (переключения между двумя режимами функционирования генной сети обеспечивающими 2 типа специфической дифференцировки клеток); петли положительных обратных связей (механизм поддержания дифференцированного состояния клеток); и петли отрицательных обратных связей (механизм ограничения времени экспрессии генов в развитии).

2. Моделирование процессов развития на клеточной основе

Важной вехой на пути к моделированию позднего эмбриогенеза, наиболее сложно устроенного этапа онтогенеза, является моделирование процесса поздней сегментации эмбриона *Drosophila*, который представляет собой формирование иерархически организованной системы паттернов морфогенов на клеточной, а не синцитиальной основе. Недавно американскими исследователями было проведено компьютерное моделирование именно этого этапа развития *Drosophila* (слайд 30). Моделирование показало, что генной сети построенной на основании современных молекулярно-биологических данных может быть вполне достаточно для объяснения возникновения периодически распределенных в пространстве паттернов экспрессии определенных генов. Для описания функционирования генной сети детерминирующей процесс сегментации эмбриона *Drosophila* исследователи использовали уравнения химической кинетики с учетом

распределенности моделируемой системы в пространстве по одной оси координат, используя случайные константы. Важно, что Даусон и соавторы получили при этом реально наблюдаемый паттерн экспрессии генов детерминирующей сегментацию, хотя подобный тип моделей не имеет в своем арсенале возможности разделения процессов образования градиентов морфогенов и аппарата распознающего этот градиент.

К моделированию процессов развития на клеточной основе приступила и наша лаборатория совместно с Лабораторией генетики клеточного цикла. Начальным этапом этой работы было нахождение наиболее простого участка генной сети ответственного за распознавание клетками концентрации морфогена на антерио-постериорной границе компартментов имагинального диска *Drosophila* и моделировании его стационарного поведения. Молекулярно-биологические особенности выбранного нами участка генной сети вы можете увидеть на слайдах 31 и 32.

Схема кинетики блока воспринимающего градиент концентрации морфогена (в нашем случае НН) содержащего молекулярный триггер отражена на верхнем левом рисунке (слайд 33). Транскрипционная активность гена *ptc* (рецептора пути передачи сигнала) зависит от соотношения концентраций активаторной и ингибиторной форм транскрипционного фактора *CI* (конечного звена каскада передачи сигнала запускаемого белком РТС) и аппроксимируется первым уравнением в показанной системе уравнений. Для описания такого действия форм белка *CI* на транскрипцию гена *ptc* использовано уравнение Михаэлиса-Ментен, считая ингибиторную форму *CI* конкурентным ингибитором активаторной формы. Важно отметить, что в сравнении с процессами транскрипции, диффузии морфогенов или образовании белковых комплексов морфогенез протекает гораздо медленнее, следовательно, допустим анализ стационарной фазы процесса. Концентрация белка РТС в этом случае может быть легко найдена исходя из системы уравнений приведенной на слайде.

Интересно то, что поведение даже настолько простой функции, описывающей концентрацию белка РТС, аргументом которой является концентрация морфогена НН, не учитывающей огромное множество биологически важных параметров, очень близко к реально наблюдаемой картине распределения концентрации белка РТС в антериорном компартменте крыла *Drosophila* (слайд 33).

Морфоген НН нарабатывается в клетках постериорного компартмента и распространяется в область клеток антериорного компартмента, образуя стационарный градиент концентрации в этом компартменте. Кроме того, белок НН распадается в составе комплекса с собственным рецептором (РТС-НН). Эти процессы описаны в модели уравнением одномерной диффузии со “стоком” (слайд 34). Диффузия одномерна, поскольку в рассматриваемой задаче есть только одна пространственная координата – расстояние от границы компартмента. В иных более сложных случаях необходимо рассматривать процесс диффузии в двух- а то и трехмерном пространстве. Наш случай наиболее прост.

Для экспериментальной проверки адекватности нашей математической модели были сделаны фотографии нормальных крыловых имагинальных дисков *Drosophila* обработанных FITC антителами, связывающимися с белком РТС (слайд 35). Интенсивность флуоресценции FITC прямопропорциональна концентрации белка РТС на поверхности клеток, что позволяет легко измерять концентрацию белка РТС. Профили интенсивности флуоресценции в различных повторностях эксперимента в зависимости от расстояния от границы антериорного компартмента имагинального диска показаны на графике.

На слайде 36 вы можете увидеть график распределения теоретически предсказанной и экспериментально наблюдаемой концентрации белка РТС поперек антерио-постериорной границы компартментов. Для получения теоретической зависимости значения концентрации РТС от расстояния значения ранее полученной функции $HN(r)$ были подставлены в формулу указанную справа на слайде. Графики экспериментально

наблюдаемой концентрации были выровнены. Интересно то, что поведение даже настолько простой функции, описывающей концентрацию белка РТС очень близко к реальной картине.

В нашей модели сознательно не учитывается подразделенность имагинального диска на клетки. В работе Cohen и соавторов было показано, что, несмотря на то, что диаметр неделящихся (CDC2-мутантных) клеток намного превосходит диаметр нормальных клеток, увеличения ширины антерио-постериорной границы не наблюдается (слайд 37). Таким образом, ширина антерио-постериорной границы компартментов крылового имагинального диска не зависит от количества клеток находящихся в ней. Наверное, это общее свойство всех клеточных систем использующих для коммуникации градиент морфогена.

Однако, совсем не обязательно при моделировании эмбрионального развития на клеточной основе прибегать к столь большим обобщениям. Группа исследователей под руководством Соле, используя задел в моделировании онтогенеза положенный группой Рейница, достигла впечатляющих результатов в прямом моделировании эмбрионального развития на клеточной основе. Метод моделирования Соле и соавторов включает в себя как обязательные компоненты: генную сеть процесса, пороговые значения ответа генов на сигнал, а также процесс диффузии белков между соседними клетками (слайд 38). Метод различает внутриклеточные и межклеточные межгенных взаимодействия. Интересно, что на основе такого подхода просто рассматривая различные графы генных сетей можно получать практически весь спектр реально наблюдаемых паттернов экспрессии генов (слайд 39). На этой благо обещающей ноте позвольте перейти к выводам.

Выводы.

- Генные сети клеточного цикла, как и ожидалось, имеют циклический режим функционирования, однако высокая интегрированность подпроцессов клеточного цикла не позволяет моделировать клеточный цикл поэтапно, разбивая его на подпроцессы.
- Функция генных сетей онтогенеза – максимальное изменение и закрепление в ряду клеточных поколений определенного параметра дифференцировки клеток более того, на благо исследователей, генные сети онтогенеза устроены модульно и иерархично, что позволяет моделировать отдельные этапы развития
- Управляющими компонентами генных сетей как онтогенеза, так и клеточного цикла является набор обратных связей и триггеров моделирование функционирования которых приводит по крайней мере к частичному объяснению поведения реальной системы.

Приложения

Приложение 1 – статья “Kinetic Analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle”.

Приложение 2 – статья “Mathematical model of the cell division cycle of fission yeast”.

Приложение 3 – статья “How gap genes make their domains: An analytical study based on data driven approximations”

Приложение 4 – статья “Gene networks capable of pattern formation: from induction to reaction-diffusion”.