



Лимитирующие факторы в молекулярно-генетических системах

А.В. Ратушный

Кафедра информационной биологии ФЕН НГУ



В силу сложности процессов в биологических системах необходимо выделить главные факторы, взаимодействие которых качественно определяет «судьбу» системы.

Например, фактически все модели, включающие описание роста популяций или сообществ, основываются либо на "принципе лимитирующих факторов" (Leibig, 1840), либо на "законе совокупного действия факторов", Э.А.Митчерлих (Mitscherlich, 1909, 1925). Исходно эти принципы были сформулированы для популяций одного вида, однако применяются для описания многовидовых сообществ и экосистем.

Данные принципы также применимы к молекулярно-генетическим системам. Поиск и анализ лимитирующих факторов в генных сетях, определяющих поведение различных характеристик системы, нахождение способов воздействия на них и т.д., являются ключевыми в теории управления биологическими системами на молекулярном уровне.



Концепция лимитирующих факторов

Концепция лимитирующих факторов принадлежит немецкому агрохимику Юстусу Либиху, который предложил знаменитый закон минимума: "Каждое поле содержит одно или несколько питательных веществ в минимуме и одно или несколько других в максимуме. Урожаи находятся в соответствии с этим минимумом питательных веществ". Либих понимал под этим относительный минимум питательного вещества по сравнению с содержанием других веществ. Позже в экологической литературе фактор, находящийся в минимуме, стали называть лимитирующим фактором. Закон "лимитирующего фактора" для фотосинтетических процессов в 1905 г. предложил Ф.Блэкман, а в 1965 г. Н.Д.Иерусалимский сформулировал этот закон для ферментативных процессов. Естественно, что при изменении соотношений факторов, лимитирующий фактор может изменяться.



Математическая теория описания систем с лимитирующими факторами разработана И.А.Полетаевым и его школой (Полетаев, 1966, Гильдерман, 1970). Обобщение принципа лимитирующего фактора с использованием теоретико-множественных представлений и разработка методов выделения лимитирующего звена с энтропийных экстремальных принципов дана в работах А.П.Левича (1988, 1994). Разработан класс дискретно непрерывных моделей, описываемых системами дифференциальных уравнений, структура которых меняется в определенные моменты времени, а последние в свою очередь зависят от значения решений самих уравнений. И.А. Полетаевым эти системы названы системами с лимитирующим фактором, или Л-системами.

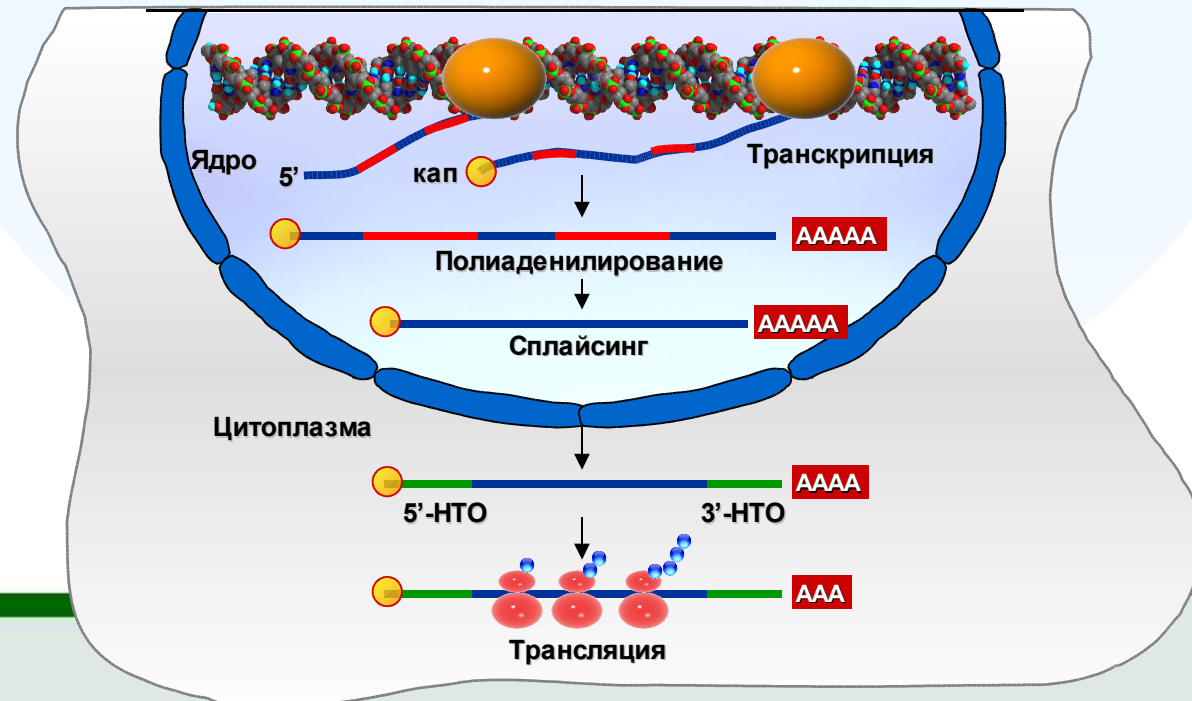
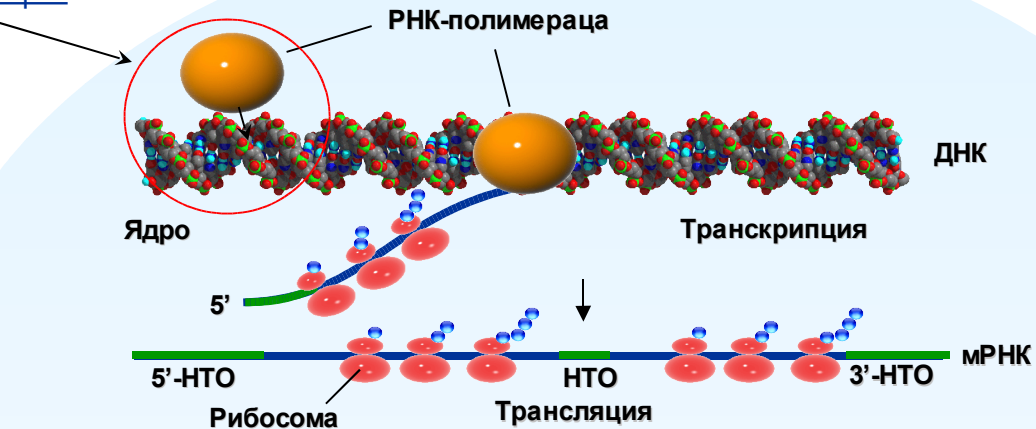


Самым простым примером Л-системы служит химическая реакция соединения нескольких веществ в одно, происходящая практически мгновенно. Вещества-реагенты могут взаимодействовать лишь в строго определенных стехиометрических соотношениях, и поэтому скорость рассматриваемой реакции определяется самой медленной в данный момент времени из скоростей притока каждого из исходных веществ в сферу реакции. Иными словами, свойства Л-системы определяются наличием узкого места и его сменой в процессе функционирования.



Примеры лимитирующих стадий в молекулярно-генетических системах

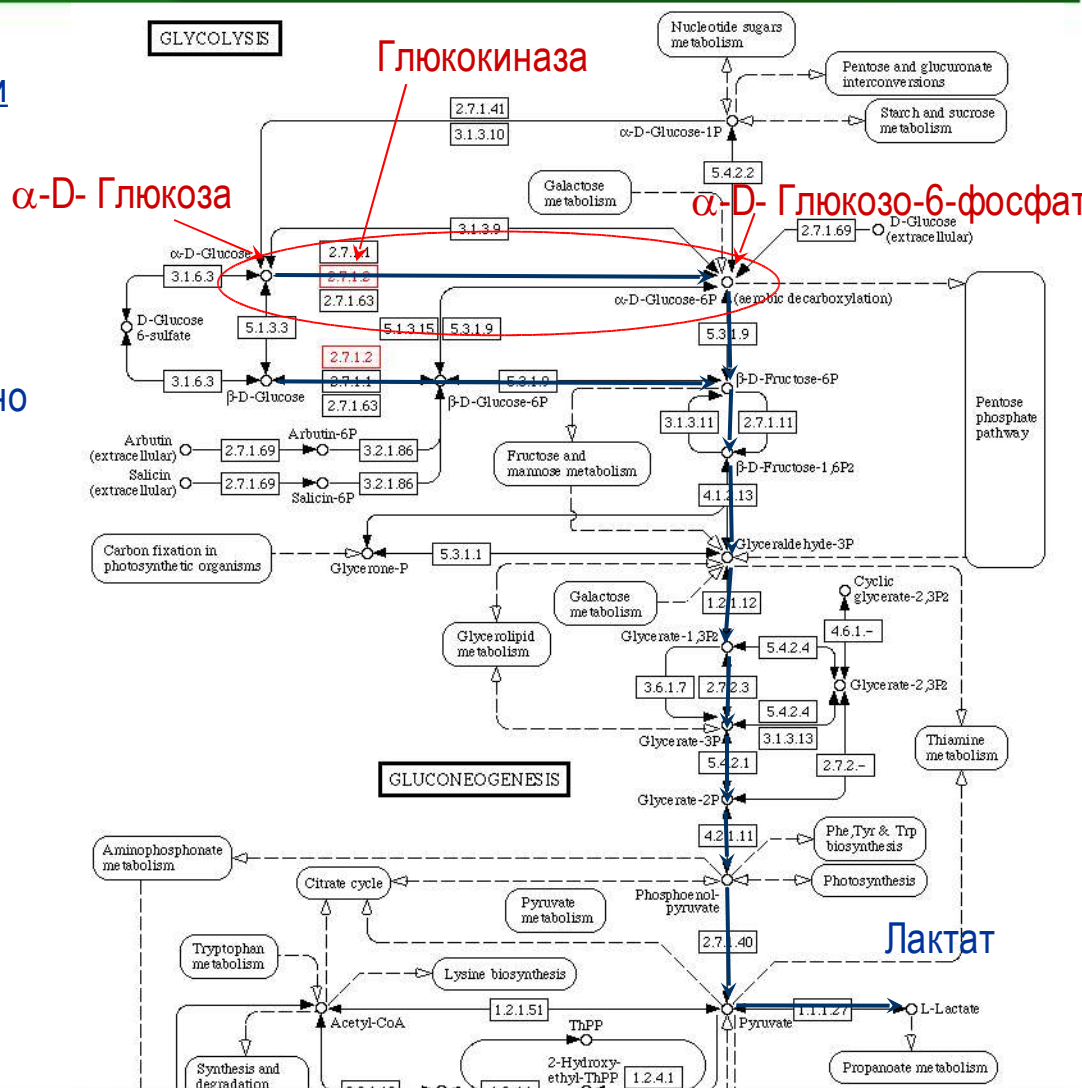
Как правило, стадия инициации транскрипции является лимитирующей стадией в процессе синтеза белка. Но это не всегда так. Например, у прокариот скорость синтеза белка может лимитироваться процессом аттенюации.





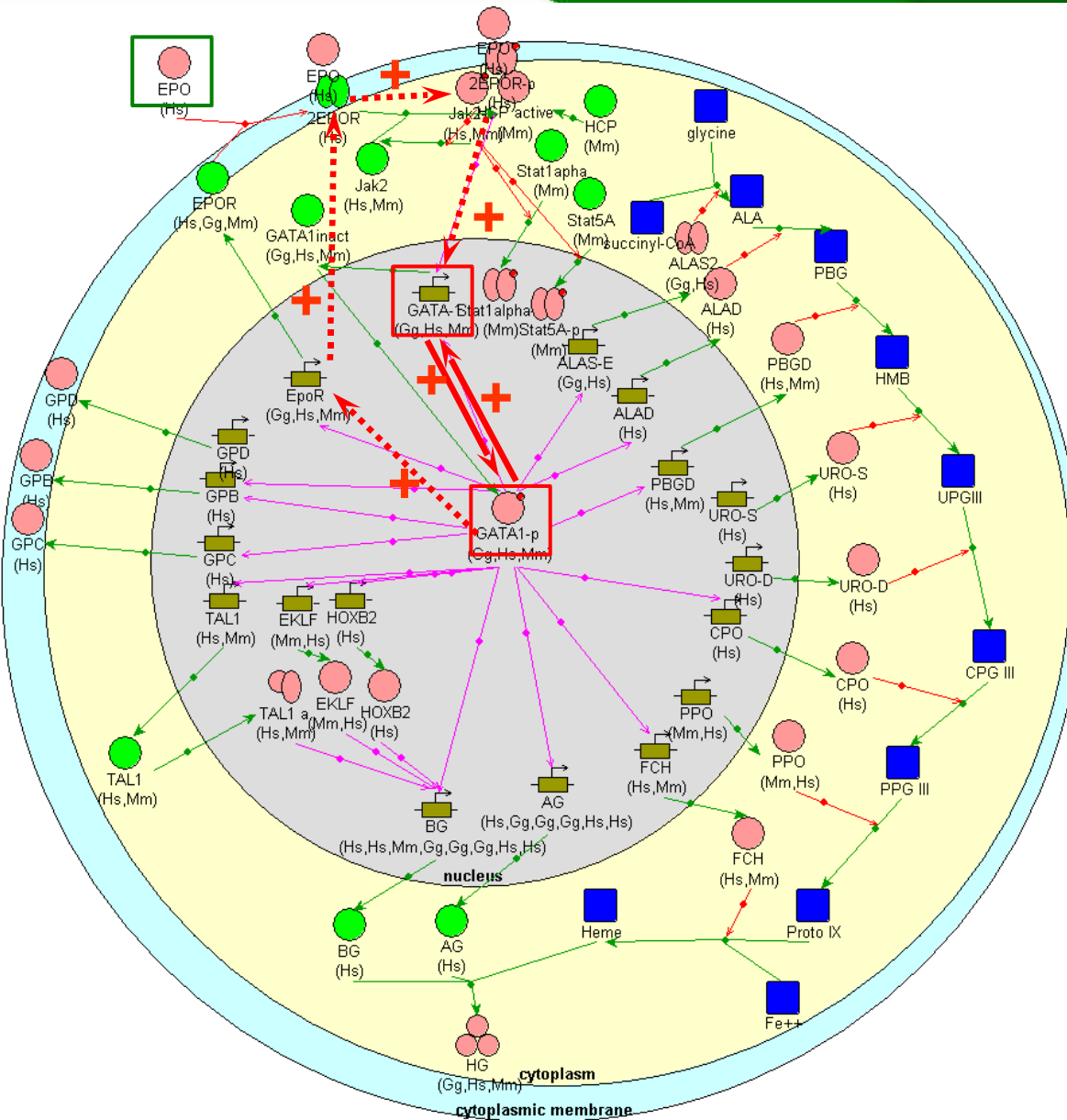
Примеры лимитирующих реакций в метаболических системах

Лимитирующая реакция метаболического пути
Определяющая скорость реакция (лимитирующая) - это первая реакция метаболического пути, фермент которой насыщается субстратом. Она может быть определена как "неравновесная" реакция, характеризующаяся величиной K_m , значительно меньшей, чем нормальная концентрация субстрата.
Первая реакция гликолиза, катализируемая гексокиназой, является примером такой определяющей скорости реакции.





Генная сеть регуляции дифференцировки эритроидной клетки



The hormone erythropoietin interacts with the receptors of immature erythroid cells (erythroid stem progenitors of CFUe type) and stimulates their proliferation, hemoglobin synthesis, and synthesis of the enzymes involved in heme biosynthesis, that is, maturation and differentiation of erythroid progenitors.

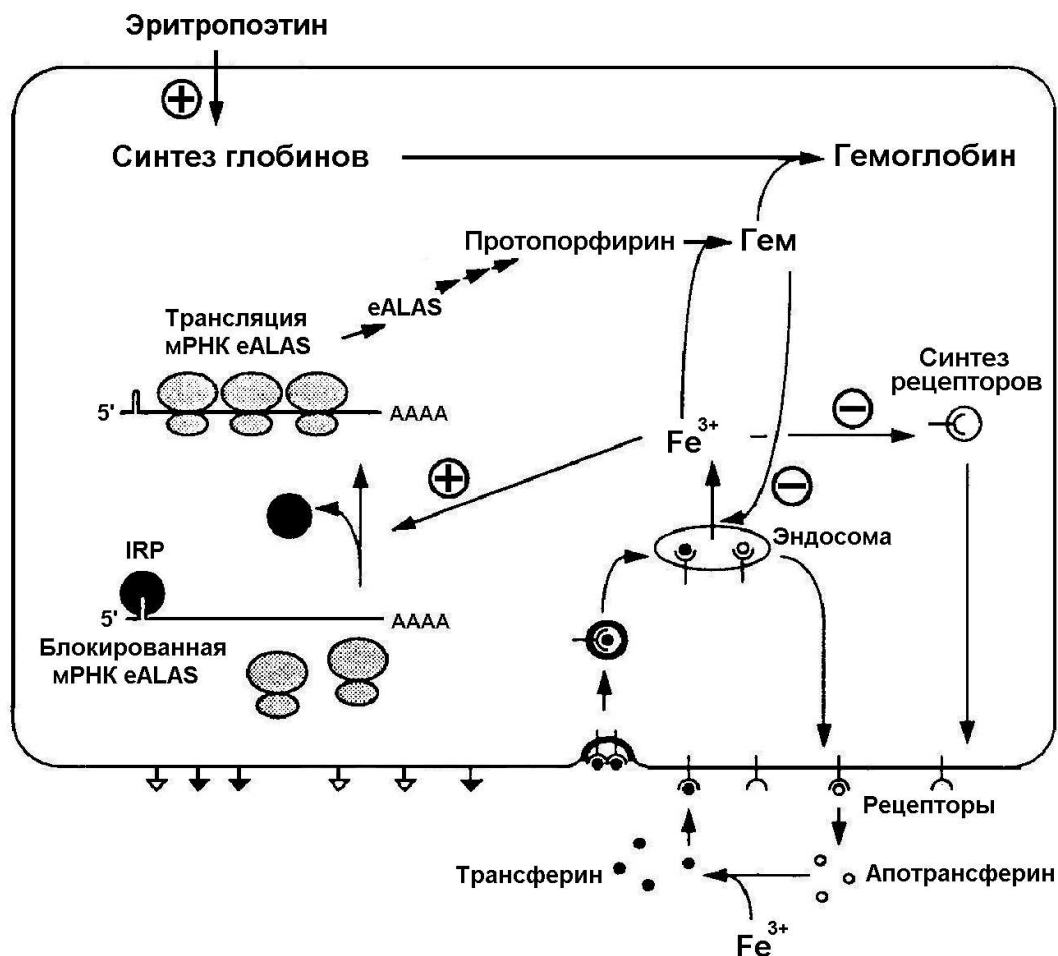
A low partial pressure of venous oxygen (hypoxia) stimulates erythropoietin synthesis. The system regulating the erythroid cell differentiation displays a pronounced positive feedback. Erythropoietin interaction with the cellular receptor activates GATA-1 transcription factor, a key regulator of erythrocyte differentiation. GATA-1 stimulates the syntheses of α and β globins as well as the heme-synthesizing enzymes. In addition, GATA-1 activates its own gene and the gene coding for erythropoietin receptor (positive feedback).

Hem, α , and β globins form hemoglobin, the major component of the mature erythrocyte. GeneNet Database:

<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/systems/genenet>



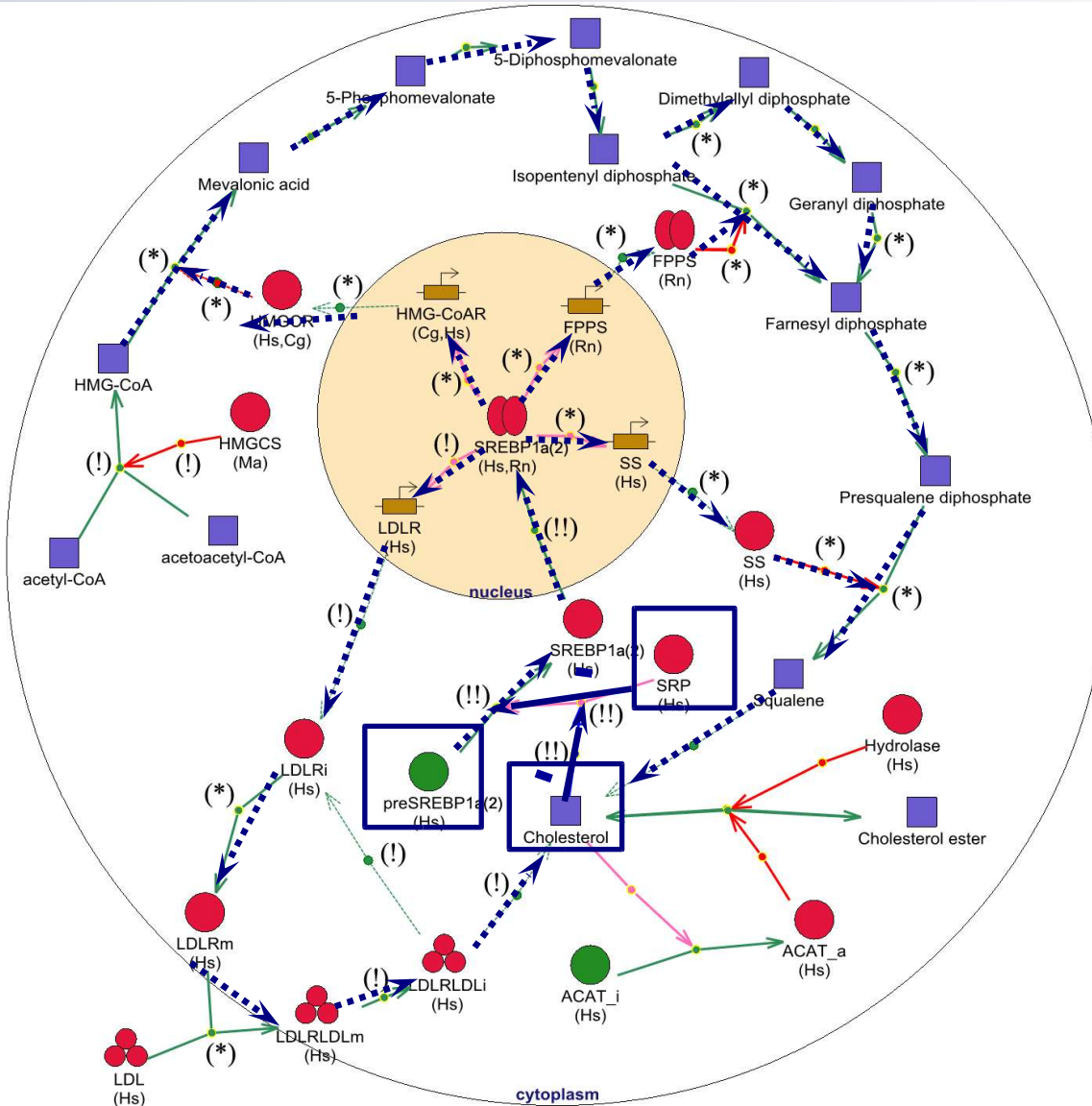
Генная сеть регуляции дифференцировки эритроидной клетки



Система регуляции поступления ионов Fe^{3+} в эритроидную клетку и контролирующая функция белка регулируемого железом IRP (iron regulating protein). еALAS – эритроидная 5-аминолевулинат синтетаза



Генная сеть, контролирующая гомеостаз холестерина в клетке



- 1 - gene;
- 2 - active protein;
- 3 - inactive protein;
- 4 - multimeric complex;
- 5 - nonprotein substance;
- 6 - direct reaction;
- 7 - indirect reaction;
- 8 - regulatory event (switch on);
- 9 - regulatory event (increase);
- 10 - regulatory event (decrease)

Cells maintain cholesterol concentration in balance by sensing its level in the endoplasmic reticulum and transducing this information into the expression of multiple homeostatic genes (Steck T.L. and Lange Y., Dev Cell. 2002 Sep;3(3):306-8)

- 1, - 2, - 3, - 4, - 5, - 6, - 7, - 8, - 9, - 10

GeneNet Database:

<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/systems/genenet>



Обобщенный химико-кинетический метод моделирования



Динамика молекулярно-генетических систем в ОХКММ формально описывается моделями вида:

$$t > 0, \quad \frac{dx_i}{dt} = F_i(X, K) - x_i G_i(X, K)$$

где n – количество динамических переменных модели,

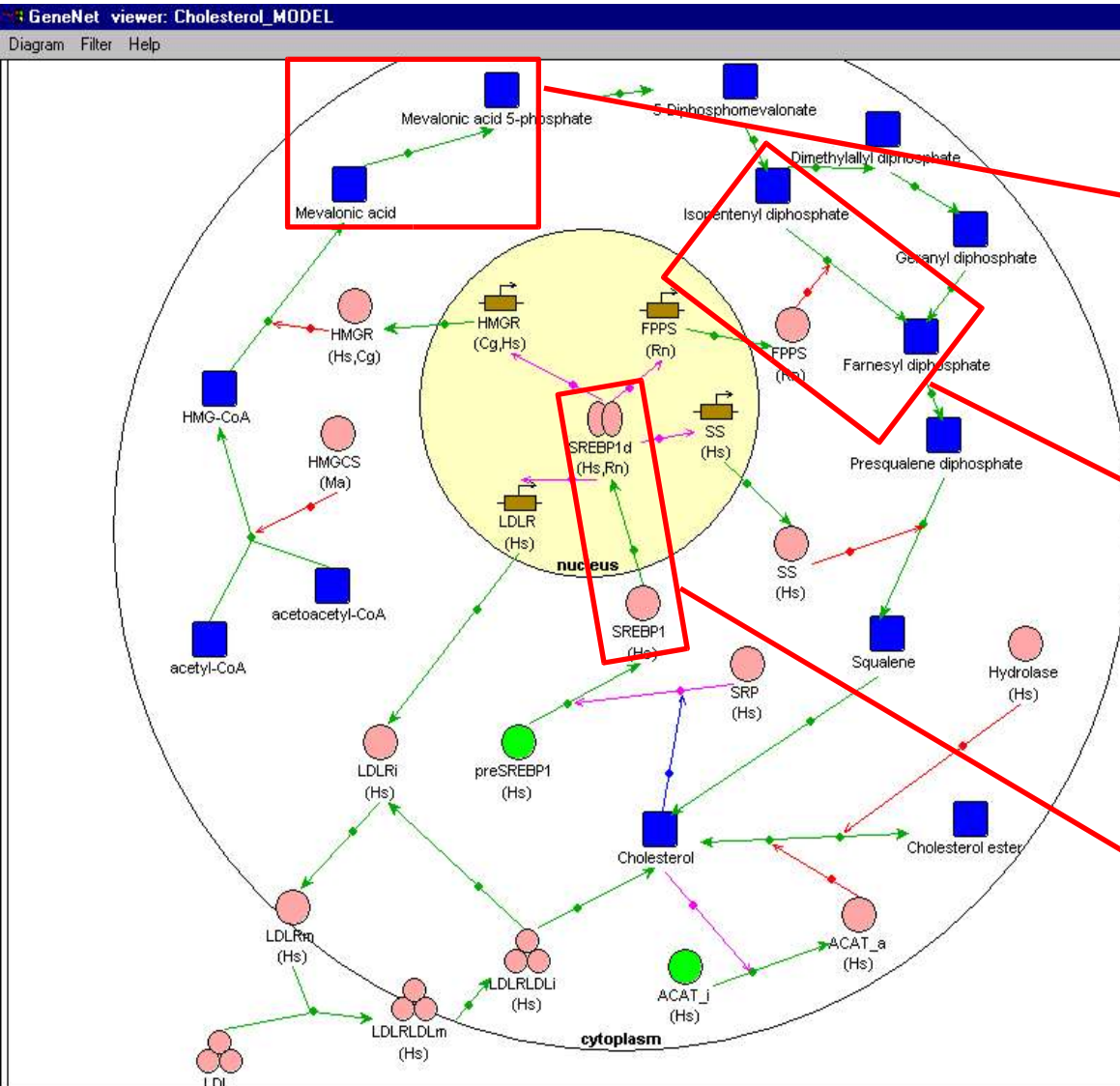
$X = (x_1, \dots, x_n)$ – вектор динамических переменных, как правило имеющих смысл концентраций,

$K = (k_1, \dots, k_m)$ – вектор параметров,

$F_i(X, K)$ и $G_i(X, K)$ – рациональные функции, принимающие неотрицательные значения при всех неотрицательных значениях переменных и параметров.



Формальное описание элементарных процессов в генных сетях



Monomolecular reaction:

$$\left\{ \begin{array}{l} A \xrightarrow{k} B, \quad a = [A], \quad b = [B] \\ -da/db = db/dt = ka \end{array} \right.$$

Enzymatic reaction:

$$\left\{ \begin{array}{l} E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P, \\ e = [E], \quad s = [S], \quad e_a = [ES], \quad p = [P] \\ ds/dt = -dp/dt = -k_3 e_o s / (K_m + s), \\ e_o = e + e_a, \quad K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1 \end{array} \right.$$

Bimolecular reaction:

$$\left\{ \begin{array}{l} A + B \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} C, \quad a = [A], \quad b = [B], \quad c = [C] \\ da/dt = db/dt = -dc/dt = -k_1 ab + k_2 c \end{array} \right.$$



Фрагмент системы дифференциальных уравнений:

математическая модель биосинтеза холестерина в клетке



.....

$$d(\text{Cholin})/dt = + \{KISBin * \text{Squalene}\} - \{KISBestr * \text{Cholin} * \text{ACAT} / (KMSBestr + \text{Cholin} + \text{ACAT})\} + \{KISBhydr * \text{Cholestr} * \text{Hydrolas} / (KMSBhydr + \text{Cholester} + \text{Hydrolas})\} + \{1785 * KISBfree * \text{LDLRLDLi}\} + \{-Kin1prot * \text{Cholin} * \text{SRPprot} + Kin2prot * \text{SRP-Chol}\} + \{Ksrpcdeg * \text{SRP-Chol}\} - \{Kutichol * \text{Cholin}\}$$

$$d(\text{LDLR} ____) / dt = + \{-Kclaw1 * \text{LDLR} ____ * \text{LDL} ____ + Kclaw2 * \text{LDLRLDLo}\} + \{Kfre ____ t * \text{LDLRin}\} - \{KLDLRdeg * \text{LDLR} ____\}$$

$$d(\text{LDL} ____) / dt = + \{-Kclaw1 * \text{LDLR} ____ * \text{LDL} ____ + Kclaw2 * \text{LDLRLDLo}\} + \{KsynLDL * \text{PLDL} ____\} - \{KutiLDL * \text{LDL} ____\}$$

$$d(\text{LDLRin}) / dt = + \{KISBldlr * \text{LDLRgene} * \text{SREBPdim} / (KMSBldlr + \text{LDLRgene} + \text{SREBPdim})\} - \{Kfre ____ t * \text{LDLRin}\} + \{Kfree * \text{LDLRLDLi}\} - \{KdegLRin * \text{LDLRin}\}$$

.....

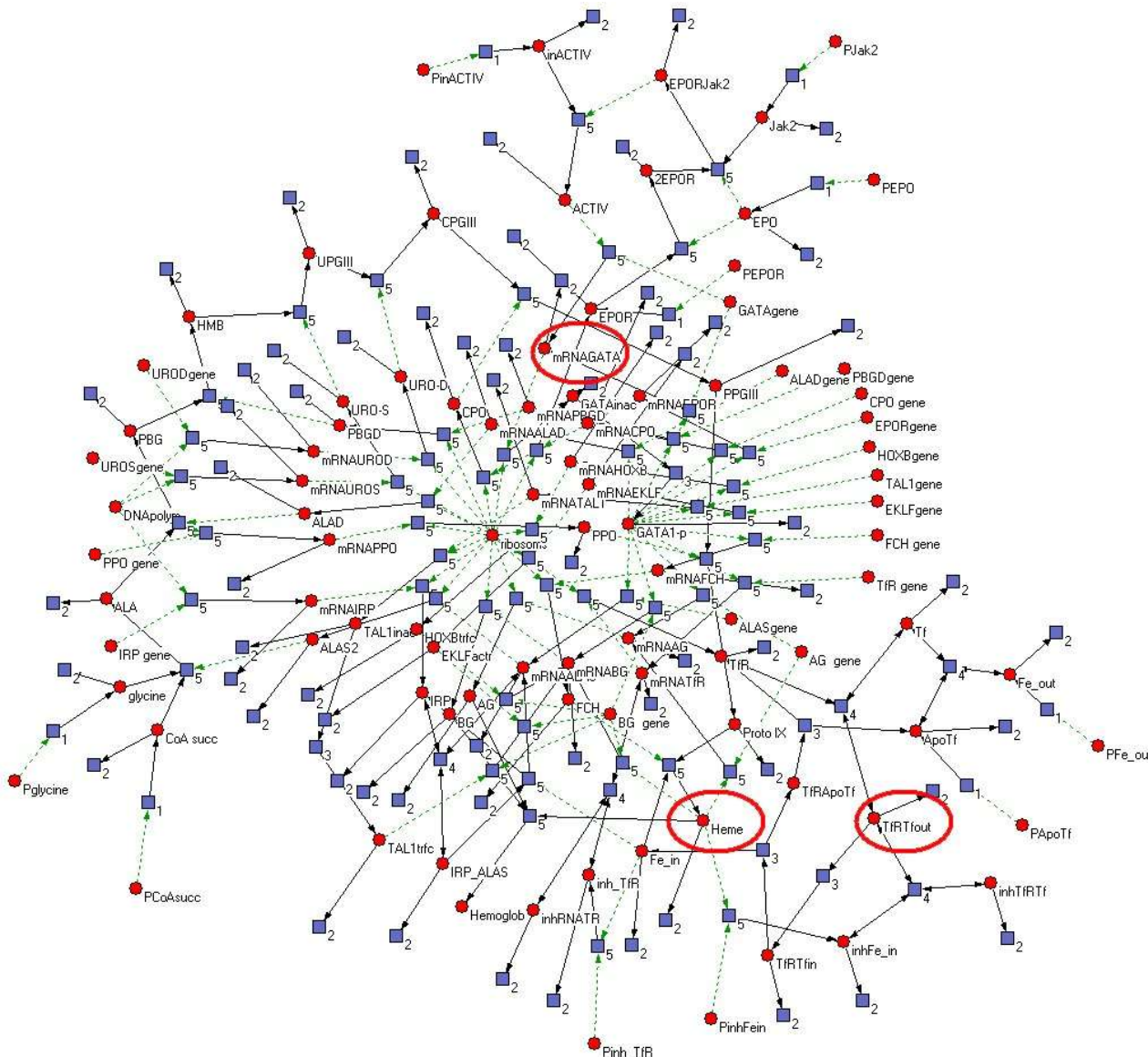
Константы мономолекулярных реакций, с ⁻¹	$KISBfree = 1 * 10^{-02}$, $Ksrpcdeg = 2.5 * 10^{-05}$, $Kfre ____ = 1 * 10^{-02}$, $KLDLRdeg = 1.93 * 10^{-6}$, $KsynLDL = 3.32 * 10^{-02}$, $KutiLDL = 3.21 * 10^{-06}$, $KdegLRin = 1.93 * 10^{-06}$	
Константы бимолекулярных реакций	л*ммоль ⁻¹ *с ⁻¹	с ⁻¹
	$Kclaw1 = 3.3 * 10^{-01}$	$Kclaw2 = 1 * 10^{-03}$
Константы ферментативных реакций	Константы оборота фермента, с ⁻¹	
	$KISBestr = 1 * 10^{+02}$, $KISBhydr = 1.9 * 10^{+03}$, $KISBldlr = 1 * 10^{-1}$	$KMSBestr = 6.67 * 10^{-03}$, $KMSBhydr = 7.6 * 10^{-01}$, $KMSBldlr = 3.3 * 10^{-05}$



Математическая модель генной сети

регуляции дифференцировки эритроидной клетки

Двудольный граф
математической модели
генной сети регуляции
дифференцировки
эритроидной клетки



● - 65 динамических переменных

■ - 165 процессов

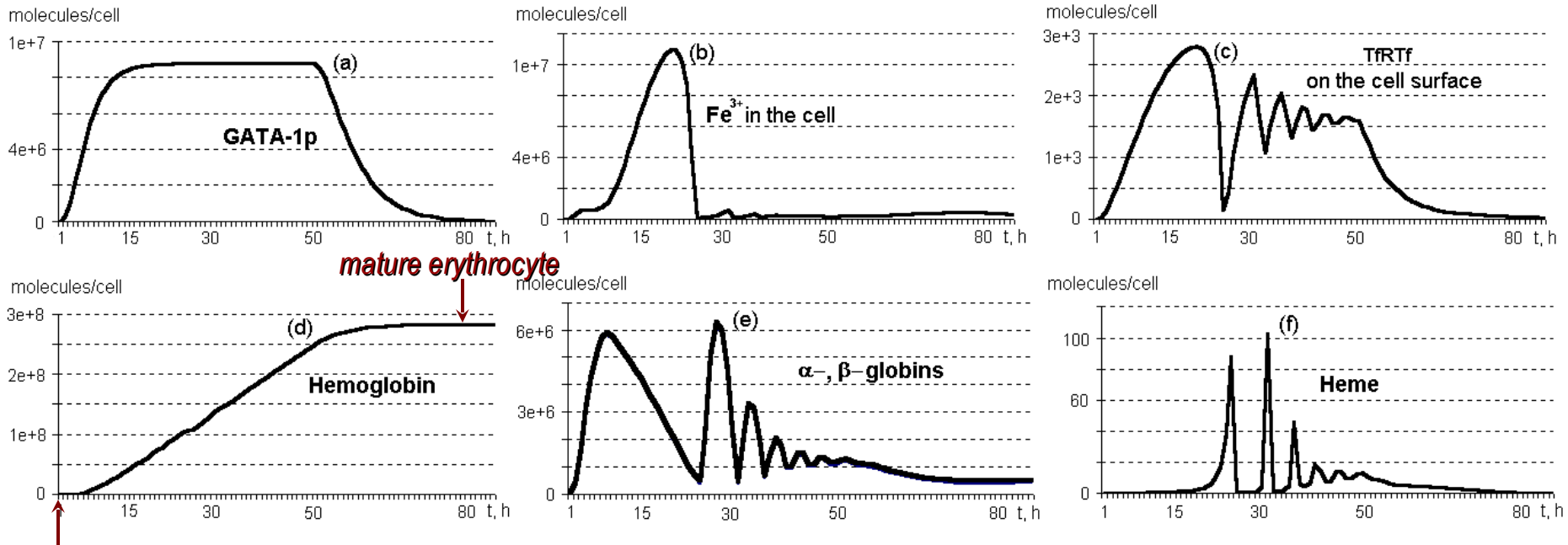
→ - участие в процессе с ненулевой стехиометрией
- - - - -> - участие в процессе с нулевой стехиометрией

- 1 - конститутивный синтез
- 2 - утилизация, либо деградация
- 3 - мономолекулярная реакция
- 4 - бимолекулярная реакция
- 5 - обобщенная реакция Михаэлиса-Ментен



Верификация параметров моделей генной сети регуляции дифференцировки эритроидной клетки

Dynamics of the main components on the system regulating the erythroid cell differentiation. By TfRTf are denoted transferrin receptors bound to transferrin (*calculations by a model*)



beginning of erythropoietin

effect

Hemoglobin is actively accumulated starting from the stage of basophilic erythroblast. Hemoglobin and other components are usually synthesized during G_1 and the beginning of S phases of DNA synthesis (Kozinets & Goldberg, 1982). The total (transit) time from proerythroblast to reticulocyte formation is 120 h (5 days). Two fifth of the overall cell cycle occur during G_1 and the beginning of S phases (Fedorov, 1976). Thus, the overall syntheses of internal components in a differentiating erythroid cell require approximately 50 h.



Верификация параметров моделей генной сети

регуляции дифференцировки эритроидной клетки

The number of transferrin receptors on the surface of an immature erythrocyte amounts to approximately 10^4 to 10^5 per cell; they are not detected in the progenitor cell (Kuhn, 1994).

The rates of hemoglobin synthesis in the cells at the stages of proerythroblasts and basophilic erythroblasts equal approximately 0.5 pg/h, that is, about 4.7×10^6 molecules/h for an average cell with a diameter of 10 μm ; at the stage of reticulocyte, the rate decreases fivefold, that is, to about 10^6 molecules/h (Kozinets & Goldberg, 1982). Each erythrocyte contains about 280 million hemoglobin molecules (Fedorov, 1976).

Theoretical numerical calculations according to this model demonstrate the following:

Oscillating synthesis dynamics are typical of heme, α and β globins, and the components of this molecular genetic system associated with the IRP control function and involved into Fe ions influx into the erythroid cell (Figure, b,c,d,e). This is due to the network of negative and positive feedbacks.

No excess of free heme is accumulated in the differentiating erythroid cell (Figure, f). First, it is due to control of heme biosynthesis by IRP, which binds eALAS mRNA, and eALAS is, in turn, the enzyme involved in heme synthesis at the initial stage. Second, the excess of heme has a positive effect on globin biosyntheses (Ponka, 1997). The number of transferrin receptors on the surface of an immature erythrocyte reaches approximately 10^4 per cell, whereas these receptors are initially absent in the progenitor cell (Figure, c).

The rate of hemoglobin synthesis several hours after the beginning of erythropoietin effect equals approximately 5×10^6 molecules/h; maximum (8×10^6) is observed at 31 hours; in ten hours after the genes are switching off, approximately 10^6 molecules/h. Note that after 25 hours, the rate of synthesis demonstrates oscillating dynamics. An erythrocyte contains about 280 million molecules of hemoglobin on cessation of its synthesis at 74 hours (Figure, d).



Анализ влияния мутаций на генную сеть регуляции дифференцировки эритроидной клетки

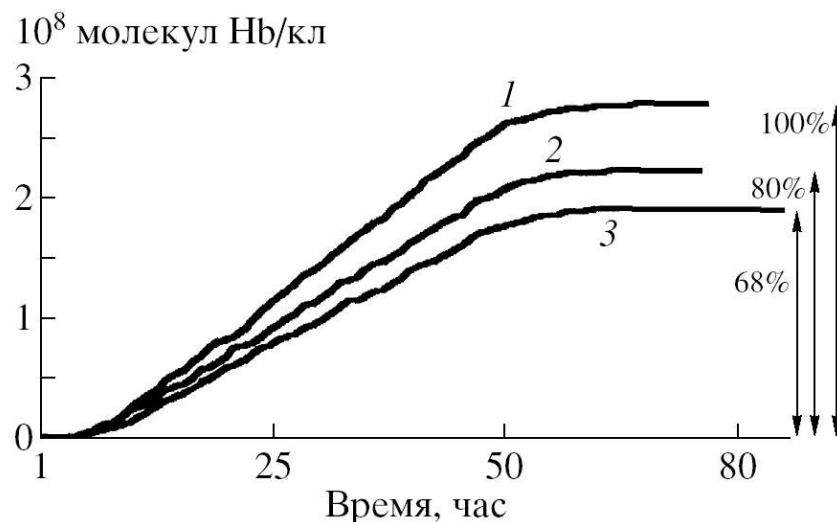
Сравнение динамики синтеза гемоглобина при нормальном (1) и мутантных (2,3) типах системы дифференцировки эритроидной клетки (расчет по модели).

2 – мутация гена **EKLF** (прекращения синтеза транскрипционного фактора **EKLF**);

3 – мутация гена **GATA-1** (снижение активности транскрипционного фактора **GATA-1** на 30%).

Hb – гемоглобин.

По оси **X** – время в часах, по оси **Y** – число молекул на клетку ($1 = 10^8$ молекул).



Таким образом, посредством математического моделирования и анализа верифицированных моделей для определенных характеристик системы можно определить лимитирующие (ключевые) факторы.

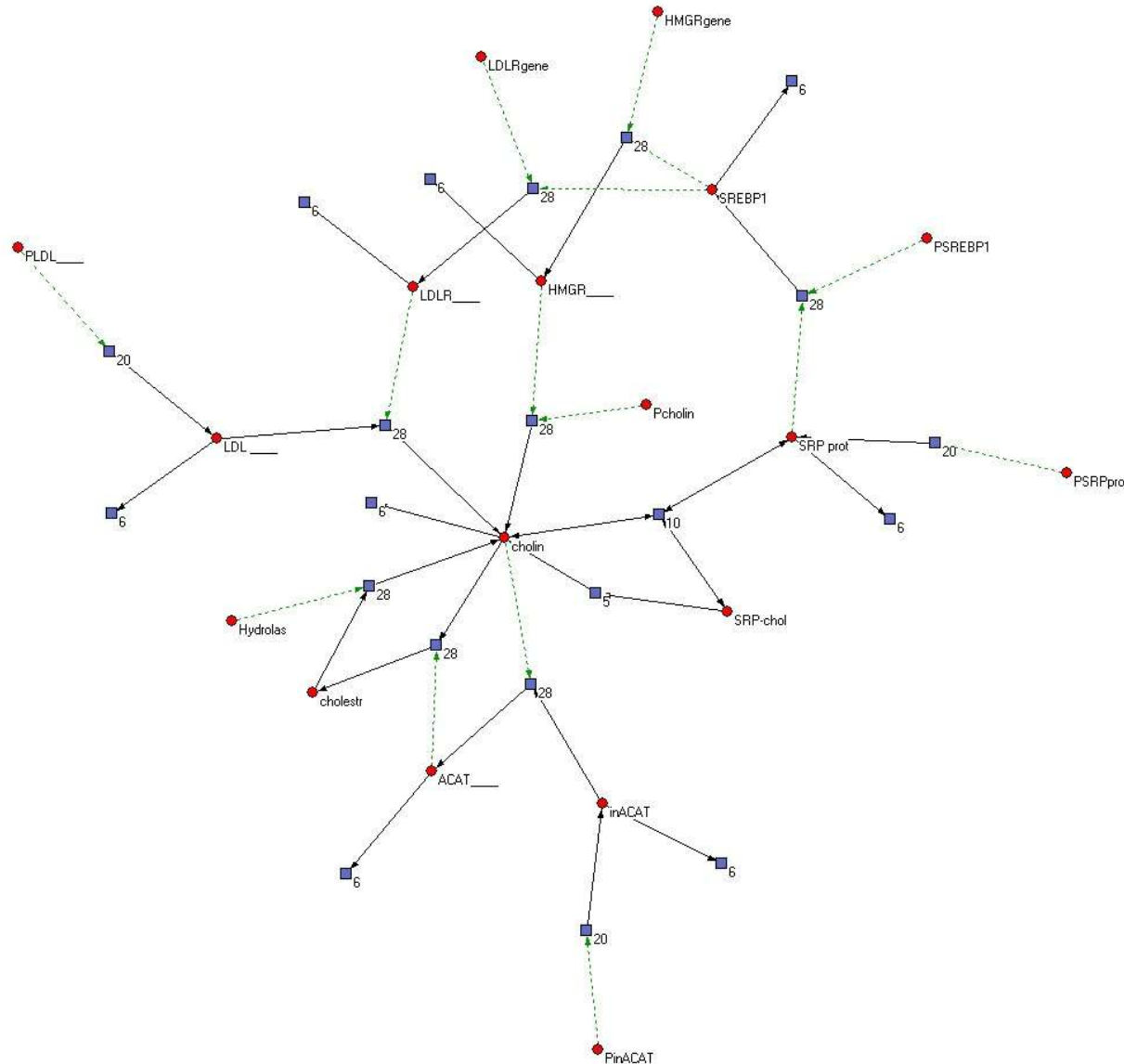
Например, сравнительный анализ мутаций и приведенных для них выше кривых показывает, что роль гена **GATA-1** в биосинтезе гемоглобина в эритроидной клетке важнее роли гена **EKLF**, т.е. экспрессия гена **GATA-1** в данном случае является лимитирующим процессом.



Математическая модель генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке



*Двудольный граф
проективной модели генной
сети регуляции биосинтеза
холестерина в клетке*



- - 10 динамических переменных
- - 21 процесс

- - участие в процессе с ненулевой стехиометрией
- - - → - участие в процессе с нулевой стехиометрией
- 1 - конститутивный синтез
- 2 - утилизация, либо деградация
- 3 - мономолекулярная реакция
- 4 - бимолекулярная реакция
- 5 - обобщенная реакция Михаэлиса-Ментен



Нормированная система дифференциальных уравнений: математическая модель биосинтеза холестерина в клетке



$$w'_1 = f_1 = T(-a_9 w_1 + \hat{A}1); A1 = \frac{a_{15} a_{38} V_6}{a_{16} + a_{38} + V_6};$$

$$w'_1 = f_1 = T(-a_9 w_1 + \hat{A}1); A1 = \frac{a_{15} a_{38} V_6}{a_{16} + a_{38} + V_6};$$

$$w'_3 = f_3 = T(-a_{14} w_3 - a_{18} V_6^0 w_3 w_6 + (a_{19} + a_{20}) \frac{V_7^0}{V_3^0} w_7 + \sum_{i=1, i \neq 3}^4 \hat{A}3_i - \hat{A}3_3);$$

$$A3_1 = \frac{a_3 a_{32} V_2}{a_4 + a_{32} + V_2}; A3_2 = \frac{c_1 a_7 V_4 V_5}{a_8 + V_4 + V_5}; A3_3 = \frac{a_{24} V_3 V_9}{a_{25} + V_3 + V_9}; A3_4 = \frac{a_{26} a_{39} V_{10}}{a_{27} + a_{39} + V_{10}};$$

$$w'_4 = f_4 = T(-a_{12} w_4 + \hat{A}4); A4 = \frac{a_5 a_{37} V_1}{a_6 + a_{37} + V_1};$$

$$w'_5 = f_5 = T(-a_{11} w_5 + \frac{a_{10} a_{33}}{V_5^0} - \hat{A}5); A5 = \frac{a_7 V_4 V_5}{a_8 + V_4 + V_5};$$

$$w'_6 = f_6 = T(-a_{21} w_6 + \frac{a_{19} V_7^0}{V_6^0} w_7 - a_{18} V_3^0 w_3 w_6 + \frac{a_{17} a_{35}}{V_6^0});$$

$$w'_7 = f_7 = T(-(a_{19} + a_{20}) w_7 + \frac{a_{18} V_3^0 V_6^0}{V_7^0} w_3 w_6);$$

$$w'_8 = f_8 = T(-a_{29} w_8 + \frac{a_{28} a_{34}}{V_8^0} - \hat{A}8); A8 = \frac{a_{22} V_3 V_8}{a_{23} + V_3 + V_8};$$

$$w'_9 = f_9 = T(-a_{30} V_9 + \hat{A}9_1); A9_1 = A8_1;$$

$$w'_{10} = f_{10} = T(-a_{31} w_{10} + \hat{A}10_1 - \hat{A}10_2); A10_1 = A3_3; A10_2 = A3_4;$$

Принятые обозначения:

$\{a_j^0, V_i^0\}; i = \overline{1,10}; j = \overline{1,39}$; - некоторая стационарная точка

$a_j = a_j^0 p_j; V_i = V_i^0 w_i; \hat{A}I = AI/V_i^0$

$T = 1 \text{ сек}$ - характерное время



Динамические переменные:

математическая модель биосинтеза холестерина в клетке

- V_1 - концентрация транскрипционного фактора SREBP (белка, связывающего стерол регулируемый элемент);
- V_2 - концентрация фермента 3-гидроксиметилглутарил кофермент-А (HMG-CoA) редуктазы (EC 1.1.1.34);
- V_3 - концентрация свободного холестерина;
- V_4 - концентрация рецепторов липопротеинов низкой плотности (ЛНП);
- V_5 - концентрация ЛНП;
- V_6 - концентрация доступного фермента SRP (стерол регулируемая протеаза);
- V_7 - концентрация недоступного фермента SRP;
- V_8 - концентрация неактивного фермента ацил кофермент-А холестерин ацилтрансферазы (ACAT; EC 2.3.1.26);
- V_9 - концентрация активного фермента ACAT;
- V_{10} - концентрация эфиров холестерина.





Матрица чувствительности :

математическая модель биосинтеза холестерина в клетке

Предполагается, что при малых изменениях параметров моделей вблизи стационарных состояний система описывается линеаризованными уравнениями. Исследование свойств системы, в данном случае, сводятся к задачам линейного и квадратичного программирования, формализация которых может быть осуществлена с использованием матрицы чувствительности, т.е. матрицы коэффициентов влияния вариаций параметров математической модели на вариации стационарных состояний динамических переменных системы.

Матрица чувствительности может быть построена в любой стационарной точке. Пусть для определенности рассматривается базовая точка $\alpha = \mathbf{1}$, $\mathbf{w} = \mathbf{1}$

Для исходных уравнений в стационарной точке в обобщенном виде

$$\varphi(\mathbf{w}, \alpha) = \mathbf{0}, \quad \varphi = \{\varphi_i, i = \overline{1, n}\}, \quad \mathbf{w} = \{w_i, i = \overline{1, n}\}, \quad \alpha = \{\alpha_j, j = \overline{1, m}\}$$

уравнения в вариациях

$$\mathbf{J} \cdot \mathbf{x} = \mathbf{b} = -\mathbf{C} \cdot \mathbf{p}, \quad \mathbf{x} = \delta \mathbf{w}, \quad \mathbf{p} = \delta \alpha, \quad \mathbf{J} = \frac{\partial \varphi}{\partial \mathbf{w}}, \quad \mathbf{C} = \frac{\partial \varphi}{\partial \alpha}.$$

имеют решение:

$$\mathbf{x} = \mathbf{D} \cdot \mathbf{p}, \quad \mathbf{D} = \mathbf{J}^{-1} \cdot \mathbf{C} = \{\gamma_{ij}\}; \quad \gamma_{ij} = \frac{x_i}{p_j}$$

где \mathbf{D} – искомая матрица чувствительности.



Матрица чувствительности :

математическая модель биосинтеза холестерина в клетке

N*	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*
1*	-1.04E+00*	0.902E+00*	0.104E+00*	-9.90E-01*	0.490E-01*	-1.04E+00*	0.616E-08*	-1.52E-02*	0.156E-02*	0.904E-01*
2*	0.979E-01*	-8.52E+00*	-9.79E-01*	0.925E-01*	-4.63E-01*	0.979E-01*	-5.81E-08*	0.143E-02*	-1.47E-02*	-8.54E-01*
3*	-1.04E+00*	-9.80E-01*	0.104E+00*	-9.80E-01*	0.490E-01*	-1.04E+00*	0.616E-08*	-1.52E-02*	0.156E-02*	0.905E-01*
4*	0.103E+00*	0.970E-01*	-1.03E+00*	0.970E-01*	-4.85E-01*	0.103E+00*	-6.10E-08*	0.150E-02*	-1.55E-02*	-8.95E-01*
5*	-2.71E+00*	-2.56E+00*	0.271E+00*	0.744E+00*	-3.72E+00*	-2.71E+00*	0.161E-07*	-3.96E-02*	0.408E-02*	0.237E+00*
6*	0.256E+00*	0.242E+00*	-2.56E+00*	-7.02E+00*	0.351E+00*	0.256E+00*	-1.52E-07*	0.374E-02*	-3.85E-02*	-2.23E+00*
7*	-2.71E+00*	-2.56E+00*	0.271E+00*	-2.56E+00*	-3.72E+00*	-2.71E+00*	0.161E-07*	-3.96E-02*	0.408E-02*	0.237E+00*
8*	0.271E+00*	0.256E+00*	-2.71E+00*	0.256E+00*	0.372E+00*	0.271E+00*	-1.61E-07*	0.396E-02*	-4.08E-02*	-2.36E+00*
9*	-6.46E+00*	-6.10E+00*	0.354E+00*	-6.10E+00*	0.305E+00*	-6.46E+00*	-2.10E-07*	0.518E-02*	-5.33E-02*	0.309E+00*
10*	0.604E+02*	-5.71E+02*	0.604E+02*	-5.71E+02*	0.140E+03*	-6.04E+02*	0.359E-05*	-8.82E+00*	0.909E+00*	0.527E+02*
11*	0.271E+00*	0.256E+00*	-2.71E+00*	0.256E+00*	-6.28E+00*	0.271E+00*	-1.61E-07*	0.396E-02*	-4.08E-02*	-2.36E+00*
12*	0.271E+00*	0.256E+00*	-2.71E+00*	-7.44E+00*	0.372E+00*	0.271E+00*	-1.61E-07*	0.396E-02*	-4.08E-02*	-2.37E+00*
13*	0.104E+00*	-9.02E+00*	-1.04E+00*	0.980E-01*	-4.90E-01*	0.104E+00*	-6.16E-08*	0.152E-02*	-1.56E-02*	-9.04E-01*
14*	0.643E+00*	0.608E+00*	-6.43E+00*	0.608E+00*	-3.04E+00*	0.643E+00*	-3.82E-07*	0.939E-02*	-9.68E-02*	-5.61E+00*
15*	0.646E+00*	0.610E+00*	0.354E+00*	0.610E+00*	-3.05E+00*	-3.54E+00*	0.210E-07*	-5.18E-02*	0.533E-02*	0.309E+00*
16*	-6.46E+00*	-6.10E+00*	-3.54E+00*	-6.10E+00*	0.305E+00*	0.354E+00*	-2.10E-07*	0.518E-02*	-5.33E-02*	-3.09E+00*
17*	0.646E+00*	0.610E+00*	0.354E+00*	0.610E+00*	-3.05E+00*	0.646E+00*	0.100E+01*	-5.18E-02*	0.533E-02*	0.309E+00*
18*	-6.46E+00*	-6.10E+00*	-3.54E+00*	-6.10E+00*	0.305E+00*	-6.46E+00*	0.309E-07*	0.518E-02*	-5.33E-02*	-3.09E+00*
19*	0.645E+00*	0.610E+00*	0.354E+00*	0.610E+00*	-3.05E+00*	0.645E+00*	-3.09E-07*	-5.17E-02*	0.533E-02*	0.309E+00*
20*	-6.45E+00*	-6.10E+00*	-3.54E+00*	-6.10E+00*	0.305E+00*	-6.45E+00*	0.100E+01*	0.517E-02*	-5.33E-02*	-3.09E+00*
21*	-3.83E-07*	-3.62E-07*	-2.10E-07*	-3.62E-07*	0.181E-07*	-3.83E-07*	-5.54E-07*	0.307E-09*	-3.17E-09*	-1.83E-07*
22*	0.166E-02*	0.157E-02*	-1.66E-02*	0.157E-02*	-7.83E-03*	0.166E-02*	-9.84E-10*	-5.00E+00*	0.515E+00*	0.512E+00*
23*	-4.78E-08*	-4.51E-08*	0.478E-08*	-4.51E-08*	0.226E-08*	-4.78E-08*	0.284E-15*	0.144E-05*	-1.48E-05*	-1.47E-05*
24*	0.323E-02*	0.306E-02*	-3.23E-02*	0.306E-02*	-1.53E-02*	0.323E-02*	-1.92E-09*	0.473E-04*	-4.87E-04*	0.998E+00*
25*	-2.76E-02*	-2.60E-02*	0.276E-02*	-2.60E-02*	0.130E-02*	-2.76E-02*	0.164E-09*	-4.03E-04*	0.415E-04*	-8.50E+00*
26*	-3.20E-02*	-3.02E-02*	0.320E-02*	-3.02E-02*	0.151E-02*	-3.20E-02*	0.190E-09*	-4.67E-04*	0.481E-04*	-9.86E+00*
27*	0.319E-02*	0.302E-02*	-3.19E-02*	0.302E-02*	-1.51E-02*	0.319E-02*	-1.89E-09*	0.466E-04*	-4.80E-04*	0.985E+00*
28*	0.317E-02*	0.300E-02*	-3.17E-02*	0.300E-02*	-1.50E-02*	0.317E-02*	-1.88E-09*	0.101E+01*	0.985E+00*	0.979E+00*
29*	-1.61E-02*	-1.52E-02*	0.161E-02*	-1.52E-02*	0.761E-03*	-1.61E-02*	0.956E-10*	-5.15E+00*	-5.88E+00*	-4.97E+00*
30*	-3.22E-02*	-3.04E-02*	0.322E-02*	-3.04E-02*	0.152E-02*	-3.22E-02*	0.191E-09*	-4.71E-04*	-1.00E+01*	-9.94E+00*
31*	0.319E-02*	0.302E-02*	-3.19E-02*	0.302E-02*	-1.51E-02*	0.319E-02*	-1.90E-09*	0.467E-04*	-4.81E-04*	-1.48E-01*
32*	-1.83E+00*	-9.71E-01*	0.183E+00*	-9.71E-01*	0.485E-01*	-1.83E+00*	0.610E-08*	-1.50E-02*	0.155E-02*	0.898E-01*
33*	0.604E+02*	-5.71E+02*	0.604E+02*	-5.71E+02*	0.140E+03*	-6.04E+02*	0.359E-05*	-8.82E+00*	0.909E+00*	0.527E+02*
34*	0.317E-02*	0.300E-02*	-3.17E-02*	0.300E-02*	-1.50E-02*	0.317E-02*	-1.88E-09*	0.101E+01*	0.985E+00*	0.979E+00*
35*	0.646E+00*	0.610E+00*	0.354E+00*	0.610E+00*	-3.05E+00*	0.646E+00*	0.100E+01*	-5.18E-02*	0.533E-02*	0.309E+00*
36*	-1.04E+00*	0.901E+00*	0.104E+00*	-9.79E-01*	0.490E-01*	-1.04E+00*	0.616E-08*	-1.52E-02*	0.156E-02*	0.903E-01*
37*	-2.71E+00*	-2.56E+00*	0.271E+00*	0.743E+00*	-3.72E+00*	-2.71E+00*	0.161E-07*	-3.96E-02*	0.408E-02*	0.236E+00*
38*	0.646E+00*	0.610E+00*	0.354E+00*	0.610E+00*	-3.05E+00*	-3.54E+00*	0.210E-07*	-5.18E-02*	0.533E-02*	0.309E+00*
39*	-3.08E-02*	-2.91E-02*	0.308E-02*	-2.91E-02*	0.146E-02*	-3.08E-02*	0.183E-09*	-4.50E-04*	0.464E-04*	-9.86E+00*

константа скорости поступления ЛНП в плазму крови

концентрация предшественника ЛНП



Матрица чувствительности :

математическая модель биосинтеза холестерина в клетке



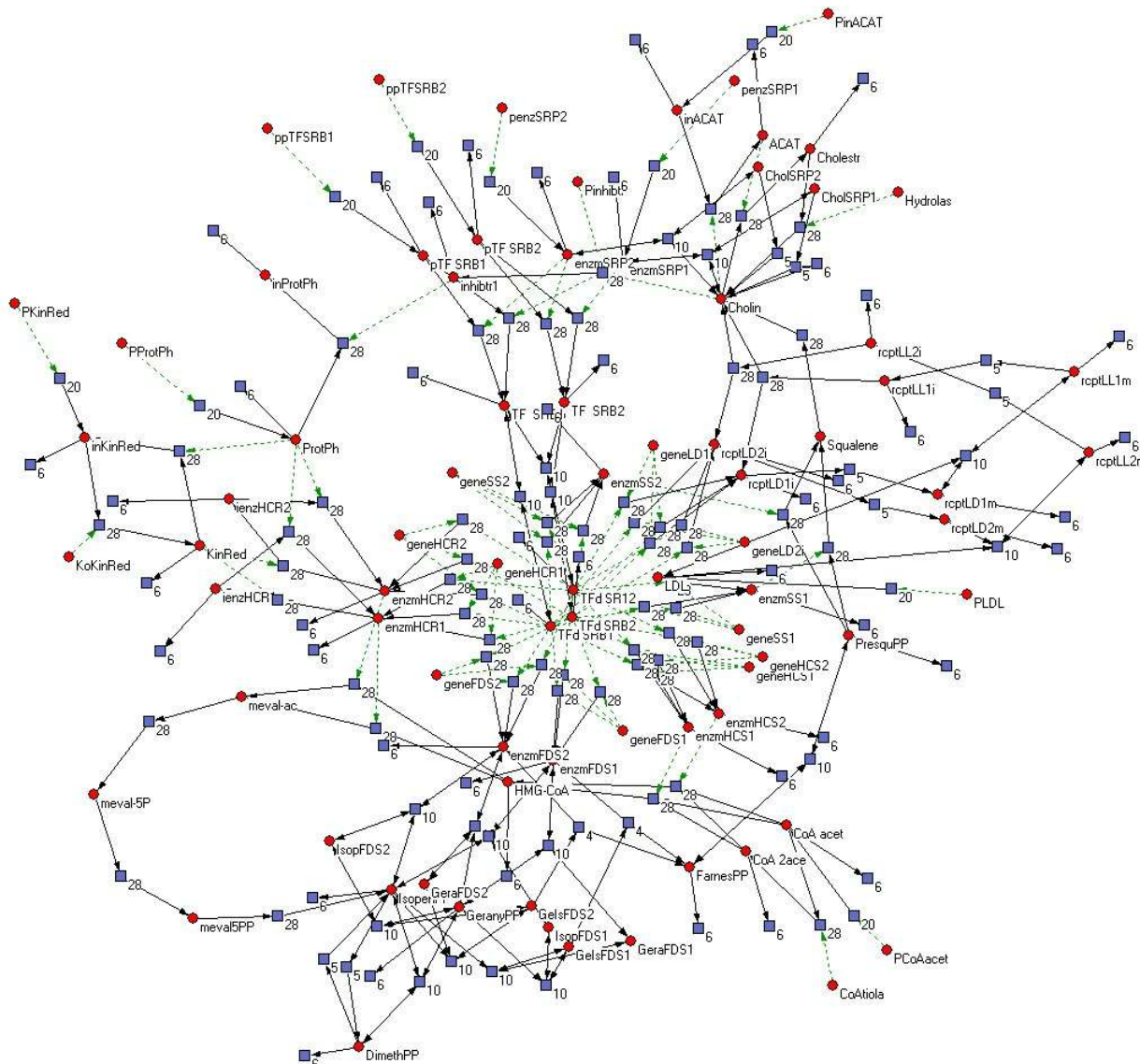
Анализ матрицы чувствительности дает информацию о лимитирующих звеньях в моделируемой системе вблизи своего стационарного состояния.

Из проведенного анализа можно сделать вывод, что в зависимости от решаемой задачи мы можем уже по матрице чувствительности делать предварительные выводы о некоторых возможностях управления системой.



Математические модели генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке

Двудольный граф
компьютерной модели
диплоидной генной сети
регуляции биосинтеза
холестерина в клетке



● - 57 динамических переменных

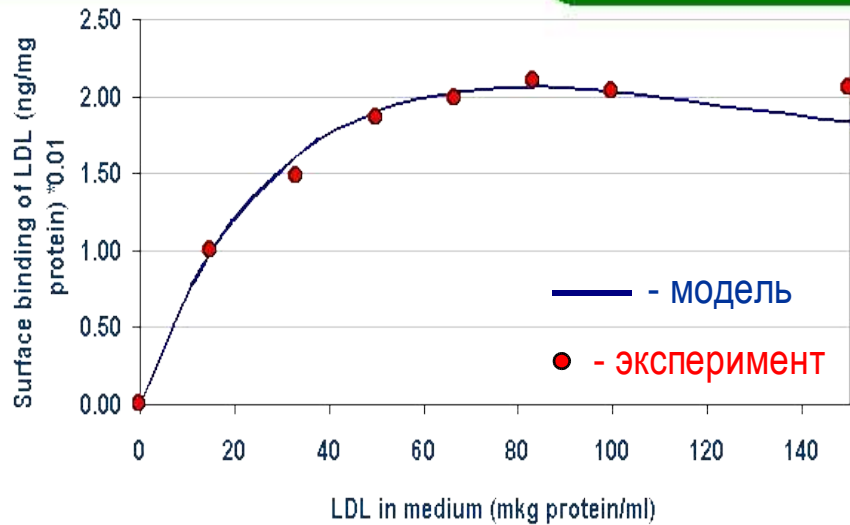
■ - 139 процессов

→ - участие в процессе с ненулевой стехиометрией
- - - - - участие в процессе с нулевой стехиометрией

- 1 - конститутивный синтез
- 2 - утилизация, либо деградация
- 3 - мономолекулярная реакция
- 4 - бимолекулярная реакция
- 5 - обобщенная реакция Михаэлиса-Ментен

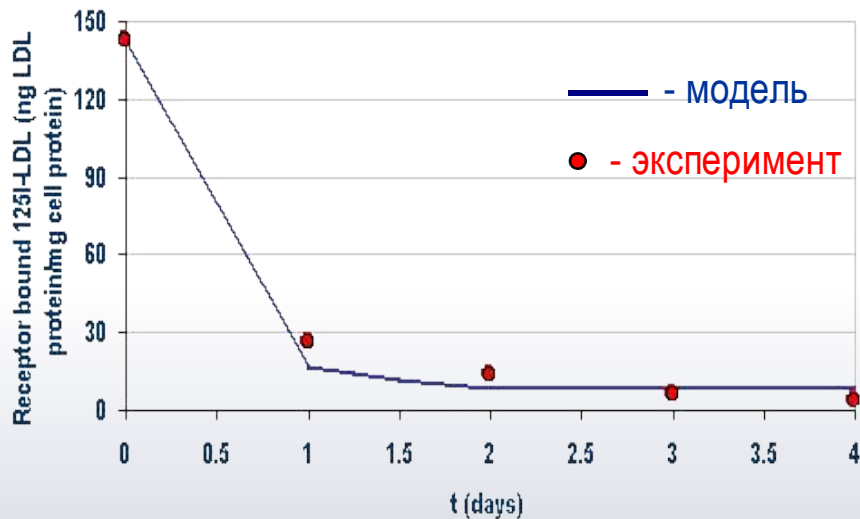


Верификация параметров моделей генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке



Связывание ЛНП на поверхности клетки

Experiment conditions: Monolayers of cells were grown in the lipoprotein-deficient serum (LPDS) for 2 days and then were incubated in the medium containing the indicated concentration of ^{125}I -LDL at 37°C . After 5 hr, the amount of ^{125}I -LDL bound to the cell was measured.

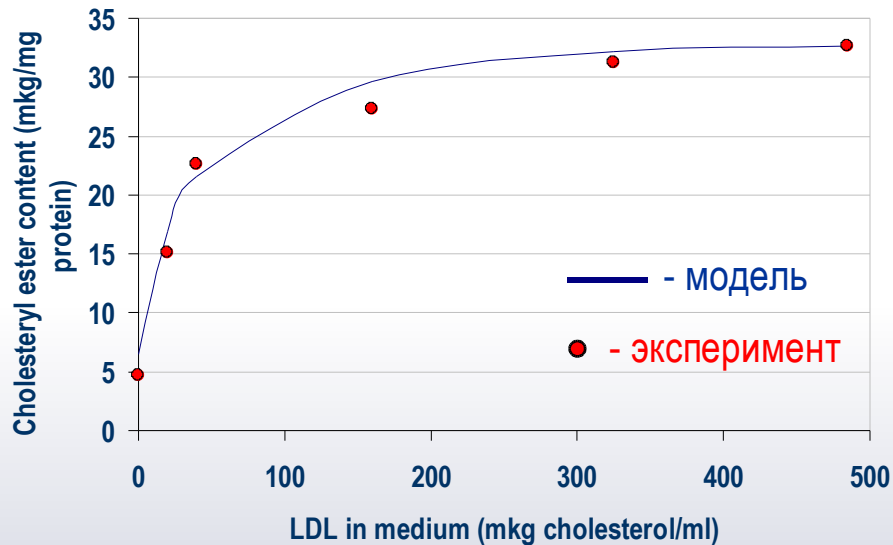
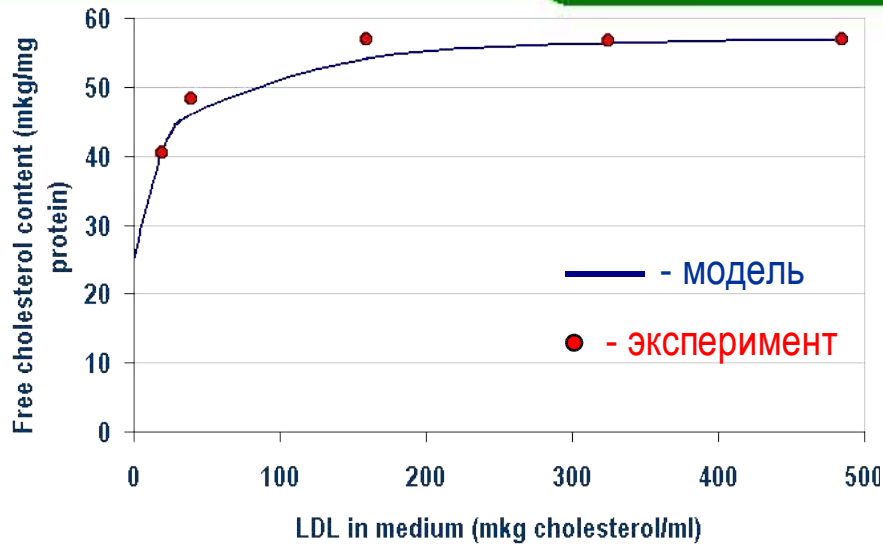


Подавление синтеза рецепторов ЛНП

Experiment conditions: Monolayers of cells were grown in LPDS for 3 days. On day 4 of cell growth (zero time). Each dish of nonconfluent cells received 2 ml of growth medium containing $10\ \mu\text{g}$ protein/ml of unlabeled LDL. At the indicated time, the medium was replaced with 2 ml of medium containing $25\ \mu\text{g}$ protein/ml of ^{125}I -LDL. After incubation at 37°C for 2 hr, the specific heparin releasable ^{125}I radioactivity was determined.



Верификация параметров моделей генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке



Действие возрастания концентрации ЛНП в среде на содержание свободного холестерина и его эфиров в нормальных фибробластах человека

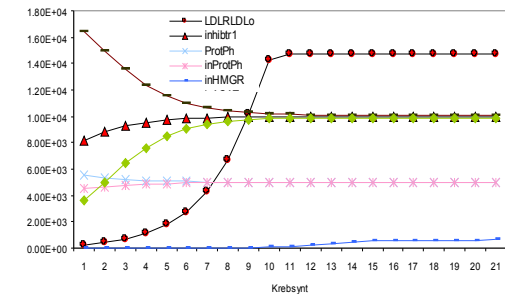
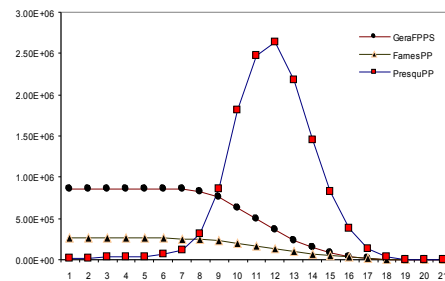
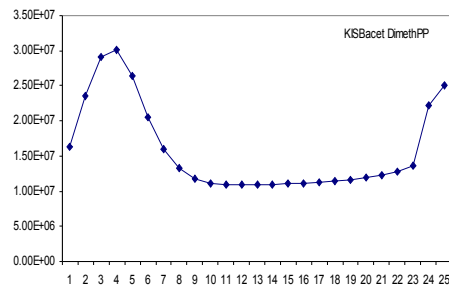
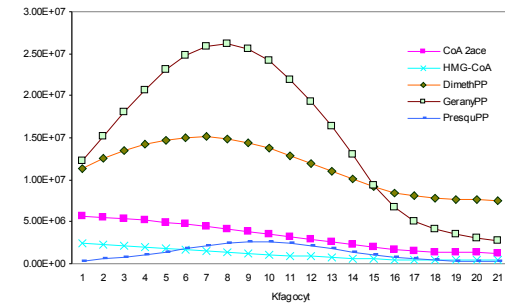
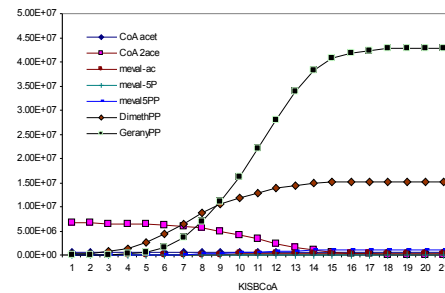
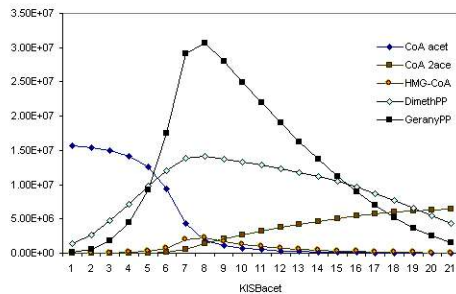
Experiment conditions: The cells were incubated in fresh growth medium containing 10% fetal calf serum. After 3 days, the medium was replaced with 2 ml of fresh growth medium containing 5% human LPDS. After 24 hr, the medium was replaced with 2 ml of fresh growth medium containing 5% human LPDS and indicated concentration of LDL. After 24 hr, each cell monolayer was washed and harvested and the sterols content were measured.



Анализ мутационного портрета генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке

Для более полного исследования влияния мутаций на систему, с целью выявления ключевых процессов генной сети и анализа поведения биологической системы в разных патологических ситуациях, необходимо проводить исследование мутаций по всем звеньям генной сети с разной степенью выраженности.

“Мутационный портрет” генной сети – набор ее стационарных состояний и динамических характеристик, полученный при “мутационном” варьировании в заданных границах скоростей протекания каждого элементарного процесса генной сети.

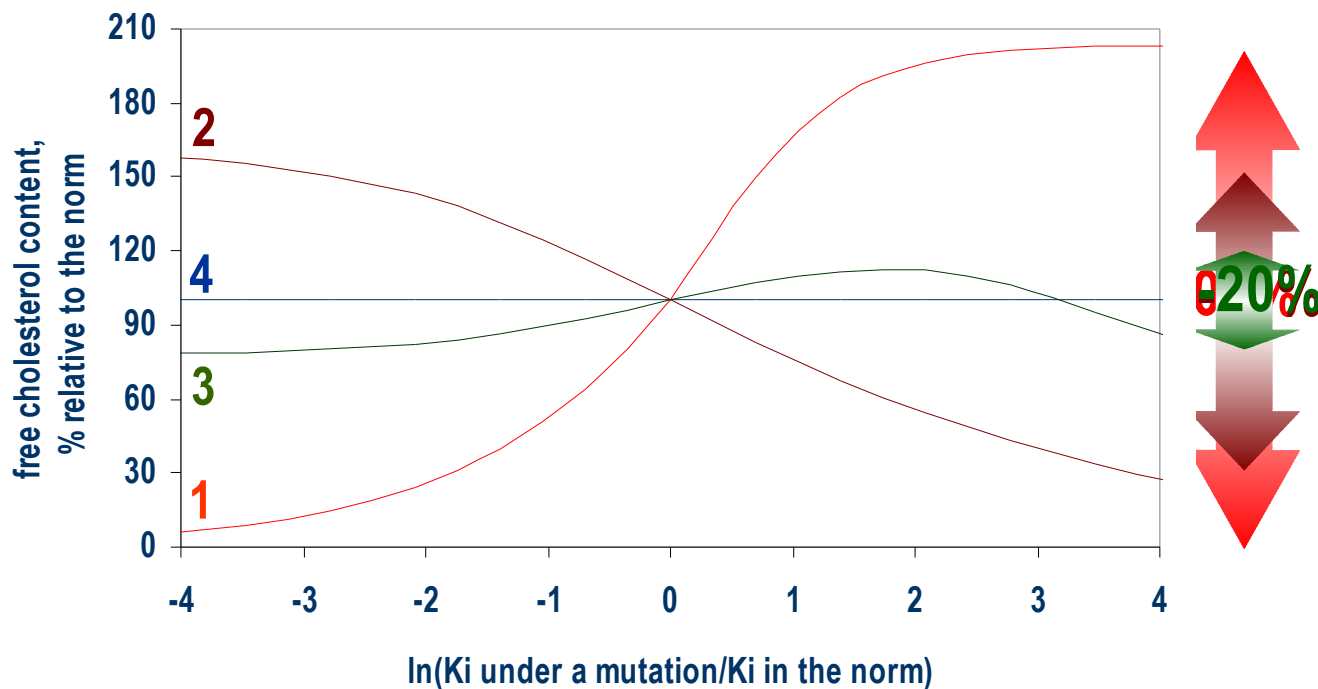


Исследовалось влияние одиночных мутаций разной интенсивности по всем параметрам модели. Проведено ~2000 расчетов



Анализ мутационного портрета генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке

Изменение содержания свободного холестерина в клетке в зависимости от мутационного изменения констант элементарных процессов в генной сети биосинтеза холестерина



(1) Константа оборота фермента SRP;

(2) Константа обратной реакции димеризации SREBP1;

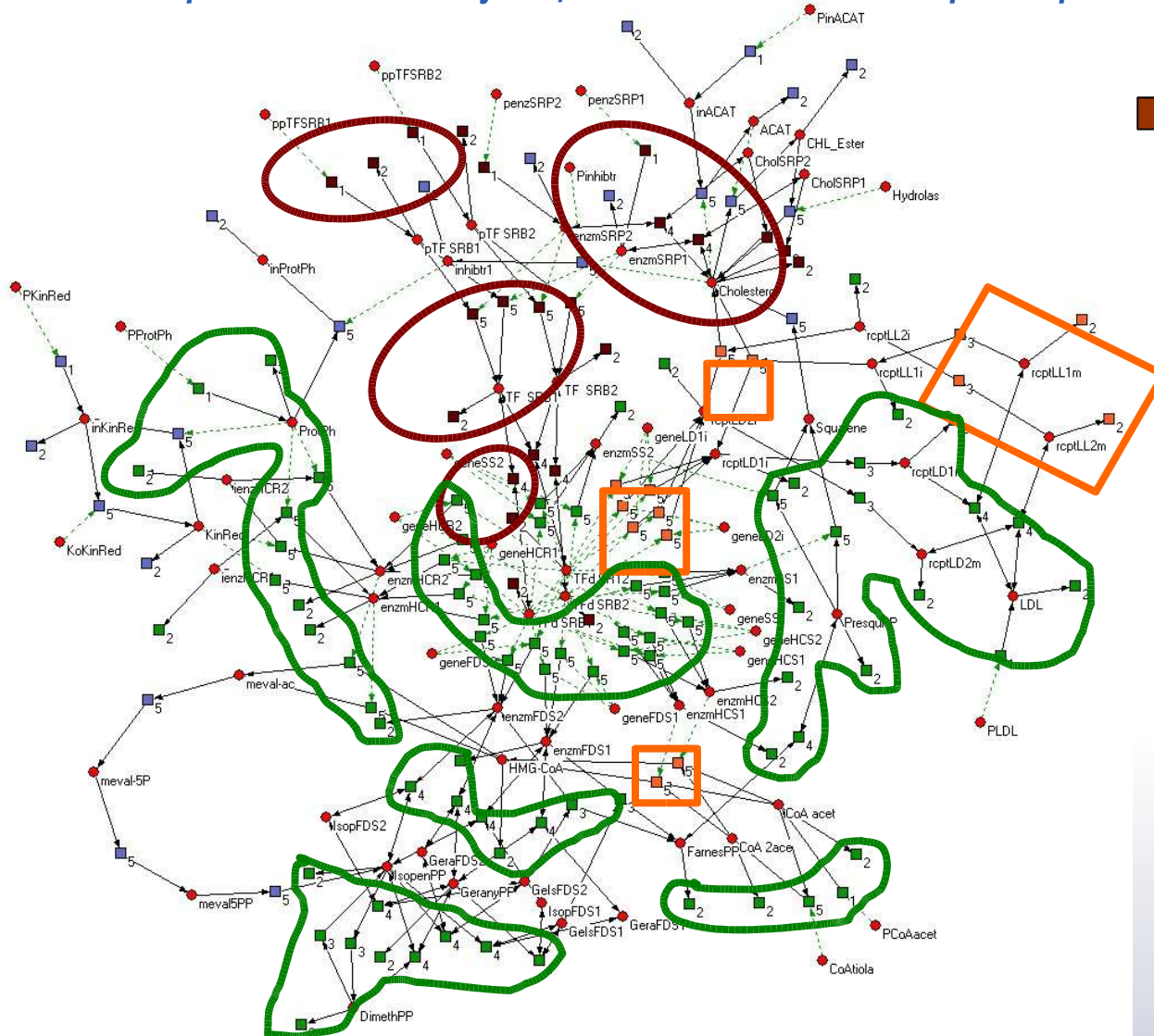
(3) Константа Михаэлиса-Ментен фермента ацетоацетил КоА тиолазы;

(4) Константа оборота фермента АХАТ (ацил-КоА: холестерин ацилтрансфераза)



Анализ мутационного портрета геной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке

Генная сеть с указанием чувствительности стационарного содержания свободного холестерина в клетке к мутационным изменениям параметров



- - изменение скоростей данных процессов в значительной степени сказывается на стационарной концентрации холестерина, которая может меняться от 0 до более чем 200% относительно нормы;
- - стационарная концентрация холестерина меняется не более чем на 35% от нормы;
- - стационарная концентрация холестерина меняется не более чем на 25% от нормы.



Анализ мутационного портрета геной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке



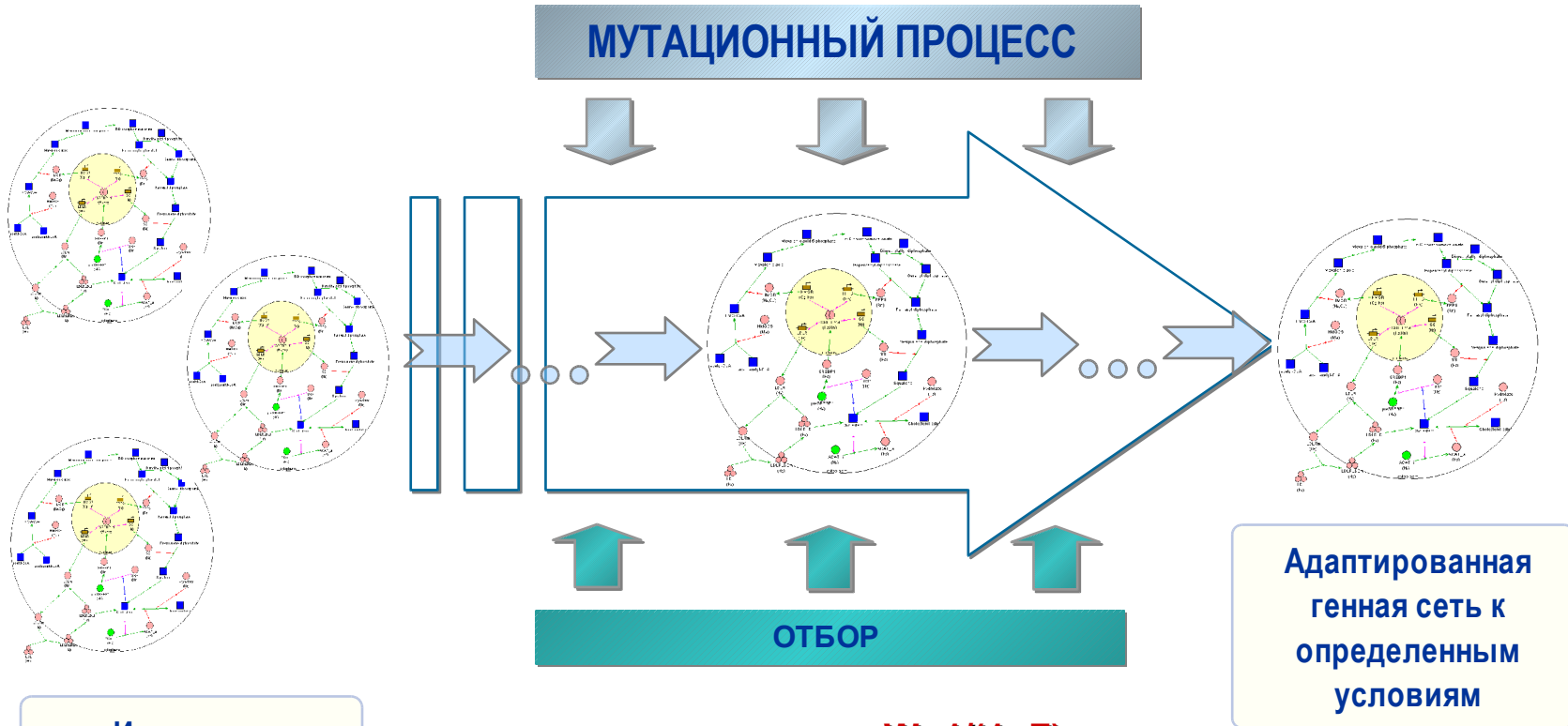
Характеристика мутационного спектра геной сети регуляции биосинтеза холестерина в клетке

Тип мутации	Доля процессов, затрагиваемая данным типом мутации
повреждающие	~15%
слабоповреждающие	~45%
нейтральные	~40%

- (i) Наличие нелимитирующих стадий в биохимических путях рассматриваемой сети.
- (iii) Наличие двух процессов, ответственных за появление дополнительных количеств холестерина в клетке: (а) собственный биосинтез холестерина в клетке и (б) его транспорт из плазмы крови в клетку посредством ЛНП рецепторов.
- (v) Возможное шунтирование некоторых биохимических реакций в пути биосинтеза холестерина.
- (vii) Регуляция внутриклеточной концентрации холестерина по механизму отрицательной обратной связи.



Моделирование эволюции геной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке



Исходная популяция геной сетей

Оптимизируемый функционал: $W=1/(1+F)$, где W – приспособленность организма к определенным условиям внешней среды;

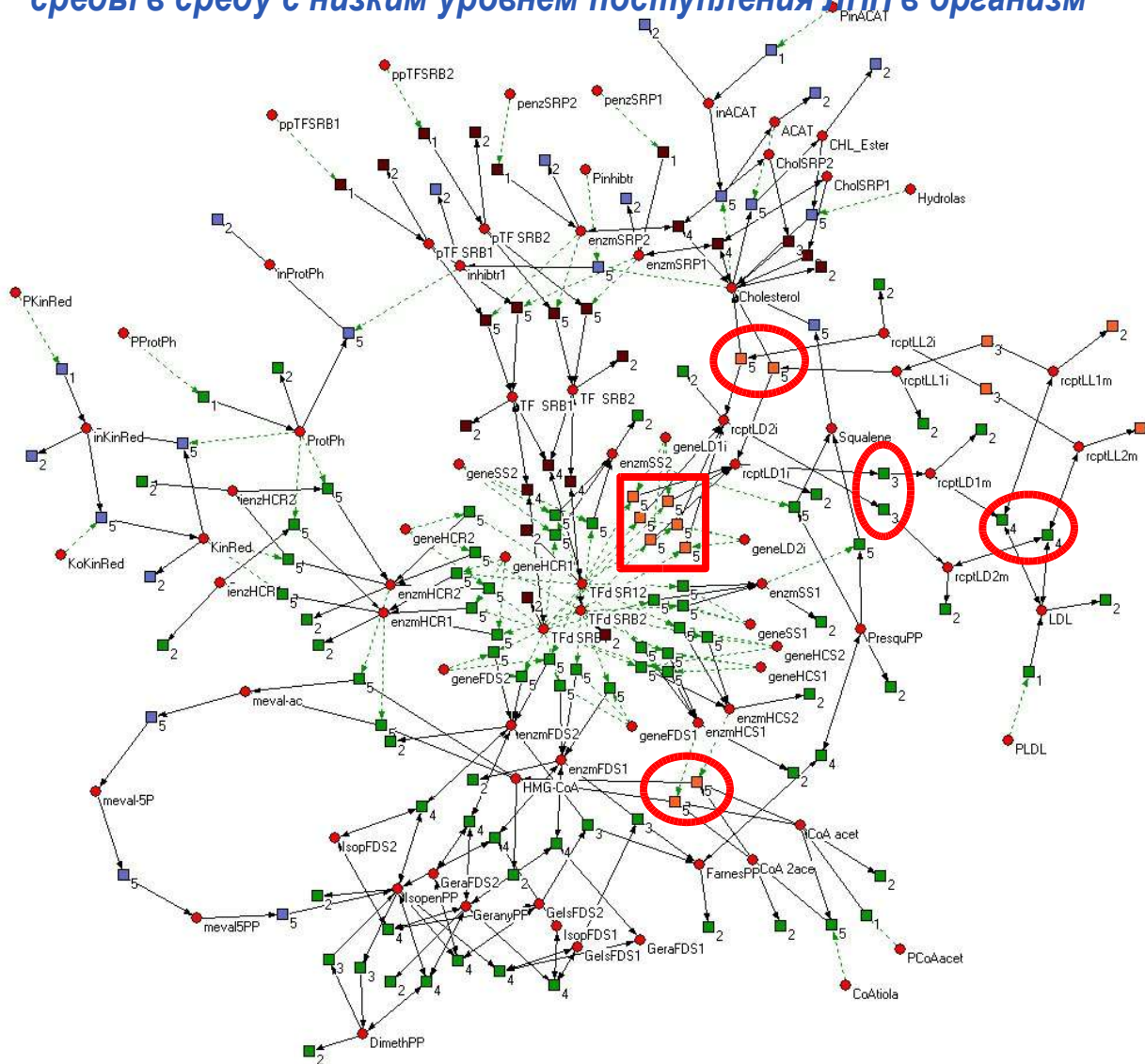
F – мера отклонения рассчитываемых характеристик от заданных

$$F(k_1, \dots, k_m) = \sum_{i,j(i)} \left[\frac{X_{\text{экс.}}^{ij}}{X_{\text{теор.}(k_1 \dots k_m)}^i} + \frac{X_{\text{теор.}(k_1 \dots k_m)}^{ij}}{X_{\text{экс.}}^{ij}} - 2 \right]$$



Моделирование эволюции генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке

Моделирование эволюции генной сети при переходе из нормальной среды в среду с низким уровнем поступления ДНП в организм



$$W_N = 1$$

Изменение условий среды

$$V_{L1} = V_N / 2$$

$$W_{L1} \sim 0.004$$

адаптация

Оптимизировался функционал, построенный на основе экспериментальных данных по нормальным фибробластам человека из работ [Goldshtein *et al.*, 1975, Goldshtein *et al.*, 1977, Brown *et al.*, 1979]

$$W_{L1} \sim 0.75$$

Изменение условий среды

$$V_{L2} = V_{L1} / 2$$

$$W_{L2} \sim 0.002$$

адаптация

$$W_{L2} \sim 0.54$$



Заключение

- Понятие лимитирующего фактора применимо практически к любой биологической системе. В молекулярно-генетических системах под лимитирующими факторами, прежде всего, понимаются ключевые факторы, определяющие поведение определенной характеристики системы (скорость синтеза определенного вещества, приспособленность организма и т.д.)
- Поиск и анализ лимитирующих факторов в генных сетях, определяющих поведение различных характеристик системы, нахождение способов воздействия на них и т.д., являются ключевыми в теории управления биологическими системами на молекулярном уровне.
- Особую ценность результаты исследования лимитирующего факторов представляют для выявления мишеней фармакологической регуляции в генных сетях. Действительно, величины констант реакций любой генной сети могут быть в рамках современной фармакологии изменены путем введения высокоспецифичных активаторов или ингибиторов, действующих на определенные элементарные события в генных сетях.
- На этой основе анализа воздействия различных мутаций и выявления ключевых процессов в генных сетях как объекта регуляции могут создаваться стратегии коррекции патологических состояний организма с учетом его генотип-специфических особенностей.