

Лекция 2

Слайд 1

Название лекции

Математическое моделирование динамики молекулярно-генетических систем

Слайд 2

Цели лекции

- Рассмотреть математические модели конкретных генных сетей:
 - генная сеть, контролирующая гомеостаз холестерина в клетке (отрицательные обратные связи)
 - генная сеть регуляции дифференцировки эритроидной клетки (положительные обратные связи)
- Построение математических моделей, возникновение различных моделей одной и той же биологической системы
- Проблемы математического моделирования генных сетей
- Верификация параметров математических моделей генных сетей (решение обратной задачи)
- Моделирование динамики генных сетей при разнообразных воздействиях на них в норме и при различных мутациях
- Исследование «мутационных портретов» генных сетей
- Моделирование и анализ эволюции генных сетей
- Применение математических моделей генных сетей на практике и для исследования фундаментальных проблем

Слайд 3

На данном слайде приведена генная сеть, контролирующая внутриклеточный гомеостаз холестерина, представленная в базе данных GeneNet (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/systems/mgl/genenet/>).

Гомеостаз холестерина в клетках позвоночных преимущественно регулируется двумя мембрансвязанными транскрипционными факторами (ТФ): sterol regulatory element-binding proteins (SREBP)-1a и -2. SREBP активируют экспрессию многих генов, продукты которых участвуют в биосинтезе холестерина и его транспорте в клетку из плазмы крови в составе липопротеинов [Horton et al., 2002, 2003]. Образование активной формы ТФ SREBP напрямую зависит от содержания холестерина в клетке. Чувствительным к внутриклеточному содержанию холестерина звеном в данной генной сети, за счет которого реализуется отрицательная обратная связь, ответственная за поддержание гомеостаза холестерина в клетках позвоночных, является транспорт комплекса cleavage activating protein (SCAP)–SREBP из эндоплазматического ретикула (ЭР) в аппарат Гольджи (АГ). В АГ происходит последовательный двухэтапный протеолиз SCAP–SREB комплекса посредством 2 протеаз (Site-1 и Site-2) и высвобождение активной формы SREBP, которая проникает в ядро клетки, специфически связывается со стерол-регуляторными элементами (SRE) генов, кодирующих ферменты пути биосинтеза холестерина, рецепторы липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и др., тем самым координировано активируя их транскрипцию. Ключевым этапом, определяющим транспорт SCAP–SREBP комплекса из ЭР в АГ, является конформационное изменение белка SCAP. При высоком содержании холестерина в клетке конформация SCAP позволяет комплексу SCAP–SREBP связываться в ЭР с мембранфиксирующим белком инсулининдуцибельного гена (insulin-induced gene (INSIG) retention protein), тем самым, препятствуя его транспорту в АГ. При низком содержании холестерина в клетке SCAP принимает конформацию, которая позволяет комплексу SCAP–SREBP диссоциировать с мембранфиксирующим белком и транспортироваться в составе COP II везикул в АГ [Gimpl et al., 2002].

Слайд 4

На данном слайде приведена генная сеть регуляции дифференцировки эритроидной клетки, представленная в базе данных GeneNet (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/systems/mgl/genenet/>).

Гормон эритропоэтин, взаимодействуя с рецепторами незрелых эритроидных клеток (стволовые эритроидные предшественники типа КОЕэ), стимулирует их пролиферацию, синтез гемоглобина и ферментов, участвующих в биосинтезе гема, т.е. созревание и дифференцировку эритроидных предшественников

Стимулятором синтеза эритропоэтина является низкое парциальное давление кислорода в венозной крови (гипоксия).

В системе регуляции дифференцировки эритроидной клетки хорошо видна положительная обратная связь. Взаимодействие эритропоэтина с клеточным рецептором приводит к активации транскрипционного фактора GATA-1, ключевого регулятора дифференцировки эритроцитов. GATA-1 стимулирует синтез α - и β -глобинов, а также ферментов синтеза гема. Кроме того, GATA-1 активирует свой собственный ген и ген эритропоэтинового рецептора (положительная обратная связь). Из гема, α - и β -глобинов образуется гемоглобин, основной компонент зрелого эритроцита.

Слайд 5

Для синтеза гема, а соответственно и гемоглобина необходимо наличие в клетке ионов Fe^{3+} . Важную роль в биосинтезе гема играет белок IRP (iron regulating protein). На данном слайде показана система регуляции поступления ионов Fe^{3+} в эритроидную клетку. Из схемы видно, что для системы характерны не только положительные, но и отрицательные обратные связи. Транспортировщиком железа из слизистой оболочки кишечника и синусов паренхимы селезенки в костный мозг является специфический белок трансферрин, содержащийся в плазме крови. Трансферрин взаимодействует с мембранными рецепторами и попадает в клетку путём эндоцитоза. В отсутствие Fe^{3+} в клетке белок IRP связывает мРНК одного из ферментов синтеза гема, 5-аминолевулинат синтетазы что приводит к замедлению процесса синтеза. При высокой концентрации Fe^{3+} в клетке мРНК eALAS полностью разблокирована. Если синтез глобинов по каким-либо причинам снижается и образуется избыточная концентрация гема, то поступление Fe^{3+} может ингибироваться как напрямую, так и опосредованно, за счёт уменьшения синтеза трансферриновых рецепторов (обратная отрицательная связь). Избыток гема также положительно влияет на синтез глобинов

Слайд 6

На данном слайде представлены примеры описания элементарных событий генной сети регуляции биосинтеза холестерина в клетке в рамках ОХКММ. Слева представлена данная генная сеть из базы данных GeneNet. Выборочно можно рассмотреть описание нескольких биохимических процессов. Этот процесс, переход одного вещества в другое, может быть описан как мономолекулярная реакция, с соответствующим видом правой части, этот, переработка определенного субстрата в определенный продукт, как ферментативная, а этот, димеризация транскрипционного фактора, как бимолекулярная и т.д.

Данный вид описания относится к наиболее нижнему уровню организации генных сетей – биохимическому. (Все модели в конечном итоге представляются в виде списков элементарных процессов, которые затем могут использоваться различными расчетными программами)

Слайд 7

На данном слайде в качестве иллюстрации фрагмент системы дифференциальных уравнений, как конкретная реализация математической модели генной сети регуляции биосинтеза холестерина в клетке. В этой системе представлен суммарный закон изменения концентрации холестерина в клетке, рецепторов липопротеинов низкой плотности и т.д. В таблице представлены константы, используемые в данном фрагменте системы ОДУ, их значения и размерности.

Слайд 8

На данном слайде приведен двудольный граф математической модели гаплоидной генной сети регуляции биосинтеза холестерина в клетке, которая описывает динамику 39 переменных, участвующих в 74 процессах. Сплошная стрелка означает участие в процессе с ненулевой стехиометрией, пунктирная – с нулевой. 1- конститутивный синтез, 2 - утилизация, либо деградация, 3 - мономолекулярная реакция, 4 - бимолекулярная реакция, 5 – ферментативная реакция.

Слайд 9

Необходимо отметить, что для одной и той же исследуемой биологической системы возможно построение нескольких математических моделей, в зависимости от того, какую проблему собирается решать исследователь. Так, например, на данном слайде приведен двудольный граф математической модели диплоидной генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке, которая описывает динамику 57 переменных, участвующих в 139 процессах. С помощью данной модели возможно исследование закономерностей функционирования диплоидной генной сети. Например, при сравнении с функционированием гаплоидной генной сети, ее дополнительной устойчивости и т.д. и т.п.

Слайд 10

На данном слайде изображены основные регуляторные контуры генной сети регуляции биосинтеза холестерина в клетке.

Слайд 11

На данном слайде приведен двудольный граф проективной модели генной сети регуляции биосинтеза холестерина в клетке, которая описывает динамику 10 переменных, участвующих в 21 процессах. Сплошная стрелка означает участие в процессе с ненулевой стехиометрией, пунктирная – с нулевой. 1- конститутивный синтез, 2 - утилизация, либо деградация, 3 - мономолекулярная реакция, 4 - бимолекулярная реакция, 5 – ферментативная реакция.

Слайд 12

В метаболическом пути биосинтеза холестерина цепь реакций от ланостерина до холестерина протекает неоднозначно. Модификации ланостерина могут происходить по кольцу А, кольцам В, С, D и по боковой цепи практически независимо друг от друга, отсюда возникает комбинаторика протекающих процессов.

Слайд 13 и 14

На данных слайдах показаны некоторые из процессов метаболической сети образования холестерина из ланостерина.

Слайд 15

На данном слайде приведен двудольный граф модели генной сети, контролирующей гомеостаз холестерина в клетке, с портретным описанием метаболических путей синтеза холестерина, которая уже описывает динамику 230 переменных, участвующих в 431 процессах. Сплошная стрелка означает участие в процессе с ненулевой стехиометрией, пунктирная – с нулевой. 1- конститутивный синтез, 2 - утилизация, либо деградация, 3 - мономолекулярная реакция, 4 - бимолекулярная реакция, 5 – ферментативная реакция.

Слайд 16

На данном слайде приведен двудольный граф модели генной сети регуляции дифференцировки эритроидной клетки, которая описывает динамику 65 переменных, участвующих в 165 процессах. Сплошная стрелка означает участие в процессе с ненулевой стехиометрией, пунктирная – с нулевой. 1- конститутивный синтез, 2 - утилизация, либо

деградация, 3 - мономолекулярная реакция, 4 - бимолекулярная реакция, 5 – ферментативная реакция.

Слайд 17

Необходимо сказать несколько слов о проблемах, которые возникают при моделировании динамики генных сетей. Они разделяются на два вида. Первые - это математические проблемы, которые возникают на стадии построения, расчета и адаптации моделей. К ним относятся такие проблемы как: решение систем дифференциальных уравнений; также то, что модели часто состоят частично из системы ДУ и дискретной части; решение обратной задачи (адаптация и определение параметров модели) и т.д. Вторые – это методологические проблемы, которые возникают на стадии работы с моделями (собственно для чего строятся модели). К ним относятся такие проблемы как: исследование устойчивости функционирования систем; решение задач управления; исследование эволюции моделируемых биологических систем и т.д.

Этим проблемам будет посвящено несколько следующих лекций, в которых более детально будут рассмотрены данные вопросы.

Слайд 18

Одной из наиболее важных и актуальных проблем при построении математических моделей генных сетей является верификация параметров модели. Здесь можно выделить основные моменты. Это пробелы в знании структурно-функциональной организации некоторых частей генных сетей (посредники, механизмы протекания процессов и т.д.). Нехватка количественных данных, пригодных для адаптации конкретной модели. В базах данных в основном накапливаются качественная описательная информация (информация о структурно-функциональной организации генной сети, механизмы различных процессов, организация регуляторных участков генов и т.д.), а также количественная информация статического характера (константы ферментативных реакций, массы белков, и т.д.). Рассредоточение кинетических данных в огромном количестве научных публикаций. Для данной области знаний характерна слабоструктурированность данных. Гетерогенность данных (наборы экспериментальных динамических данных получаются в своих конкретных условиях, при разных экспериментальных воздействиях в различные моменты времени и т.д.).

Слайд 19

На данном слайде приведен пример получения либо оценки статических данных модели. Например, константы многих ферментативных реакций доступны в базах данных, таких как WIT, BRENDA и т.д. Могут быть оценены константы таких фундаментальных процессов как репликация, транскрипция, трансляция и т.д. Также могут быть оценены константы, характеризующие взаимодействие генной сети с ее клеточным и организменным окружением, исходя из равновесных концентраций; времен жизни или полураспада компонентов системы; интегральных характеристик и т.д.

Слайд 20

- Математическая модель генной сети характеризуется набором констант k_1, \dots, k_m в системе дифференциальных уравнений
- Как правило, экспериментально измеренные значения известны только для ограниченного числа констант
- Значения остальных констант определяются на основе численного эксперимента

Слайд 21

На данном слайде приведен элемент базы данных по количественным характеристикам, которая разрабатывается в нашем институте.

Слайд 22

Верификация структуры математических моделей, а также их параметров может проводиться на основе различных оптимизационных алгоритмов. Одним из самых распространенных из них является генетический алгоритм, блок схема которого приведена на данном слайде. Об этом алгоритме более подробно будет вам рассказано в одной из следующих лекций.

Слайд 23

В общем случае, после верификации структуры математической модели проводится поиск значений ее параметров k_1, \dots, k_m , которые обеспечивают максимальное соответствие между рассчитанным и наблюдаемым динамическим поведением генной сети для большого количества экспериментов, при этом обычно оптимизируются различного сорта функционалы, 2 примера которых приведены на слайде.

Слайд 24

На данном слайде приведена блок-схема процедуры верификации параметров модели методом численного эксперимента с использованием технологии построения сценариев. На сегодняшний день в нашем институте разрабатывается база данных по количественным характеристикам генных сетей. В БД входят статические и динамические данные. На основе статических данных строится модель генной сети. Учет специфики динамических данных выражается в необходимости настройки модели на каждый конкретный эксперимент. Модель, настроенная на конкретный эксперимент, называется сценарием. Учет большое количество экспериментов приводит к возникновению пакета сценариев, который используется для адаптации модели генной сети как единое целое. Процесс адаптации организован как замкнутый цикл, в котором важнейшую часть занимает экспертная оценка. При появлении новых данных, несогласующихся с моделью, эксперт может принять решение, например, об изменении структуры модели.

Слайд 25

На данном слайде приведена еще одна блок-схема процедуры верификации параметров модели методом численного эксперимента с использованием технологии построения сценариев.

Слайд 26

На данном слайде представлены результаты верификации параметров модели генной сети биосинтеза холестерина по пакету сценариев. Красными точками указаны экспериментальные данные, синие кривые – результаты численных расчетов. Справа указаны условия экспериментов. Сверху представлена серия экспериментов, в которых измерялась эффективность связывания липопротеинов низкой плотности их рецепторами. Снизу представлен эксперимент, в котором измерялась кинетика ингибирования рецепторов ЛНП в зависимости от предварительного инкубирования клеток фибробластов в среде с определенным содержанием ЛНП.

Слайд 27

На этом слайде представлены результаты верификации параметров этой же модели. В данной серии экспериментов измерялась степень воздействия различных концентраций ЛНП в среде на содержание в клетках фибробластов, свободного (вверху) и эстерифицированного (внизу) холестерина в клетке.

Слайд 28 и 29

На данном слайде результаты расчета по модели динамики основных компонентов системы регуляции дифференцировки эритроидной клетки, где TfRTf – трансферинные рецепторы, связанные с трансферинном.

Система регуляции дифференцировки эритроидной клетки описана 119 кинетическими блоками. Модель содержит 68 динамических переменных и 178 констант реакций. Значения параметров модели определялись разными способами. Для определения значений ряда параметров ферментативной кинетики данной системы использовались экспериментальные данные, частично приведенные в табл.

Таблица. Константы некоторых ферментативных реакций

Фермент	Субстрат	Организм	Орган	K _{c,c-1}	K _{m,m} M
Аминолевулинат синтетаза	Глицин Сукцинил-СоА	<i>Rattus norvegicus</i> [4]	печень	(-) (-)	11.0 0.07
Аминолевулинат синтетаза	Глицин Сукцинил-СоА	<i>Mus musculus</i> [5]	печень	2.05e-02 2.05e-02	8.39 1.82
Аминолевулинат синтетаза	Глицин Сукцинил-СоА	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [6]		7.17e+01 7.17e+01	3.0 0.002
Порфобилиноген синтетаза	5-аминолевулинат	<i>Homo sapiens</i> [7]	эритроцит	11.67	0.29
Порфобилиноген деаминаза	Порфобилиноген	<i>Homo sapiens</i> [8]	эритроцит	2.93e-2	(-)
Порфобилиноген деаминаза	Порфобилиноген с URPIII синтазой	<i>Homo sapiens</i> [9]	эритроцит	(-)	0.13 0.051
Порфобилиноген деаминаза	Порфобилиноген	<i>Rattus norvegicus</i> [10]	печень	3.43e-4	0.017
Уропорфириноген декарбоксилаза	Гептакарбоксильный порфириноген I	<i>Homo sapiens</i> [11]	эритроцит	1.11e-3 (9.13e-4)	2.31e-3 (7.1e-4)
Уропорфириноген декарбоксилаза	Порфириноген I Порфириноген III	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [12]		2.39 0.906	1.0e-5 6.0e-6
Копропорфириноген оксидаза	Копропорфириноген III	<i>Bos taurus</i> [13]	печень	0.203 (0.178)	0.048 (0.025)
Копропорфириноген оксидаза	Копропорфириноген III	<i>Mus musculus</i> [14]	печень	0.291	0.047

Протопорфирино-ген оксидаза	Протопорфирино-ген IX	<i>Mus musculus</i> [15]	печень	2.49	5.6e-3
Протопорфирино-ген оксидаза	Протопорфирино-ген IX	<i>Homo sapiens</i> [16]	плацента	1.75e-1	1.7e-3
Протопорфирино-ген оксидаза	Протопорфирино-ген IX	<i>Bos taurus</i> [17]	печень	6.51	1.66e-2
Феррохелатаза	Протопорфирино-ген IX и Цитрат Fe	<i>Bos taurus</i> [18]	печень	7.77e-1 7.77e-1	1.27e-2 3.51e-3
Феррохелатаза	Протопорфирино-ген IX и Цитрат Fe	<i>Rattus norvegicus</i> [19]	печень	0.63 0.63	2.85e-2 3.74e-2

Верификация значений параметров модели, которые не представлены в литературе, проводилась методом численного эксперимента. При этом подбирали такие значения параметров, чтобы интегральное поведение системы максимально соответствовало имеющимся в литературе сведениям о динамических характеристиках поведения системы. К числу особенностей относятся следующие:

Интенсивное накопление гемоглобина начинается со стадии базофильного проэритробласта. Синтез гемоглобина и других компонентов происходит в основном в фазе G1 и начале S-фазы синтеза ДНК [Козинец и Гольдберг, 1982]. Суммарное (транзитное) время от проэритробласта до ретикулоцита 120 ч (5 суток). На G1- и начало S-фазы приходится примерно 2/5 от всего клеточного цикла [Федорова, 1976]. Таким образом, время синтеза внутренних компонентов в дифференцирующейся эритроидной клетке приблизительно равно 50 часам.

Количество трансфериновых рецепторов на поверхности незрелого эритроцита примерно составляет от 10^4 до 10^5 штук на клетку, а в клетке-предшественника эритроцита их нельзя обнаружить. [Lukas & Kuhn, 1994].

Скорость синтеза гемоглобина в клетках на стадии проэритробластов и базофильных эритробластов составляет 0.5 пг/час, что примерно равно $4.7 \cdot 10^6$ молекул/час для средней клетки диаметром 10 мкм, а на стадии ретикулоцита снижается в 5 раз, т.е. $\sim 10^6$ молекул/час [Козинец и Гольдберг, 1982].

В каждом эритроците содержится порядка 280 млн. молекул гемоглобина [Федорова, 1976].

Численные расчеты по данной математической модели показывают что:

Для компонентов данной молекулярно-генетической системы, связанных с контролирующей функцией белка IRP и участвующих в регуляции поступления ионов Fe^{3+} в эритроидную клетку, гема, α - и β -глобинов характерны осциллирующие динамики синтеза (см. слайд, б, в, д, е). Обусловлено это сетью отрицательных и положительных обратных связей показанных на рис. 1.

В дифференцирующейся эритроидной клетке не происходит избыточного накопления свободного гема (см. слайд, е). Во-первых, потому что биосинтез гема контролируется белком IRP, который связывает мРНК eALAS. А eALAS в свою очередь является ферментом начальной стадии цепочки синтеза гема. Во-вторых, избыток гема положительно влияет на синтез глобинов.

Количество трансфериновых рецепторов на поверхности незрелого эритроцита достигает $\sim 10^4$ шт/клетку, при начальном отсутствии их в предшественнике (см. слайд, в).

Через 18 часов после начала действия эритропоэтина скорость синтеза гемоглобина достигает $\sim 5 \cdot 10^6$ молекул/час, максимум ($8 \cdot 10^6$) приходится на 31 час, а через 10 часов после выключения генов составляет $\sim 10^6$ молекул/час. Отметим, что после 25 часа скорость синтеза гемоглобина демонстрирует осциллирующую динамику (расчеты не приводятся)

После полного прекращения синтеза гемоглобина (74-й час), его содержание в клетке устанавливается на уровне ~ 280 млн. молекул (см. слайд, г).

Литература

Lukas C. Kuhn Molecular regulation of iron proteins.- Bailliere's Clinical Haematology-Vol.7, No. 4, December 1994.

2. Нормальное кроветворение и его регуляция- под ред. проф. Н. А. Федорова, с. 543 - Москва, Медицина, 1976.

3. Кинетические аспекты гемопоэза.-под ред. проф. Г. И. Козинца и проф. Е. Д. Гольдберга, с. 306 - Томск, 1982.

Слайд 30

На данном слайде приведены результаты сравнения 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).

Слайд 31

Важной частью при моделировании динамики генных сетей является этап работы с готовыми моделями (для чего собственно они и строились), проведение численных экспериментов и т.д.

Несколько следующих слайдов демонстрируют некоторые численные эксперименты, которые можно проводить с адаптированными моделями генных сетей.

На этом слайде показаны результаты моделирования отклика генной сети регуляции синтеза холестерина в клетке на увеличенное в 2 раза поступления ЛНП в плазму крови в течении 8-ми часов при мутации, уменьшающей скорость экспрессии гена ЛНП рецепторов в 2 раза. Синими линиями реакция системы в норме, красными пунктирными линиями – при мутации. Стрелками указаны начало и конец воздействия на систему.

В норме в данных условиях происходит монотонное возрастание концентрации ЛНП в крови, которое к 10-му часу эксперимента примерно в 4 раза превышает нормальный уровень. Содержание свободных рецепторов на поверхности клетки при этом снижается, содержание холестерина в клетке изменяется незначительно, что объясняется действием отрицательной обратной связи, при которой снижается скорость биосинтеза холестерина в клетке при повышении поступления его извне. Все переменные системы принимают стационарное значение примерно через 6 часов после прекращения воздействия.

При мутации уменьшается количество рецепторов на поверхности клетки. Концентрация свободного холестерина в клетке снижается примерно на 15%. Относительно небольшое уменьшение холестерина в клетке мы объясняем способностью клетки компенсировать уменьшение поступления холестерина извне за счет увеличения собственного синтеза, и наличием отрицательной обратной связи регуляции скорости биосинтеза холестерина. Стационарная концентрация ЛНП в крови увеличивается примерно в 1.5 раза.

Слайд 32

На этом слайде показаны результаты моделирования отклика генной сети в тех же условиях при мутации, понижающей в 5 раз способностью рецепторов связывать ЛНП.

В ответ на снижение суммарного потока ЛНП из плазмы крови в клетку в 5 раз, по механизму отрицательной обратной связи, происходит примерно 5-кратное увеличение интенсивности транскрипции этих генов. Как следствие - увеличивается продукция эндогенного холестерина в клетке, а также происходит примерно 5-кратное возрастание концентрации рецепторов ЛНП на поверхности клетки, нормализующее суммарный транспорт ЛНП в клетку. При этом возрастает чувствительность содержания свободного холестерина к изменению содержания ЛНП в плазме крови.

Слайд 33

На этом слайде показаны результаты моделирования отклика генной сети в тех же условиях при мутации, понижающей способность рецепторов освобождать ЛНП в эндосомах, приводящей к повышенной деградации рецептора в 10 раз.

Эта мутация приводит к тем же последствиям, что и первый вид мутации, только имеет более выраженный характер. Стационарная концентрация ЛНП в крови увеличилась примерно в 2 раза, чувствительность клетки к изменению содержания ЛНП в среде при этом

уменьшилась. Стационарное количество свободных рецепторов на поверхности клетки уменьшилось примерно в 4.5 раза, концентрация свободного холестерина уменьшилась примерно на 25%.

Слайд 34

Для более полного исследования влияний 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

Под “мутационным портретом” генной сети понимается набор ее стационарных состояний и динамических характеристик, полученный при “мутационном” варьировании в заданных границах скоростей протекания каждого элементарного процесса генной сети.

В работе исследовалось влияние одиночных мутаций разной интенсивности по всем параметрам модели. Проведено ~2000 расчетов

Слайд 35

На этом слайде представлены кривые изменения содержания свободного холестерина в клетке в зависимости от мутационного изменения констант элементарных процессов в генной сети биосинтеза холестерина.

На слайде представлены типичные кривые изменения стационарной концентрации свободного холестерина в клетке в зависимости от мутационного изменения четырех параметров модели: (1) константы оборота фермента SRP (sterol regulated protease) – изменение примерно в два раза; (2) константы обратной реакции димеризации транскрипционного фактора SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein) – изменение на 65-70%; (3) константы Михаэлиса-Ментен фермента ацетоацетил-КоА тиолазы – изменение на 15-20%; (4) константы оборота фермента АХАТ (ацил-КоА-холестерин-ацилтрансфераза) – изменения не происходит.

Слайд 36

На этом слайде представлены двудольный граф математической модели с указанием чувствительности стационарного содержания свободного холестерина в клетке к мутационным изменениям параметров. Изменение скоростей процессов, помеченных коричневым цветом, в значительной степени сказывается на стационарной концентрации холестерина, которая может меняться от 0 до более чем 200% относительно нормы.

Изменение скоростей процессов, помеченных оранжевым цветом, влияет на стационарную концентрацию холестерина, изменяя ее не более чем на 35% от нормы.

Изменение скоростей процессов, помеченных зеленым цветом, влияет на стационарную концентрацию холестерина, изменяя ее не более чем на 25% от нормы.

Слайд 37

На данном слайде приведена грубая статистика мутационного портрета генной сети регуляции биосинтеза холестерина в клетке. Из проведенных результатов анализа портрета одиночных мутаций видно, что стационарная концентрация несвязанного с мембранами холестерина в рассматриваемой генной сети весьма устойчива по отношению к мутационным изменениям большого количества параметров модели. Действительно, около 40% параметров математической модели при изменении в рассматриваемых пределах не влияют на стационарную концентрацию холестерина. При изменении ~45% других параметров она менялась незначительно – не более, чем на $\pm 35\%$.

Существует несколько причин слабой чувствительности концентрации холестерина к мутационному изменению многих параметров модели:

(i) Наличие нелимитирующих стадий в биохимических путях рассматриваемой сети.

- (ii) 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.
- (iii) Возможное шунтирование некоторых биохимических реакций в пути биосинтеза холестерина.
- (iv) Регуляция внутриклеточной концентрации холестерина по механизму отрицательной обратной связи.

Тем не менее, изменения некоторых параметров (~15%) весьма сильно сказывались на равновесной концентрации холестерина. Все эти параметры входят в описание регуляторных процессов данной генной сети. Их изменение влечет за собой нарушение регуляторных связей, а это, в свою очередь, сильно влияет на стационарную концентрацию холестерина в клетке.

Слайд 38 и 39

При имитации эволюции полагалось, что каждая особь является носителем моделируемой генной сети с индивидуальным набором значений параметров и может порождать фиксированное количество потомков, которые могут отличаться от исходной особи одной или несколькими мутациями, генерирующимися случайным образом. На каждом эволюционном этапе осуществляется отбор определенного количества наиболее приспособленных особей. Приспособленность трактуется в терминах близости результатов, получаемых с помощью модели, к опубликованным экспериментальным данным. Условный функционал приспособленности W выглядит следующим образом:

$$W = \frac{F_N}{F}, \text{ where } F = \sum_i \left(\frac{x_i^t}{x_i^e} + \frac{x_i^e}{x_i^t} - 2 \right).$$

Здесь x_i^t – i -ое значение, полученное при численном расчете математической модели генной сети (например, концентрация определенного компонента генной сети при определенных условиях); x_i^e – i -ое экспериментальное значение; F_N – значение F , полученное в нормальных условиях.

Функционал приспособленности строился на основе экспериментальных данных, описанных в работах (Brown M.S. and Goldstein J.L., 1979, Goldstein J.L. et al., 1977, Goldstein J.L. et al., 1975).

В начальный момент эволюционного времени предполагается, что все особи популяции, несут генные сети, адаптированные к нормальным условиям (среда N), при которых скорость поступления ЛНП в плазму крови равна V_N . В этом случае $W_N=1$. Затем особи помещались в среду L , в которой скорость поступления ЛНП в кровь полагалась равной половине от нормы: $V_L=V_N/2$. В среде L их условная приспособленность уменьшилась до $W_L=0.004$. Т.е. организмы, исходно адаптированные к среде N , в среде L имеют относительно низкую приспособленность.

При эволюционной адаптации генной сети в гомозиготном состоянии к среде L было достигнуто значение функционала $W_L=0.75$. Содержательный результат состоит в том, что хотя допускалось эволюционное изменение генной сети по всем параметрам, в результате отобрался вариант, который решил проблему эволюционной адаптации за счет фиксации мутаций, резко увеличивающей транскрипцию гена, кодирующего рецептор липопротеина низкой плотности, т.е. было затронуто лишь одно звено генной сети. Тем самым проблема эволюционной адаптации была решена за счет организации более эффективного механизма транспорта липидов в клетку из обедненной среды. При этом в ходе эволюции фиксировались мутации, которые затрагивали, фактически, лишь один локус генной сети, ответственный за синтез ЛНП рецепторов (см. слайд, обведен прямоугольником). В результате эволюции скорость их синтеза уменьшилась относительно нормы примерно в 2.3 раза, а приспособленность генной сети к среде с низким поступлением ЛНП в кровь возросла

с 0.004 до 0.75. Константы скоростей других процессов при этом практически не изменились.

Далее мы провели эволюционную адаптацию генной сети, приспособленной к среде L, к новым условиям, которые характеризуются еще более низким поступлением ЛНП плазму крови (в 4 раза ниже относительно нормы и в два раза ниже относительно среды L). Оказалось, что высокая приспособленность к новым условиям внешней среды уже достигается за счет изменения 11 параметров системы, входящих в описание 6 процессов, обведенных на слайде овалами. Т.е. ресурса изменчивости скорости синтеза ЛНП рецепторов уже не достаточно для достижения высокой приспособленности.

Отметим, что процессы, по которым шла эволюционная адаптация, как в первом так и во втором случае, относятся, согласно нашим данным (Ratushny A.V. et al., 2003), к числу слабо лимитирующих генную сеть регуляции синтеза холестерина в клетке. То есть хотя их мутационные изменения и приводят к изменению уровня холестерина в клетке, однако, они не носят драматического характера. Таким образом, в условиях постоянной среды, мутации по этим локусам носят слабоповреждающий (или квазинейтральный) характер. Однако, именно они обеспечивали возможность эволюционной адаптации диплоидной генной сети синтеза холестерина в клетке в новой среде (когда мутационные изменения по этим локусам стали носить ярко адаптивный характер).

В то же время в эволюционный процесс не были вовлечены локусы, ответственные за функционирование нелимитирующих звеньев генной сети, (по ним отбор вообще не эффективен), а также локусы, мутационные изменения которых носят повреждающий характер (по ним отбор не эффективен в силу резкого снижения приспособленности).

Таким образом, этот результат свидетельствует о важном эволюционном потенциале слабоповреждающих и квазинейтральных мутаций для возникновения эволюционных адаптаций.

Литература

Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1979) Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7), P. 3330-3337. Review.

Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1977) The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.*, 46, P. 897-930. Review.

Goldstein, J.L., Dana, S.E., Faust, J.R., Beudet, A.L., Brown, M.S. (1975) Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem.*, 250(21), P. 8487-8495.

Ratushny AV, Likhoshvai VA, Ignatieva EV, Kolchanov NA. Resilience of Cholesterol Concentration to a Wide Range of Mutations in the Cell. *Complexus*, 2003;1:142-148.

Слайд 40

Математические модели молекулярно-генетических систем могут использоваться для:

1. Изучения и понимания патологических процессов, протекающих на клеточном и организменном уровне (это могут быть различные мутации, врожденные либо приобретенные заболевания, синдромы и т.д.). Так, например, математическая модель системы регуляции внутриклеточного гомеостаза холестерина может быть потенциально применена для изучения таких заболеваний как атеросклероз, гиперхолестеринемия и т.д. Математическая модель генной сети регуляции дифференцировки эритроидной клетки для изучения различных видов анемий и гипоксий.
2. Идентификации генетических и биохимических дефектов и анализа их воздействий на функцию генных сетей.
3. Развития оптимальных методов воздействий на исследуемые биологические системы для нормализации их функции (например, при мед. Лечении с помощью терапевтических, либо фармакологических средств).
4. Изучения фундаментальных биологических проблем, таких как молекулярная эволюция и т.д.

Слайд 41

- Математические и компьютерные модели генных сетей являются незаменимым инструментом для анализа функционирования сложных биологических систем.
- С их помощью возможно предсказывать:
 - динамику тех или иных процессов в рассматриваемых системах;
 - исследовать механизмы их протекания;
 - выявлять ключевые звенья в генных сетях;
 - анализировать влияние различных мутаций на живые системы;
 - и т.д.
- Особую ценность результаты исследования мутационных портретов 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.