

Генные сети. Структурно-функциональная организация и интеграция

Современная биология накопила массу экспериментальных данных, для анализа и систематизации которой необходимо развитие современных информационных технологий.

Системная компьютерная биология основана на использовании математических и философских концепций для выявления принципов, лежащих в основе биологии на генетическом, молекулярном, клеточном уровне. Теория генных сетей - одно из новых и актуальных направлений системной биологии. На основе генных сетей строятся математические модели, позволяющие изучать поведение системы *in silico*.

Генные сети являются частью множества реальных сетей, существующих в природе: сетей метаболических реакций, нейронных сетей, пищевых и социальных сетей, сетей сотрудничества между учеными, компьютерных сетей.

Сложнейшие механизмы регуляции экспрессии генов эукариот, обеспечивают получение необходимых количеств генных продуктов в определенных клетках, тканях и органах в определенные моменты жизни. Экспрессия генов обеспечивается совокупностью молекулярных механизмов, включающих наряду с транскрипцией такие процессы как кэпирование пре-мРНК, сплайсинг, 3'-концевой процессинг/полиаденилирование, активный транспорт мРНК через ядерные мембраны, синтез полипептидной цепи в ходе трансляции мРНК, посттрансляционная деградация белка, и т.д. На каждом из этих этапов возможна регуляция интенсивности экспрессии гена. Экспрессия любого гена регулируется в рамках генных сетей, при тесном взаимодействии всех их элементов.

В постгеномную эру развития биологии становятся актуальными исследования не только регуляции экспрессии одного гена при действии какого-либо сигнала, но и регуляции экспрессии генов всего генома при действии какого-либо сигнала или комплекса сигналов. Белковый продукт отдельного гена (транскрипционный фактор, гормон, ростовой фактор, цитокин, мембранный рецептор, цитоплазматическая протеинкиназа, фосфатаза и т.д.) может оказывать разнообразные активирующие или подавляющие воздействия на экспрессию множества других генов. Эти воздействия могут проявляться на этапах транскрипции, созревания пре-мРНК, трансляции и т.д. Таким образом, изменение в экспрессии отдельного гена может приводить к координированным изменениям экспрессии множества других генов, проявляющимся на уровне тканей, органов и организма в целом. Развитие современных методов дает такую информацию. На слайде представлены данные микроэрей анализа, позволяющего выявить кластеры координировано экспрессирующихся генов в клетках нервной системы при действии TNF- α . Красным цветом показаны гены, экспрессия которых усиливается при действии цитокина, зеленым – подавляется.

Понятие «генной сети»

Как известно, исходная парадигма генетики, сформировавшаяся в начале века, основывалась на том, что один ген определяет один фенотипический признак. Она сыграла свою фундаментальную роль, позволив доказать существование фенотипических признаков, имеющих очень простые (с генетической точки зрения) механизмы контроля.

Позднее возникла новая парадигма, согласно которой отдельный признак может контролироваться группой взаимодействующих генов. Уточнение и развитие этой парадигмы приводит в настоящее время к представлению о том, что отдельный фенотипический признак является продуктом функционирования определенной генной сети.

Генная сеть – это группа генов, координированное функционирование которых обеспечивает формирование определенного фенотипического признака организма. В

качестве объектов генной сети на уровне клетки могут выступать не только гены и продукты их экспрессии, но также и различные низкомолекулярные соединения, метаболиты, вовлеченные в регуляцию и т.д.

Первые теоретические исследования генных сетей начались еще в 60-х годах. На сегодняшний день существует несколько основных подходов к описанию генных сетей и моделированию их динамики.

- (1) Логическое описание. В этом случае объекты (компоненты сети) и функции (взаимоотношения между компонентами) могут принимать ограниченный набор значений обычно только два (0 и 1) .
- (2) Описание генной сети с использованием системы нелинейных дифференциальных уравнений.
- (3) Стохастические модели генных сетей, наиболее широко применяемые для таких генных сетей, в которых значительные события обеспечиваются очень малым количеством регуляторного агента (например, транскрипционного фактора).
- (4) Концепция молекулярно-генетических управляющих систем, основанная на информационно-кибернетическом подходе. В рамках этой концепции выделяют информационные компоненты клетки (совокупность кодирующих макромолекул) и исполняющие компоненты (молекулярные ферментативные комплексы, обеспечивающие выполнение различных биохимических процессов).

Таким образом, имеются разнообразные подходы к описанию и моделированию динамики генных сетей. Следует, однако, подчеркнуть, что основной проблемой до последнего времени было не отсутствие методов моделирования динамики генных сетей, а отсутствие эффективных компьютерных технологий для накопления экспериментальной информации о структурно-функциональной организации генных сетей эукариот. Компьютерная технология GeneNet, развиваемая в лаборатории теоретической генетики ИЦиГ является, по-видимому, одним из первых примеров успешного решения задачи, которая открывает путь к быстрому накоплению в компьютерных базах данных экспериментальной информации о структурно-функциональной организации генных сетей.

База данных GeneNet: компьютерная технология реконструкции и описания генных сетей на основе экспериментальных данных

Преимуществами этой технологии являются возможность описания в рамках единого подхода как механизмов регуляции экспрессии генов, так и различных метаболических процессов; возможность описания генных сетей как про- так и эукариот, а также их совместного функционирования; наличие интуитивно понятной молекулярным биологам системы для описания генных сетей и ввода информации в базу; возможность автоматической визуализации структуры генных сетей на основе накопленных данных.

Формализованные данные обрабатываются с помощью специальной программы (GeneNet viewer) и представляются пользователю в виде графической схемы. Каждый компонент генной сети имеет свое изображение, отражающее его особенности. Например, форма изображения белка отражает степень его мультимеризации, а цвет - функциональное состояние.

Классы функциональных структур и событий, значимых для функционирования генных сетей

Для удобства описания на компьютерном языке все компоненты генной сети разделены на два основных типа: объекты и связи (взаимодействия) между ними. Объектами могут являться белки и белковые комплексы, гены, РНК, продукты

метаболизма. Гибкий формат GeneNet позволяет по мере необходимости добавлять новые классы объектов.

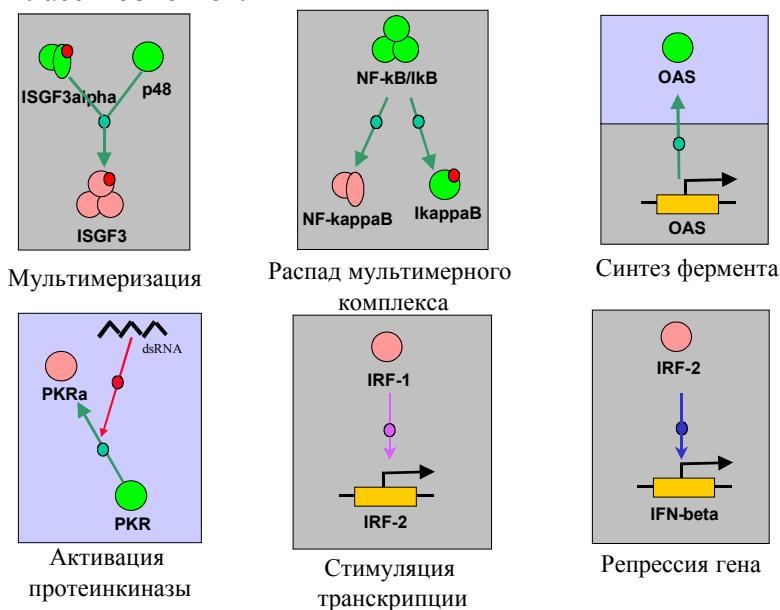


Рис. 1. Примеры элементарных процессов в генных сетях. Белки обозначены кружками, гены – прямоугольниками, взаимодействия между объектами – стрелками. Зеленые стрелки обозначают реакции, красные и розовые – положительные регуляторные события, синие – отрицательное.

Все взаимодействия между объектами подразделяются на два основных класса: реакции и регуляторные воздействия.

Реакции – это достаточно разнородный класс событий, в результате которых происходит образование нового объекта, например, мультимеризация или распад мультимерных комплексов, модификация белка (фосфорилирование или ацетилирование), транспорт веществ.

Регуляторные воздействия в зависимости от типа влияния делятся на 4 подкласса: включение, выключение, усиление или ингибирование процесса. Стандартность базовых

элементов дает возможность описать практически любое событие в генной сети.

Примеры, приведенные на рис.1 показывают, что с помощью этого языка можно описывать, например, такие элементарные события, как мультимеризация белковых субъединиц, приводящая к формированию активного белкового комплекса; обратный процесс – диссоциацию мультимерного комплекса на субъединицы; экспрессию белка; изменение ферментной активности белка за счет его взаимодействия с лигандом; положительный эффект транскрипционного фактора, активирующего транскрипцию гена; негативный эффект транскрипционного фактора, подавляющего транскрипционную активность гена, и многие другие.

Генная сеть содержит несколько обязательных типов компонент, таких как: 1) гены и кодируемые ими белки; 2) пути передачи сигналов от клеточной мембраны к ядру клетки; 3) метаболические пути.

Особенностью протекания биохимических реакций в организме является их разделение в пространстве. Система GeneNet позволяет учесть также и то, что компоненты генной сети могут быть разнесены по различным органам, тканям, клеткам и клеточным компартментам. Кроме того, GeneNet позволяет описывать различные уровни организации генной сети: молекулярный, клеточный и уровень целого организма.

Если рассматривать генную сеть на уровне отдельной клетки, можно выделить несколько зон локализации объектов, например, межклеточное пространство, клеточная мембрана, цитоплазма, ядро. Для полного описания генных сетей необходимо рассмотрение протекающих в них процессов на уровне целого организма. В этом случае возможно описание генных сетей, отдельные части которых распределены по различным крупным компартментам организма, таким, как органы и ткани.

Во многих случаях можно определить направленность процессов в пределах определенного фрагмента генной сети: а) входной поток, в который включается путь передачи сигнала с рецепторов клетки к гену и б) выходной поток – процессы, происходящие в клетке после ответа генов на внешний сигнал.

Гибкий и универсальный компьютерный язык позволяет описывать любые генные сети, функционирующие в организмах про- и эукариот, а также симбиотические или гибридные сети, координировано функционирующие генные сети различных организмов.

Рассмотрим в качестве примера генную сеть нодуляции или образования азотфиксирующих клубеньков у бобовых. В генной сети наблюдается координированная экспрессия генов, принадлежащих двум различным организмам. Взаимодействие между азотфиксирующими бактериями *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Azorhizobium* и корнями бобовых растений приводит к образованию нового органа у растения – клубенька, в котором и происходит азотфиксация.

Флавоноиды, секретируемые корнями растения-хозяина, индуцируют транскрипцию NodD1 белок является активатором транскрипции других бактериальных nod-генов, участвующих в образовании сигнальной молекулы - липоолигосахарида Nod-фактора. Этот фактор стимулирует дифференцировку эпидермальных клеток растений, что приводит к образованию сложной структуры – клубенька.

Nod фактор, связываясь с рецептором NORK (nodulation receptor kinase), индуцирует образование пиков Ca^{2+} в цитозоле, экспрессию ранних нодулинов и запуск генов клеточного цикла, что приводит к формированию клубенька. Концентрации Nod фактора регулируется растительными ферментами - хитиназами через этилен-зависимый путь, образующий контур с отрицательной обратной связью. В генной сети путь передачи сигнала, индуцируемый этиленом, реконструирован по экспериментальным данным, полученным на арабидопсисе.

Разработан специальный интерфейс для ввода информации в GeneNet. С помощью этой программы биологи могут вводить данные в базу GeneNet, оперируя естественными понятиями молекулярной биологии, связанными с экспрессией генов и их регуляцией. При этом интерфейс ввода осуществляет автоматическую трансляцию введенной информации в стандартный формат GeneNet.

Рассмотрим принципы построения генной сети на основе экспериментальных данных на примере генной сети ответа на тепловой шок и генной сети термоустойчивости. На слайдах 16-22 приведены примеры экспериментальных данных, на основе которых была реконструирована генная сеть. Экспрессия сотен генов усиливается при действии теплового шока. База данных регуляции транскрипции генов TRRD служит основой для реконструкции генных сетей. SRS версия TRRD позволяет получить информацию о генах, регулируемых транскрипционным HSF1, в разделе сайты (Experiment Codes 3.5, 3.6 OR 6.2&6.6 OR 6.3&6.6), данные о экспрессии плазмидных конструкций, содержащих промотор гена при действии теплового шока (6.5). Кроме того, можно получить данные о экспрессии генов, выбрав индуктор – тепловой шок в разделе паттерны экспрессии.

Ключевой транскрипционный фактор ответа на тепловой шок HSF1 (heat shock factor 1) в неактивном состоянии находится в цитоплазме в комплексе с молекулярными шаперонами, например, HSP90 (heat shock protein 90). При действии теплового шока появляются частично денатурированные, неправильно свернутые белки. Комплекс распадается, HSP90 связывается с белками и способствует их правильному свертыванию. HSF1 тримеризуется, фосфорилируется и транспортируется в ядро, где связывается с HSE сайтами и активирует транскрипцию генов теплового шока, являющимися в большинстве молекулярными шаперонами. При избытке шаперонов, что регулируется концентрацией в клетке неправильно свернутых белков, HSP70 связывается с HSF1, который транспортируется в цитоплазму. Ответ на тепловой шок завершается. HSF1 активирует транскрипцию генов молекулярных шаперонов (*hsp70*, *hsp27*, *hsp90*) и других генов системы теплового шока. Экспрессия гена *mdr*, определяющего устойчивость клетки к различным лекарствам, регулируется на уровне транскрипции HSF1. Активация HSF1 приводит к накоплению на поверхности клетки Р-гликопротеина,

транспортера, блокирующего вход и усиливающего выход из клетки многих гидрофобных веществ.

В генной сети Термоустойчивости представлены данные, подтверждающие роль белков теплового шока в подавлении активации каспаз. Кратковременное действие теплового шока вызывает развитие термоустойчивости, связанной с синтезом и накоплением белков теплового шока. Клетка не погибает при действии последующего сильного стресса. HSP70 связывается с Araf-1 и препятствует образованию апоптосомы и активации каспазы 9. Молекулярные шапероны HSP27 и HSP90 также препятствуют олигомеризации Araf-1, образованию комплекса с цитохромом С и активации каспазы 9. Для реконструкции этого фрагмента генной сети были использованы данные, полученные *in vitro*.

Структурно-функциональная организация генных сетей

Анализ информации, накопленной в базе данных GeneNet, а также имеющихся литературных данных позволяет выделить несколько основных типов генных сетей:

1. Генные сети, обеспечивающие осуществление циклических процессов, например, циркадных ритмов.
2. Генные сети, обеспечивающие процессы роста и дифференцировки клеток, морфогенеза тканей и органов, роста и развития организмов.
3. Генные сети, обеспечивающие гомеостаз биохимических и физиологических параметров организма.
4. Генные сети, обеспечивающие реакции организмов на изменение состояния внешней среды, например стрессовый ответ.

Положительные и отрицательные обратные связи – обязательные элементы генных сетей

Характерной особенностью организации генных сетей является их способность к саморегуляции, которая осуществляется за счет наличия в генной сети замкнутых регуляторных контуров с отрицательными и положительными обратными связями, стабилизирующие параметры генной сети на определенном уровне или, напротив, отклоняющие их от исходного значения. Молекулярной основой существования таких регуляторных контуров является наличие сайтов-мишеней в ДНК, РНК и белках, с которыми могут взаимодействовать различные молекулярные компоненты генной сети и внешние регуляторные факторы. Благодаря этим двум типам регуляторных контуров возможно поддержание определенного функционального состояния генной сети или ее переход в другой режим функционирования, в том числе и под влиянием факторов внешней среды.

Характерной особенностью генных сетей, контролирующих дифференцировку клеток, морфогенез тканей и органов, рост и развитие организмов, является наличие регуляторных контуров с положительными обратными связями. Известно, что функция регуляторного контура с положительной обратной связью состоит в максимально эффективном отклонении контролируемого параметра X от его текущего значения. Положительные обратные связи играют ключевую роль в регуляции процессов морфогенеза, роста и развития организмов, по своему смыслу представляющих быстрый уход от начального состояния.

Отметим прежде всего наличие сайтов связывания фактора GATA-1 в промоторе собственного гена. Благодаря этому происходит быстрое усиление транскрипции гена GATA-1 по механизму положительной обратной связи. Генная сеть развития цветка арабидопсиса имеет несколько контуров положительных обратных связей. Например,

APETALA1 (AP1) в цветочных почках активирует транскрипцию гена LEAFY (LFY), тогда как белок LFY позитивно регулирует экспрессию AP1.

В генных сетях стрессового ответа выявлены как положительные, так и отрицательные обратные связи. Транскрипционный фактор ATF3 ингибирует активность собственного гена, тогда как p53, супрессор опухолей, активирует транскрипцию своего ингибитора лигазы mdm2, который является главным регулятором убиквитин-опосредованной деградации p53 в протеасомах.

При попадании вируса в клетку происходит активация гена интерферона- β (IFN- β). Транскрипционный фактор IRF-1 активирует транскрипцию гена интерферона бета, а позднее усиливает транскрипцию другого транскрипционного фактора IRF-2, подавляющего транскрипцию *IFN-beta*, обеспечивая возвращение системы в исходное состояние. Характерной особенностью этой генной сети, типичной для генных сетей, обеспечивающих ответ организма на изменение внешней среды, является двухэтапный механизм действия. На первом этапе происходит быстрая активация системы за счет действия регуляторного контура с положительной обратной связью. На втором этапе происходит подавление ответа за счет включения отрицательных регуляторных механизмов.

Кассетная активация и репрессия генов

Системная компьютерная биологии: прикладные и фундаментальные аспекты.

Кассетная активация и репрессия генов ключевым транскрипционным фактором, например, E2F1/DP1 в генной сети регуляции клеточного цикла, активация HSF1 в генной сети регуляции ответа на тепловой шок, GATA1 в генной сети регуляции дифференцировки эритроцита является характерной особенностью генных сетей.

Транскрипционный фактор GATA-1 является ключевым в процессе созревания и дифференцировки эритроцитов. Сайты его связывания обнаружены в регуляторных районах практически всех эритроид-специфичных генов, в том числе генов, кодирующих альфа- и бета-субъединицы гемоглобина, а также генов, кодирующих ферменты биосинтеза гема. Сайты связывания GATA-1 обнаружены также в регуляторных районах генов эритроид-специфичных транскрипционных факторов, таких как HOXB2, TAL1, EKLF, RBTN2. Благодаря наличию сайтов связывания фактора GATA-1 в регуляторных областях этих генов, под действием GATA-1 осуществляется активация их транскрипции. Эти факторы, в свою очередь, обеспечивают дополнительную стимуляцию эритроид-специфичных генов. Таким образом, происходит включение каскада регуляторных явлений, обеспечивающих транскрипцию генов, которые определяют терминальную дифференцировку и созревание эритроидной клетки.

Мотивы генных сетей

Системная компьютерная биологии: прикладные и фундаментальные аспекты.

Анализ взаимодействий транскрипционных факторов с промоторами генов и оперонов показал, в основе этих генных сетей лежат простые мотивы. Три основных мотива выявлены в транскрипционных сетях *E.coli*, регулируемых 150 транскрипционными факторами

1)усиливающая петля; 2) один транскрипционный фактор регулирует несколько оперонов; 3)несколько транскрипционных факторов регулируют кассету оперонов. Анализ показал, что эти мотивы встречаются в реальных сетях достоверно чаще, чем в случайных, имеющих столько же вершин.

Геномный анализ сайтов связывания транскрипционных факторов у дрожжей в комбинации с данными по экспрессии генов позволил сконструировать генные сети. При анализе 4000 взаимодействий выявлены только шесть основных мотивов в

транскрипционных регуляторных сетях дрожжей, служащими блоками для построения сложных генных сетей.

Генная сеть редокс-регуляции и интеграция генных сетей

Свободные радикалы и другие активные формы кислорода (АФК) образуются в процессе жизнедеятельности клеток и в высоких концентрациях приводят к окислительному стрессу. Некоторые окислительные реакции обратимы и определяют динамику регуляторных процессов и экспрессию генов через модификацию путей передачи сигнала при изменении окислительно-восстановительного (редокс) статуса клетки. АФК регулируют экспрессию генов через цистеиновые остатки в ДНК-связывающих доменах транскрипционных факторов, инактивируют цистеины в каталитических центрах протеин фосфатаз и изменяют активность киназ. Гены, экспрессия которых зависит от окислительно-восстановительного потенциала клетки, называют редокс-чувствительными генами. Они образуют генную сеть редокс-регуляции.

Активные формы кислорода образуются в результате неполного восстановления кислорода, главным образом, в митохондриях, а также оксидазами (НАДФН оксидазами, ксантиноксидазами, моноаминоксидазами) в других компартментах клетки. Регуляция генной сети осуществляется редокс-активными белками тиоредоксином и редокс-фактором Ref-1. Тиоредоксин (Trx) - небольшой многофункциональный белок с редокс-чувствительными аминокислотными остатками а активном центре Cys-Gly-Pro-Cys. Тиоредоксин защищает клетку от окислительного стресса, модулирует экспрессию генов, участвует в путях передачи сигналов, регулирует пролиферацию клеток и апоптоз. Ref-1 или ДНК репарирующая эндонуклеаза (APE) - белок, обладающий ДНК репарирующей и редокс-регулирующей активностью. Ref-1 образует комплекс с тиоредоксином и регулирует активность транскрипционных факторов через восстановление тиоловых групп цистеиновых остатков в ДНК-связывающих и трансактивационных доменах транскрипционных факторов.

Тиоредоксин существует в клетке в восстановленной или окисленной форме и участвует в редокс-регуляции через обратимое окисление цистеинов в его активном центре. Редуцирующая активность тиоредоксина зависит от редокс-статуса сенсора АФК тиоредоксинредуктазы TRXR1. Образование АФК приводит к стабилизации мРНК TRXR1 и увеличению уровня фермента. Тиоредоксинредуктаза восстанавливает окисленный тиоредоксин TRX, который транспортируется в ядро и образует гетеродимер с ядерным белком Ref-1.

Цитокины, вызывающие воспаление, такие как TNF- α и IL- β , стимулируют транслокацию восстановленного тиоредоксина в ядро и активацию стресс-индуцируемых транскрипционных факторов AP-1, HSF1, NF- κ B, HIF1- α , p53 и координированную экспрессию генов, регулирующих различные физиологические функции в организме.

Активация генной сети иммунного ответа. Фактор некроза опухолей TNF- α и интерлейкин IL- β индуцирует NF- κ B – I κ B путь передачи сигнала. NF- κ B находится в цитоплазме в латентной форме в комплексе с I κ B ингибиторами. TNF- α , связываясь со своим рецептором, присоединяет адапторный белок TRADD, TRAF-2 и RIP киназу, действие IL- β опосредованно IL-1R рецептором, адапторным белком MyD88 и IRAK киназой и TRAF-6. Пути передачи сигнала сходятся на NF- κ B киназе, которая в свою очередь активирует I κ B киназный комплекс (IKK). При активации NF- κ B и фосфорилировании его ингибитора I κ B, происходит деградация I κ B 26S протеасомой, NF- κ B транспортируется в ядро, где активирует транскрипцию генов иммунного ответа TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, iNOS. Сигнал от TNF- α передается через I κ B киназный комплекс и посттрансляционную модификацию NF- κ B PKA, PI-3K, MAPK киназами и усиливается редокс-регуляцией.

При стимуляции клетки цитокинами TNF- α и IL-1 β происходит активация НАДФН оксигеназы, фосфолипазы PLA₂ и 5-липоксигеназы зависимости от типа клеток, что приводит к образованию активных форм кислорода и усилению сигнала в данной генной сети. Тиоредоксин перемещается в ядро и индуцирует NF- κ B-зависимую экспрессию генов, восстанавливая ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора. Различные антиоксиданты, в том числе природный антиоксидант восстановленный глутатион (GSH), являются ингибиторами NF- κ B. Глутатион действует как буфер при передаче редокс-сигнала от АФК к генам и подавляет фосфорилирование ингибитора I κ B и экспрессию NF- κ B, индуцируемую TNF- α . Тиоредоксин в цитоплазме блокирует деградацию I κ B.

Фактор некроза опухолей TNF- α модулирует активность транскрипционных факторов. При воспалении индуцируется экспрессия гена нитритсинтетазы iNOS и образуется окись азота (NO), которая ингибирует ДНК-связывающую активность редокс-регулируемого фактора AP-1. NO ингибирует активацию фактора NF- κ B цитокином TNF- α , образуя негативную регуляторную петлю и индуцирует или ингибирует апоптоз в зависимости от концентрации.

Активация генной сети ответа на тепловой шок. Клетки всех организмов отвечают на действие факторов внешней среды, химический и физиологический стресс экспрессией консервативной группы белков, известных как белки теплового шока (HSP). Образование активных форм кислорода вызывает активизацию транскрипционного фактора теплового шока HSF1. HSF1 при действии стресса образует тример, транспортируется в ядро и активирует каскету генов теплового шока, молекулярных шаперонов. Активация HSF1 и индукция белков теплового шока является адаптивным ответом и имеет противовоспалительное действие через ингибирование NF- κ B сигнального пути.

Активация генной сети ответа на гипоксию. Низкая концентрация кислорода (гипоксия) активируют экспрессию ряда генов, таких как гены эритропоэтина, фактора роста VEGF, гемоксигеназы, ферментов гликолиза. В условиях нормоксии TNF- α и IL- β регулируют активацию индуцируемого гипоксией фактора HIF- α через образование АФК. HIF1- α постоянно экспрессируется в клетке и быстро разрушается протеасомой после убиквитинизации. Провоспалительные цитокины стимулируют стабилизацию транскрипционного фактора HIF1- α , его транслокацию в ядро и активацию транскрипции генов. Сигнал к индукции передается через тиоредоксин и редокс-фактор 1. АФК регулируют взаимодействие HIF1- α с коактиватором CBP/p300 и его трансактивационную активность. По-видимому, АФК играют основную роль в активации HIF1- α и служат сенсором кислорода в клетке, хотя существуют противоположные мнения.

Активация генной сети антиоксидантной защиты. Редокс-регуляция представляет собой динамический процесс, поддерживающий баланс между образованием АФК,

оксидантов, и антиоксидантов и обеспечивающий поддержание гомеостаза. TNF- α индуцирует экспрессию гена *MnSOD* митохондриальной супероксиддисмутазы, обеспечивающую антиоксидантную защиту клетки. При повышении уровня АФК подавляется экспрессия генов эндогенной системы образования АФК. NRF2, nuclear respiratory factor 2, регулирует экспрессию ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, участвующие в окислительном фосфорилировании, включая субъединицы IV and Vb цитохром с оксидазы, и митохондриальный транскрипционный фактор 1. ДНК-связывающая активность и экспрессия генов ингибируется в условиях окислительного стресса и восстанавливается тиоредоксином, что служит механизмом регуляции образования АФК в митохондриях.

Глутатион– тиольный трипептид-антиоксидант γ -Glu-Cys-Gly, может быть в окисленной (GSSG) или в восстановленной форме (GSH). Соотношение между этими двумя формами определяет, главным образом, окислительно-восстановительный потенциал клетки. Транскрипционный фактор Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) определяет уровень глутатиона и тиоредоксина в клетке. Механизм активации Nrf2 осуществляется на нескольких уровнях. Nrf2 усиливает экспрессию своего гена, но в цитоплазме Nrf2 быстро разрушается через убиквитин-зависимый путь. Фосфорилирование Nrf2 протеинкиназой C в ответ на действие индукторов, вызывающих окислительный стресс, приводит к повышению стабильности белка и его активности. Цитоплазматический Keap1, негативный регулятор Nrf2, служит сенсором окислительного стресса. Редокс-зависимое освобождение Nrf2 от его ингибитора и транспорт транскрипционного фактора в ядро обеспечивает координированную экспрессию генов ферментов фазы 2 и биосинтеза глутатиона, защищающих клетку от токсического и канцерогенного действия оксидантов и электрофилов.

Активация генной сети катаболизма железа. Экспрессия гена гемоксигеназы при действии медиаторов воспаления возрастает при переходе восстановленного тиоредоксина в ядро и активации транскрипционного фактора AP-1. Стрессовый белок гемоксигеназа является ключевым ферментом распада гема до биливердина, окиси углерода и железа. Биливердин и его продукт билирубин являются антиоксидантами, тогда как железо усиливает окислительный стресс. Экспрессия гена гемоксигеназы защищает клетку от окислительного стресса и индуцируется оксидантами, включая ее субстрат гем. Механизм активации гемом обеспечивается стабилизацией Nrf2, его накоплением в ядре, где он, образуя димер с MafG, связывается с стресс-регулируемыми элементами StREs и активирует транскрипцию гена. Освобождающееся железо захватывается ферритином, экспрессия которого также регулируется транскрипционным фактором Nrf2. Редокс-статус клетки модулирует экспрессию гена на уровне транскрипции и трансляции. Редокс-регулируемые белки IRP-1 и IRP-2 контролируют синтез ферритина и рецептора трансферрина, связываясь с IRE элементами, локализованными в 5', 3'-нетранслируемых областях их мРНК. При воспалении происходит обратимое ингибирование РНК-связывающей активности IRP-2 окисью азота NO и восстановление ее тиоредоксином, что является еще одним примером координированной экспрессии генов при редокс-регуляции.

Активация генной сети апоптоза или ареста клеточного цикла. Образование АФК регулируется генной сетью антиоксидантной защиты, однако, высокие дозы вызывают АФК-индуцируемый апоптоз в различных клетках при воспалении. Плейотропный цитокин TNF- α вызывает апоптоз, связываясь со своим рецептором и активируя прокаспазу-8, и через образование АФК митохондриями. Окислительный стресс стабилизирует транскрипционный фактор p53 и модулирует экспрессию p53-регулируемых генов. Редокс-регулируемая активация p53 вызывает арест клеточного цикла в G1 фазе и подавление пролиферации клеток через ингибитор циклин-зависимых киназ p21. Арест клеточного цикла дает время для синтеза ферментов антиоксидантной защиты и репарации ДНК, тогда как значительные повреждения ДНК вызывают апоптоз.

p53 активирует транскрипцию генов многих проапоптозных белков, в том числе функционирующих в митохондриях Bax, Puma, NOXA. p53 индуцирует транслокацию проапоптозного белка bax, формирующего поры, в митохондрию, высвобождение цитохрома c. Цитохром c и фактор, активирующий апоптозные протеазы Araf-1, в составе апоптосомы активируют прокаспазу 9 и каспазный каскад, осуществляющий апоптоз.

Редокс-регулируемый p53 активирует транскрипцию генов *PIG1* - *PIG12* (p53-induced genes), связанных с образованием АФК в клетке. Экспрессия гена *PIG3* приводит к увеличению продукции АФК митохондрией. Образование высоких доз АФК вызывает изменение $\Delta\psi$ потенциала митохондриальной мембраны и апоптоз.

Активация каскада редокс-регулируемых генных сетей, объединенных общим путем передачи сигнала, инициируется при воспалении. При активации общего пути передачи сигнала через АФК происходит обмен информацией между различными генными сетями, что приводит к усилению или подавлению ответа на действие сигнала.

В генной сети редокс-регуляции происходит активация ряда генных сетей. Генная сеть редокс-регуляции, получая через входную систему рецепции возбуждающий ее сигнал, перерабатывает его и распределяет по своим выходам, возбуждая связанные с ней генные сети, каждая из которых, в свою очередь, может передавать возбуждающий сигнал на одну или несколько других генных сетей.

Изучение генных сетей, описанных в базе данных GeneNet, позволило нам сформулировать концепцию интерференции генных сетей. Интерференция генных сетей - это прохождение возбуждения по определенному домену глобальной генной сети организма, приводящее к последовательному возбуждению ряда генных сетей. Интерференция генных сетей может приводить к координированной экспрессии генных сетей, либо к подавлению одной генной сетью функционирования другой. Для организации интерференции генных сетей в глобальной генной сети организма существуют генные сети - интеграторы. Таким образом, генные сети-интеграторы могут рассматриваться как ключевые элементы, обеспечивающие передачу сигнала в глобальной генной сети всего организма.

Сложные регуляторные сети исследуются во многих областях науки, в биохимии, нейробиологии, экологии, инженерном деле. Особенность реальных генных сетей является свойство «малого мира», лежащее в основе даже больших метаболических сетей. Высокая кластеризация и наличие близких связей между узлами генной сети характерно и для генной сети редокс-регуляции. Связь между транскрипционными факторами, узлами генных сетей со многими связями, осуществляется через тиоредоксин и Ref-1. Белок-белковые взаимодействия обеспечивают быстрый ответ генных сетей и усиление сигнала при действии внешнего фактора через образование АФК.

Системная компьютерная биологии: прикладные и фундаментальные аспекты

Трансгенез: конструирование трансгенов и трансгеномов

Генно-инженерные модификации могут быть использованы для решения широкого круга биотехнологических и селекционно-генетических задач. По-видимому, возможности изменения самых разных морфофизиологических или биохимических характеристик растений и животных ограничены только уровнем наших знаний о межгенных взаимодействиях и генных сетях. Планирование генно-инженерного эксперимента должно в первую очередь заключаться в построении схемы модификаций генома, которые должны привести к желаемому эффекту на уровне фенотипа. Это сложная задача, для решения которой необходимо проанализировать большой объем информации в различных областях биологии. Фактически, необходимо научиться определять, какие генно-инженерные модификации – будь то перенос трансгенов, инактивация или модуляция паттерна экспрессии генов растения-реципиента или комбинации различных воздействий приведут к желаемому результату. Одним из перспективных подходов, позволяющих

решать проблему планирования генно-инженерного эксперимента, являются базы данных генных сетей, сигнальных и метаболических путей, в которых накапливаются и систематизируются сведения о регуляции экспрессии генов, путей передачи сигналов и об участии различных ферментов и субстанций в процессе синтеза того или иного вещества в организме.

Изучение организации генных сетей, описанных в базе данных GeneNet, позволяет выделить несколько принципов их организации:

1. Наличие в каждой локальной генной сети «центральных» генов, обеспечивающих координацию функций остальных генов этой сети;
2. Наличие в каждой генной сети регуляторных контуров типа положительной и отрицательной обратных связей, обеспечивающих ее авторегуляцию;
3. Существование небольшого разнообразия мотивов, обеспечивающих функционирование транскрипционных регуляторных сетей;
4. Иерархическая организация локальных генных сетей и их интеграция в глобальную генную сеть организма.