

*Математическое моделирование  
регуляторных механизмов поддержания  
плюрипотентности и дифференцировки  
эмбриональных стволовых клеток мыши*

Петрова К.О. , кафедра информационной  
биологии, 4 курс бакалавриата  
Научный руководитель: к.б.н., н.с. **Акбердин И.Р.**

# Эмбриональные стволовые клетки

## Свойства ЭСК:

- Самообновление
- Плюрипотентность



Winslow T., Duckwall C., 2001

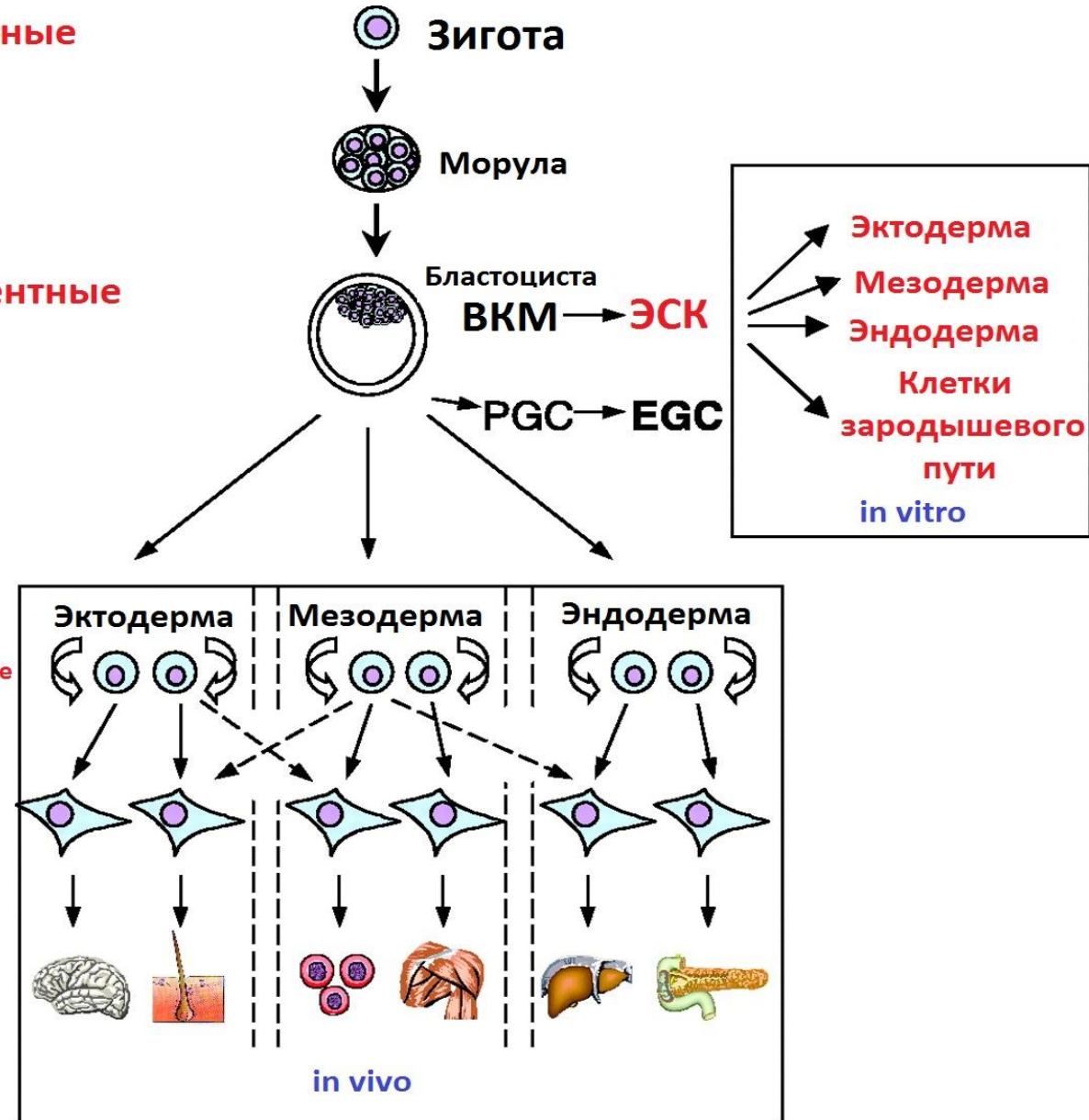
Тотипотентные

Плюрипотентные

Мультипотентные

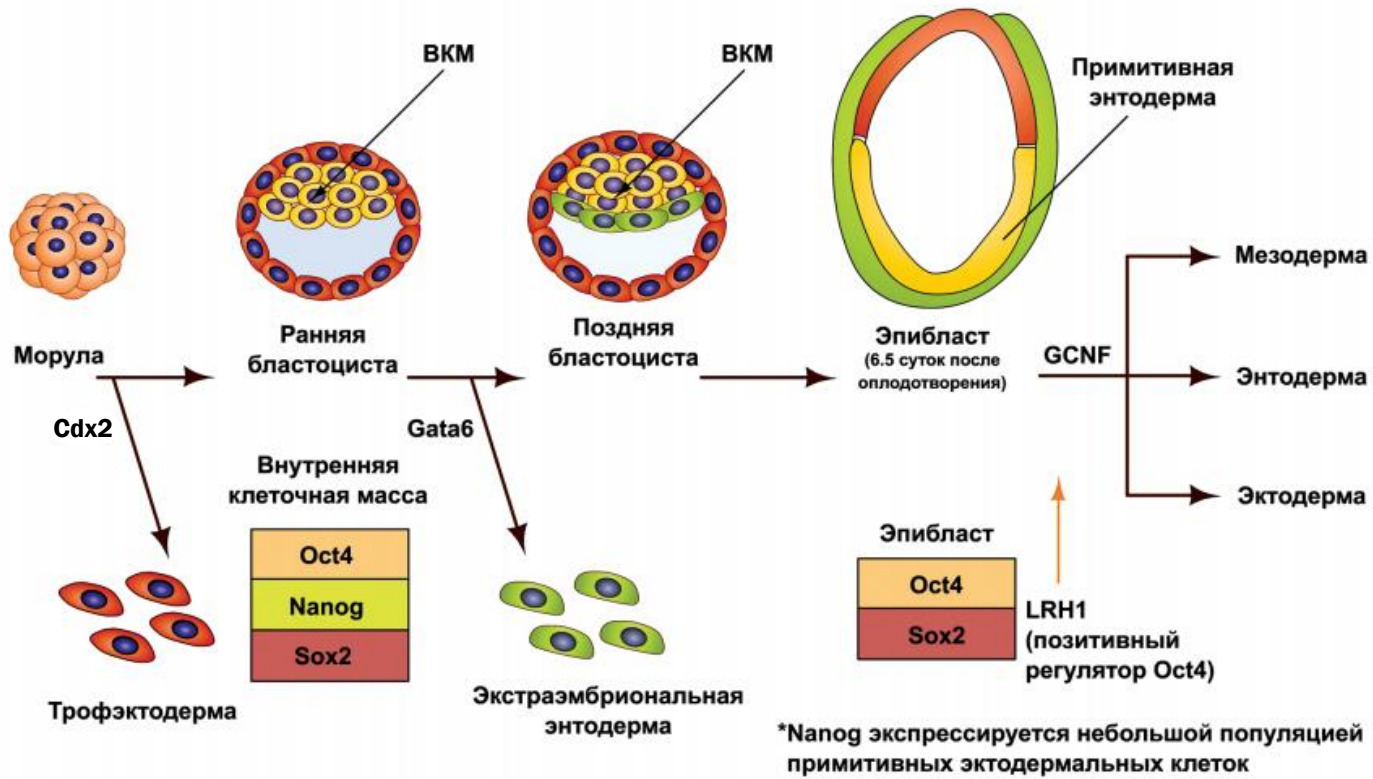
Прогениторные

Органы



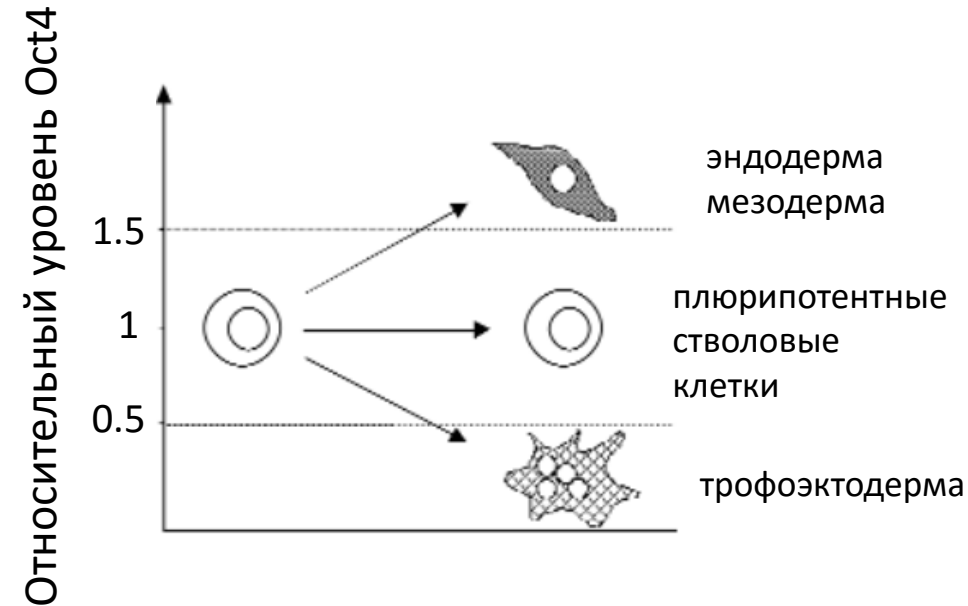
Wobus A. M., Boheler K. R., 2005

# Изменение экспрессии транскрипционных факторов в процессе эмбрионального развития



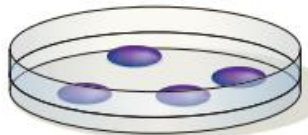
Григорян А. С., Кругляков П. В., 2008

**Cdx2↑ Oct4↓ - трофэктодерма**  
**Gata6↑ Nanog↓ - примитивная энтодерма**



Niwa H., et al., 2000

# Индукированные плюрипотентные стволовые клетки



Фибробласты

Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc



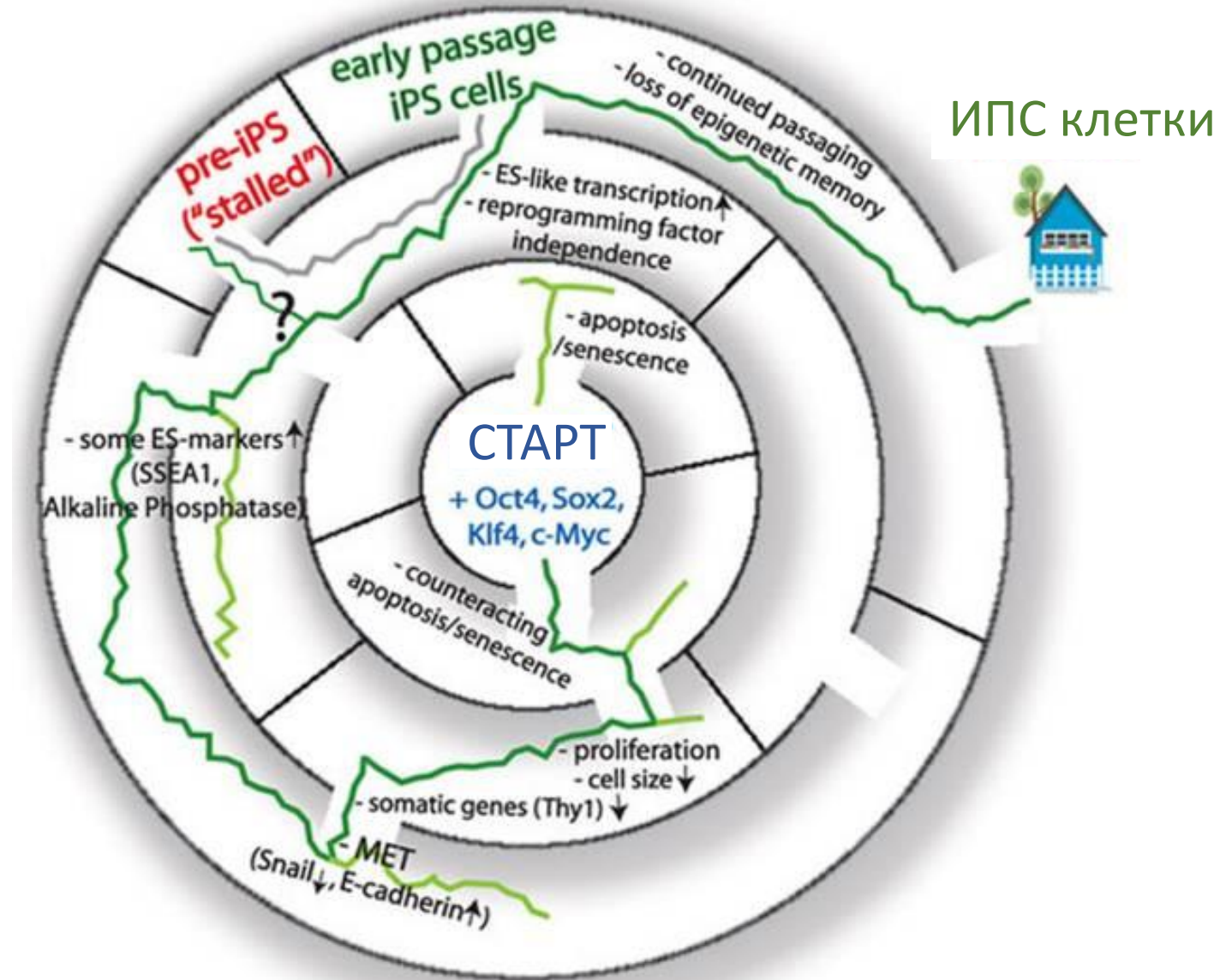
Селекция и рост в культуре



ИПС клетки

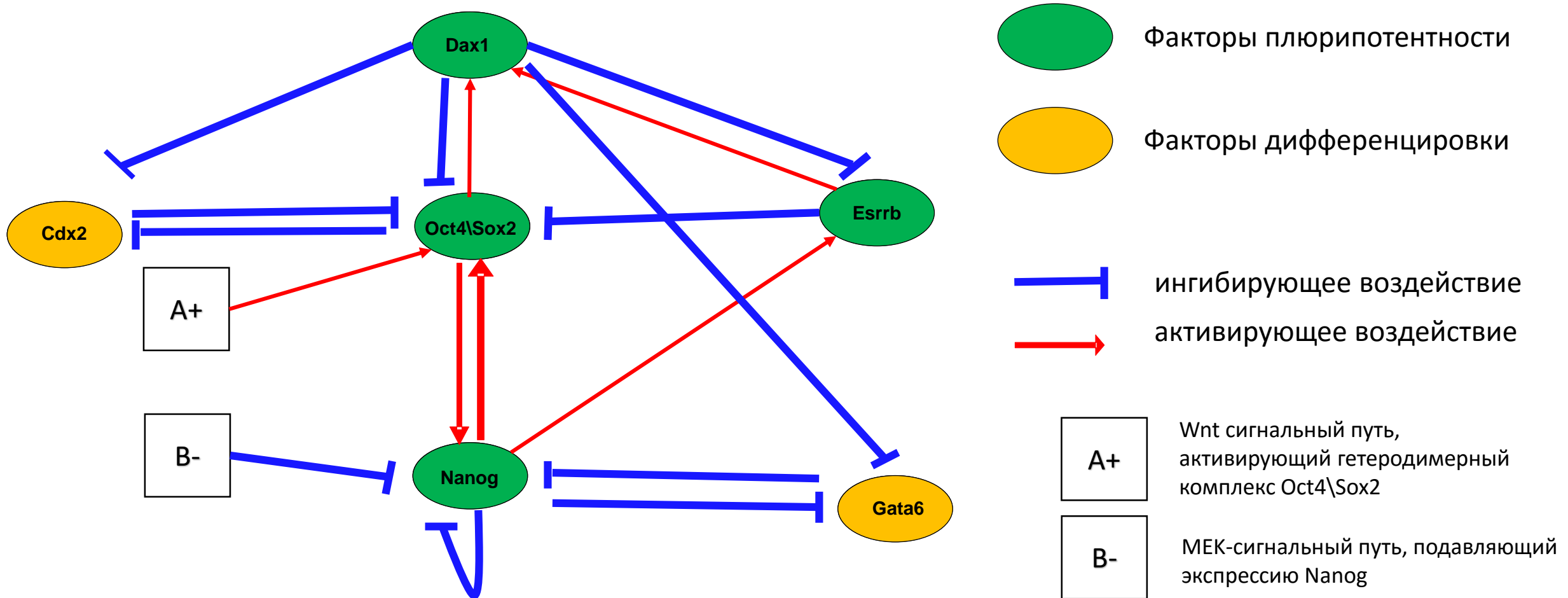
Takahashi K., Yamanaka S., 2006

Rossant J., 2007



Papp B., Plath K., 2011

# Регуляторная генная сеть



Бабич М. Д., 2015

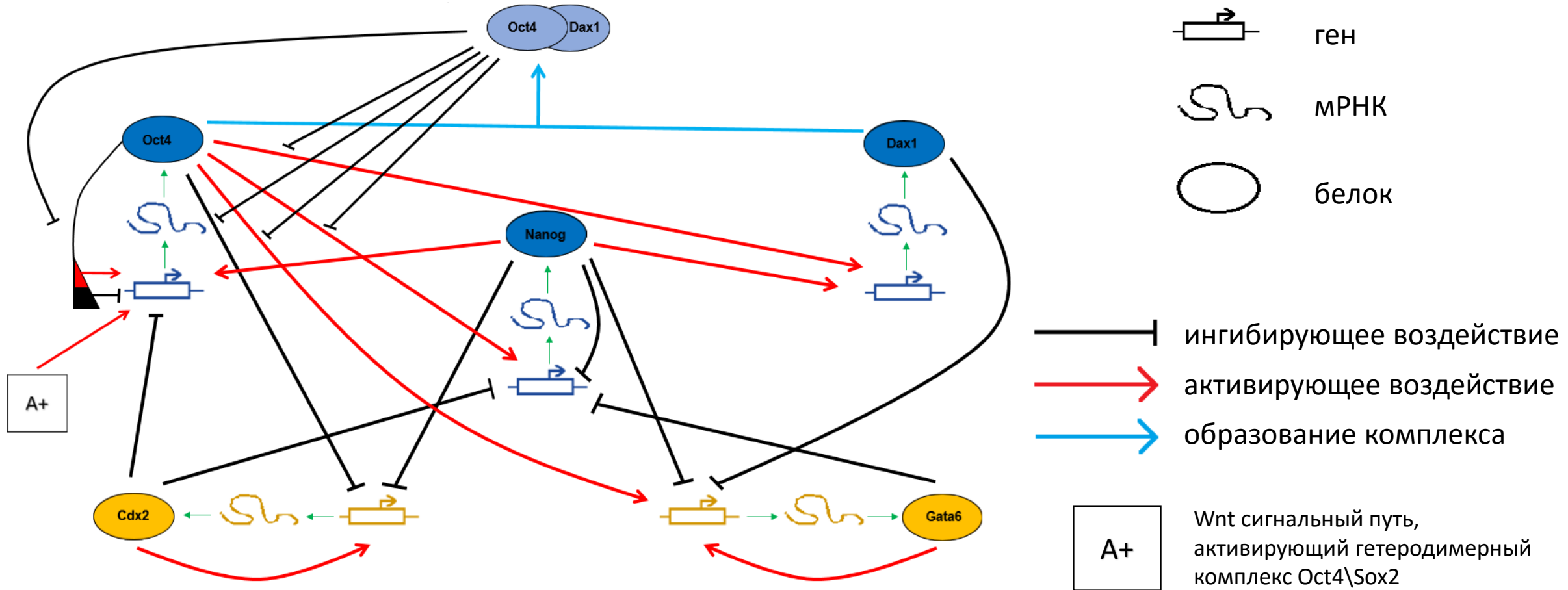
# Цель исследования:

Выявление роли дополнительных механизмов регуляции при репрограммировании дифференцированных клеток и поддержании плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток мыши.

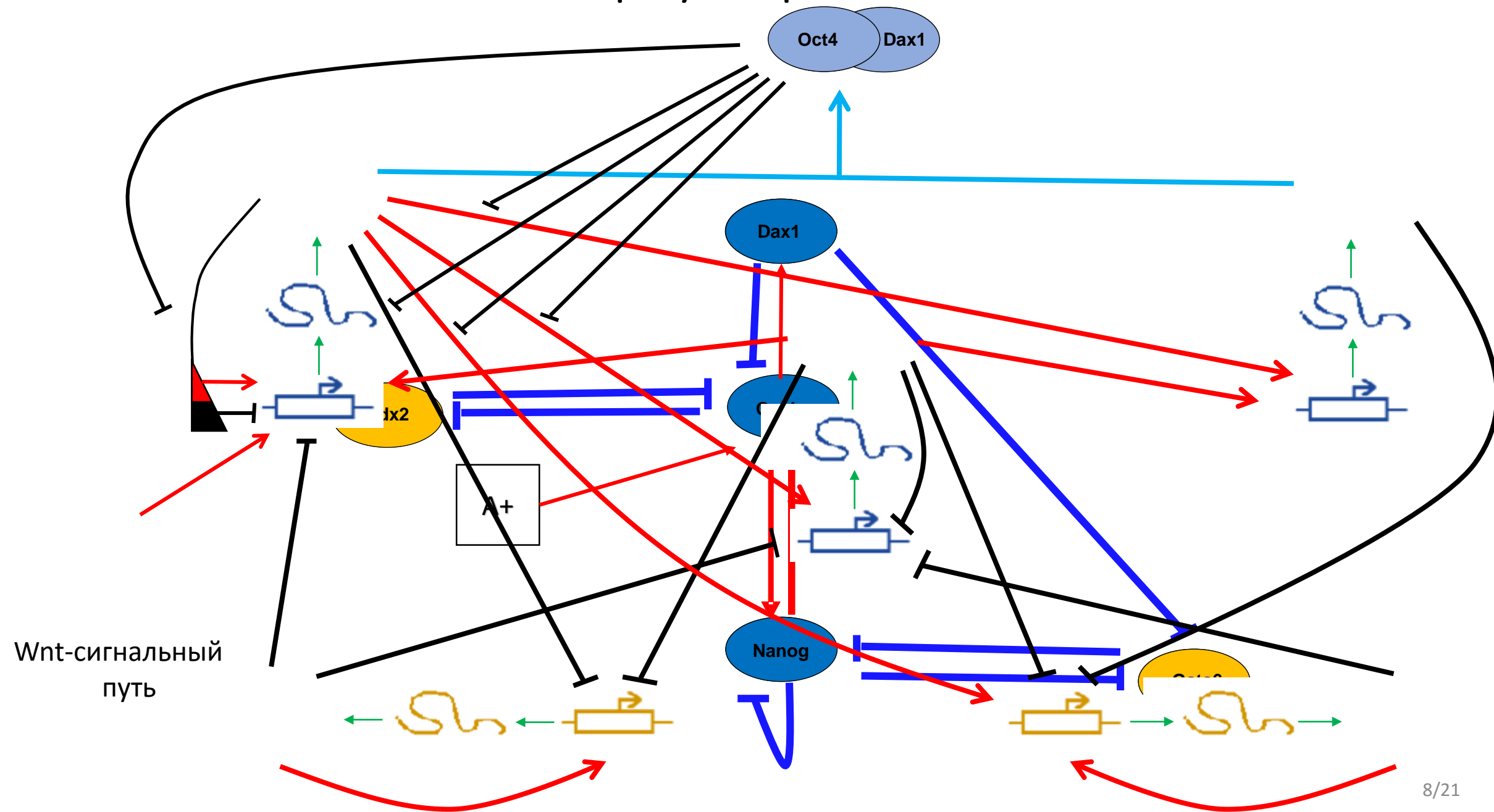
## Задачи:

- Анализ литературных данных о механизмах поддержания плюрипотентности и дифференцировки мЭСК, поиск соответствующих кинетических параметров;
- Реконструкция регуляторной геновой сети, включающей базовые и дополнительные механизмы поддержания плюрипотентности и дифференцировки мЭСК;
- Построение динамической модели, ее анализ и биологическая интерпретация полученных результатов.

# Новая регуляторная генная сеть



# Новая регуляторная генная сеть





# Метод моделирования: обобщенные функции Хилла

$$H_c(x_1, \dots, x_k) = \frac{k_0 + \sum_{\alpha_1 \dots \alpha_k} \left( \frac{x_1}{k_{\alpha_1}} \right)^{h_{\alpha_1}} \dots \left( \frac{x_k}{k_{\alpha_k}} \right)^{h_{\alpha_k}}}{k_1 + \sum_{\beta_1 \dots \beta_k} \left( \frac{x_1}{k_{\beta_1}} \right)^{h_{\beta_1}} \dots \left( \frac{x_k}{k_{\beta_k}} \right)^{h_{\beta_k}}}, \quad k_0, k_1, k_{\alpha_j}, h_{\alpha_j}, k_{\beta_j}, h_{\beta_j} \geq 0$$

$x_i$  – концентрация  $i$ -ого компонента системы (например, Nanog, Oct4, Dax1 и т.д.);

$k_0$  – безразмерный параметр, определяющий функционирование моделируемого процесса при всех  $x_i=0$  или константа конститутивного синтеза;

$k_1$  – безразмерный нормированный параметр, принимающий значение 0 либо 1;

$k_{\alpha_i}, k_{\beta_i}$  – константы эффективности влияния  $i$ -ого компонента системы на функционирование моделируемого процесса;

$h_{\alpha_i}, h_{\beta_i}$  – константы, характеризующие степень нелинейности влияния  $i$ -ого компонента системы на функционирование моделируемого процесса.

# Реконструированная система дифференциальных уравнений

## мРНК

конститутивные влияния факторов

$$\frac{d[M_G]}{dt} = \frac{K g_G \left( k0_G + d_{GG} \left( \frac{[G]}{K a_{GG}} \right)^{h_G} + d_{GO} \left( \frac{[O]}{K a_{GO}} \right)^{h_O} \right)}{1 + \left( \frac{[N]}{K i_{GN}} \right)^{h_N} + \left( \frac{[D]}{K i_{GD}} \right)^{h_D} + \left( \frac{[G]}{K a_{GG}} \right)^{h_G} + w_{GODO} \left( \frac{[O]}{K a_{GO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[DO]}{K i_{GDO}} \right)^{h_{DO}}} - k_{deg_{M_G}} [M_G]$$

$$\frac{d[M_D]}{dt} = \frac{K g_D \left( k0_D + d_{DO} \left( \frac{[O]}{K a_{DO}} \right)^{h_O} + d_{DN} \left( \frac{[N]}{K a_{DN}} \right)^{h_N} \right)}{1 + \left( \frac{[N]}{K a_{DN}} \right)^{h_N} + \left( \frac{[O]}{K a_{DO}} \right)^{h_O} + w_{DODO} \left( \frac{[O]}{K a_{DO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[DO]}{K i_{DDO}} \right)^{h_{DO}}} - k_{deg_{M_D}} [M_D]$$

$$\frac{d[M_C]}{dt} = \frac{K g_C \left( k0_C + d_{CODO} * w_{CODO} \left( \frac{[O]}{K i_{CO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[DO]}{K a_{CDO}} \right)^{h_{DO}} + d_{CC} \left( \frac{[C]}{K a_{CC}} \right)^{h_{CC}} \right)}{1 + \left( \frac{[O]}{K i_{CO}} \right)^{h_O} + \left( \frac{[C]}{K a_{CC}} \right)^{h_C} + w_{CON} \left( \frac{[O]}{K i_{CO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[N]}{K i_{CN}} \right)^{h_N} + w_{CODO} \left( \frac{[O]}{K i_{CO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[DO]}{K a_{CDO}} \right)^{h_{DO}}} - k_{deg_{M_C}} [M_C]$$

$$\frac{d[M_N]}{dt} = \frac{K g_N \left( k0_N + d_{NO} \left( \frac{[O]}{K a_{NO}} \right)^{h_O} \right)}{1 + \left( \frac{[O]}{K a_{NO}} \right)^{h_O} + \left( \frac{[N]}{K i_{NN}} \right)^{h_N} + \left( \frac{[G]}{K i_{NG}} \right)^{h_G} + \left( \frac{[C]}{K i_{NC}} \right)^{h_C} + w_{NODO} \left( \frac{[O]}{K a_{NO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[DO]}{K i_{NDO}} \right)^{h_{DO}}} - k_{deg_{M_N}} [M_N]$$

$$\frac{d[M_O]}{dt} = \frac{K g_O \left( k0_O + k_A * A + d_{OO} \left( \frac{[O]}{K a_{OO}} \right)^{h_O} + d_{OON} * w_{OON} \left( \frac{[O]}{K a_{OO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[N]}{K a_{ON}} \right)^{h_N} \right)}{1 + A + \left( \frac{[O]}{K a_{OO}} \right)^{h_O} + \left( \frac{[C]}{K i_{OC}} \right)^{h_C} + w_{OON} \left( \frac{[O]}{K a_{OO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[N]}{K a_{ON}} \right)^{h_N} + w_{ODO1} \left( \frac{[O]}{K a_{OO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[DO]}{K i_{ODO}} \right)^{h_{DO}}} * \frac{1 + d_{ODO} * w_{ODO2} \left( \frac{[O]}{K i_{OO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[DO]}{K a_{ODO}} \right)^{h_{DO}}}{1 + \left( \frac{[O]}{K i_{OO}} \right)^{h_O} + w_{ODO2} \left( \frac{[O]}{K i_{OO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[DO]}{K a_{ODO}} \right)^{h_{DO}}} - k_{deg_{M_O}} [M_O]$$

[i] – концентрация белка  
 [M<sub>i</sub>] – концентрация мРНК  
 K g<sub>i</sub> – константа скорости транскрипции  
 k0<sub>i</sub> – уровень базальной транскрипции  
 d<sub>ij</sub> – константа максимального уровня транскрипции  
 M<sub>C</sub> – мРНК *Cdx2*  
 w<sub>ij</sub> – константа эффективности совместного влияния  
 M<sub>O</sub> – мРНК *Oct3/4*  
 K i<sub>ij</sub>, K a<sub>ij</sub> – константы эффективности влияния  
 h<sub>ij</sub> – степень нелинейности влияния  
 k<sub>deg<sub>M<sub>i</sub></sub></sub> – константа деградации

влияние комплекса Oct4-Dax1

деградация  
 кооперативное воздействие

двойственность влияния Oct4

# Реконструированная система дифференциальных уравнений (2)

## Белки

синтез белков      деградация

$$\begin{aligned} \frac{d[C]}{dt} &= k_C[M_C] - k_{deg_C}[C] \\ \frac{d[G]}{dt} &= k_G[M_G] - k_{deg_G}[G] \\ \frac{d[N]}{dt} &= k_N[M_N] - k_{deg_N}[N] \\ \frac{d[D]}{dt} &= k_D[M_D] + k_{DO}^-[DO] - k_{DO}^+[D][O] - k_{deg_D}[D] \\ \frac{d[O]}{dt} &= k_O[M_O] + k_{DO}^-[DO] - k_{DO}^+[D][O] - k_{deg_O}[O] \\ \frac{d[DO]}{dt} &= k_{DO}^+[D][O] - k_{DO}^-[DO] - k_{deg_{DO}}[DO] \end{aligned}$$

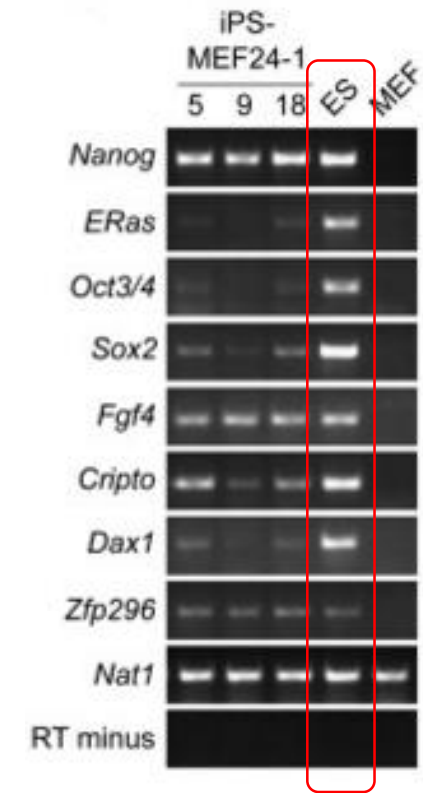
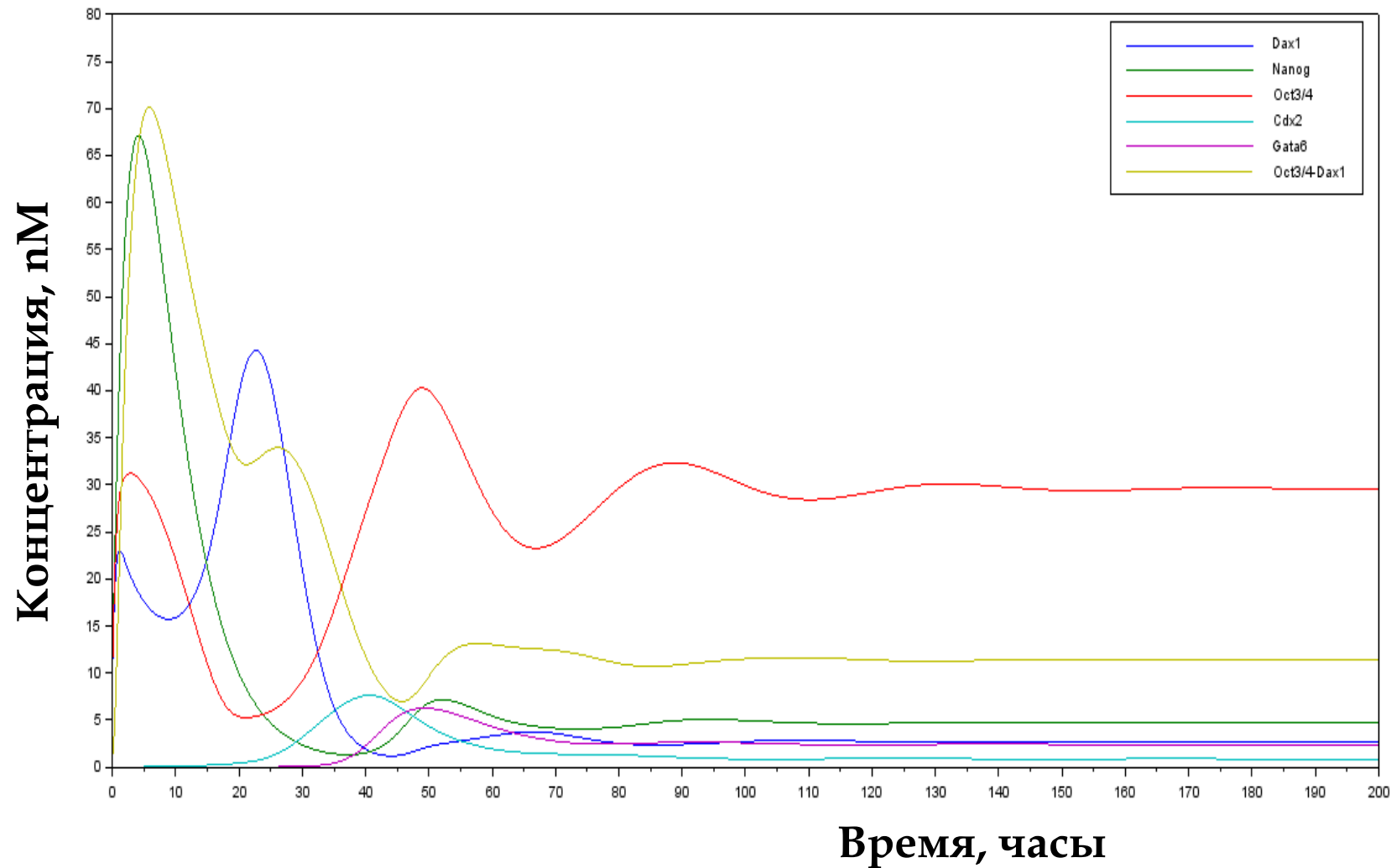
ассоциация и диссоциация комплекса

C – Cdx2  
 G – Gata6  
 N – Nanog  
 D – Dax1  
 O – Oct3/4  
 DO – белковый комплекс Dax1-Oct3/4

$[i]$  – концентрация белка  
 $[M_i]$  – концентрация мРНК  
 $k_i$  – константа скорости трансляции  
 $k_{DO}^-$  – константа ассоциации комплекса  
 $k_{DO}^+$  – константа диссоциации комплекса  
 $k_{deg_i}$  – константа деградации белков

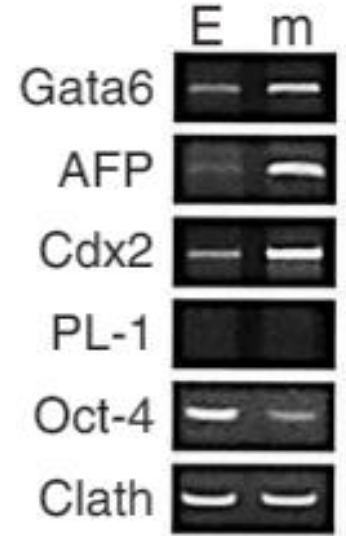
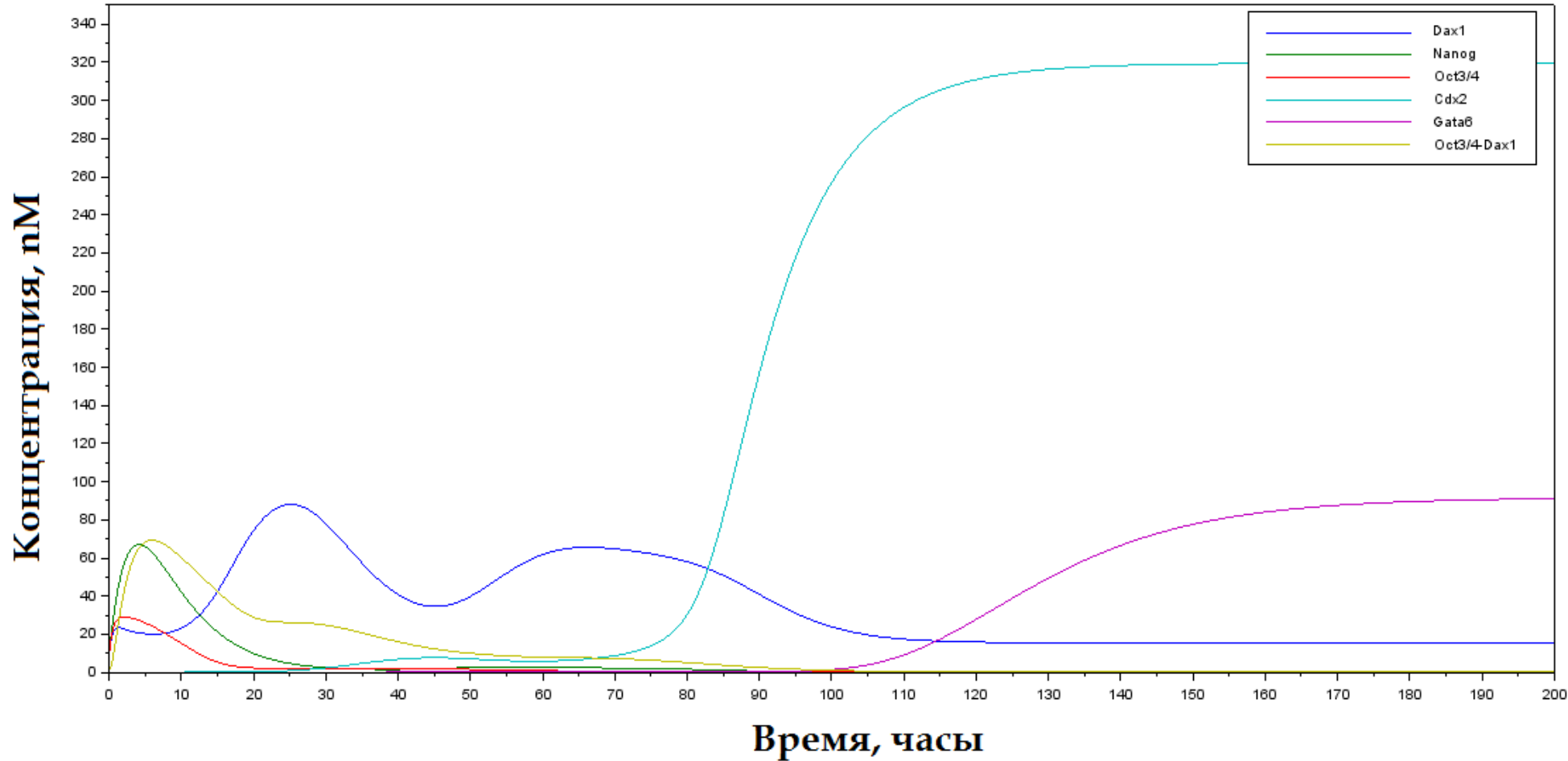


# Экспрессия генов при плюрипотентном состоянии ЭСК



RT-PCR маркерных генов ЭСК  
Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006

# Переход плюрипотентного состояния в дифференцированное (трофоэктодерма)

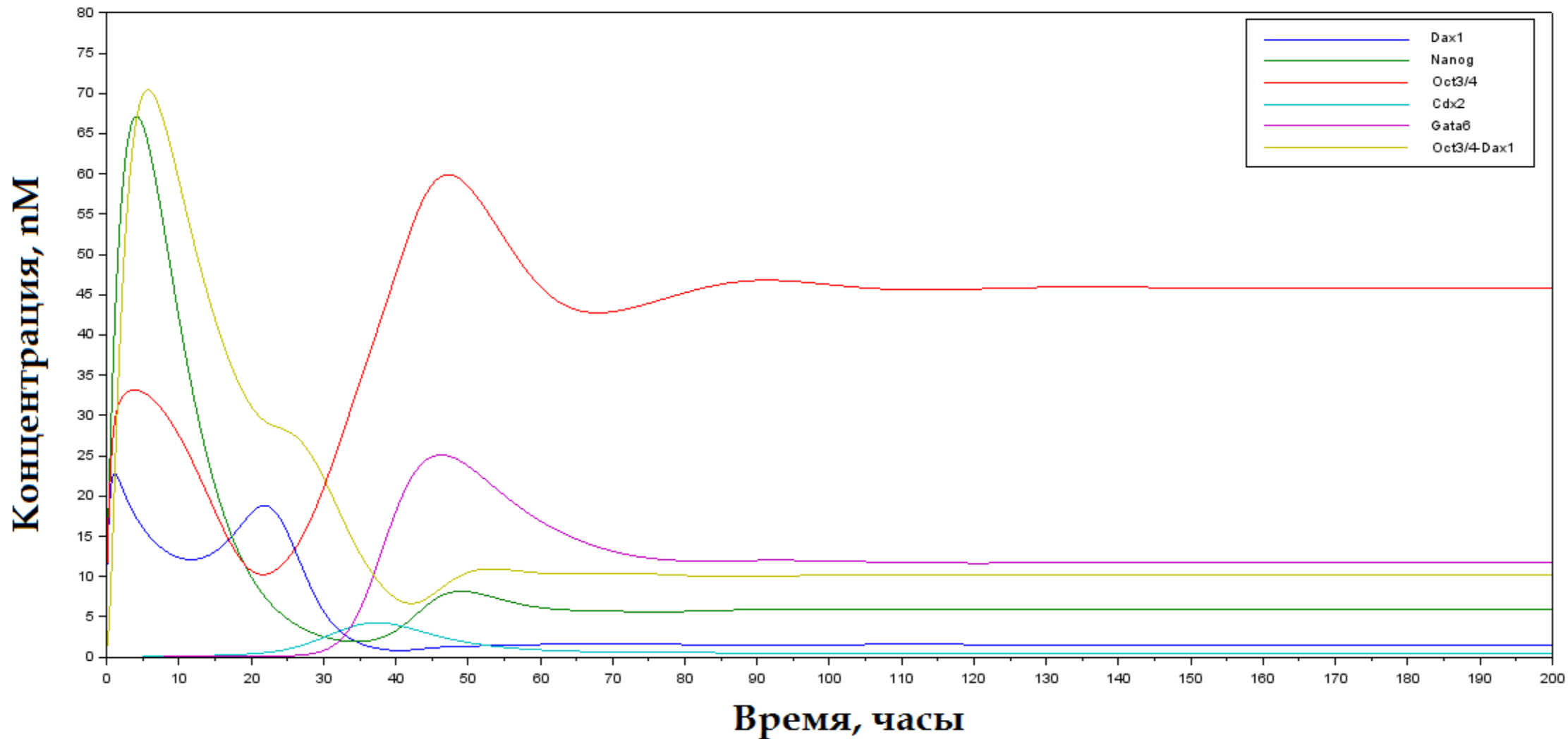


## RT-PCR

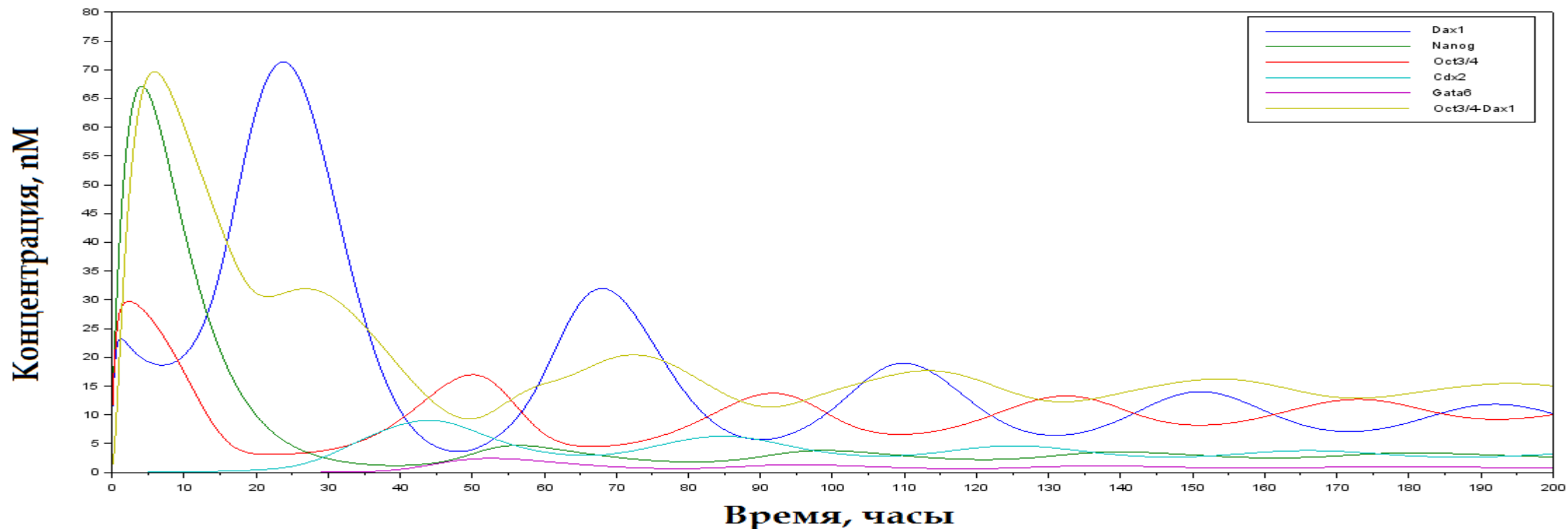
E – трансфекция  
миРНК EGFP  
m – трансфекция  
миРНК Oct4

Hay, D. C., et. al., 2004

# Переход плюрипотентного состояния в дифференцированное (энтодерма)



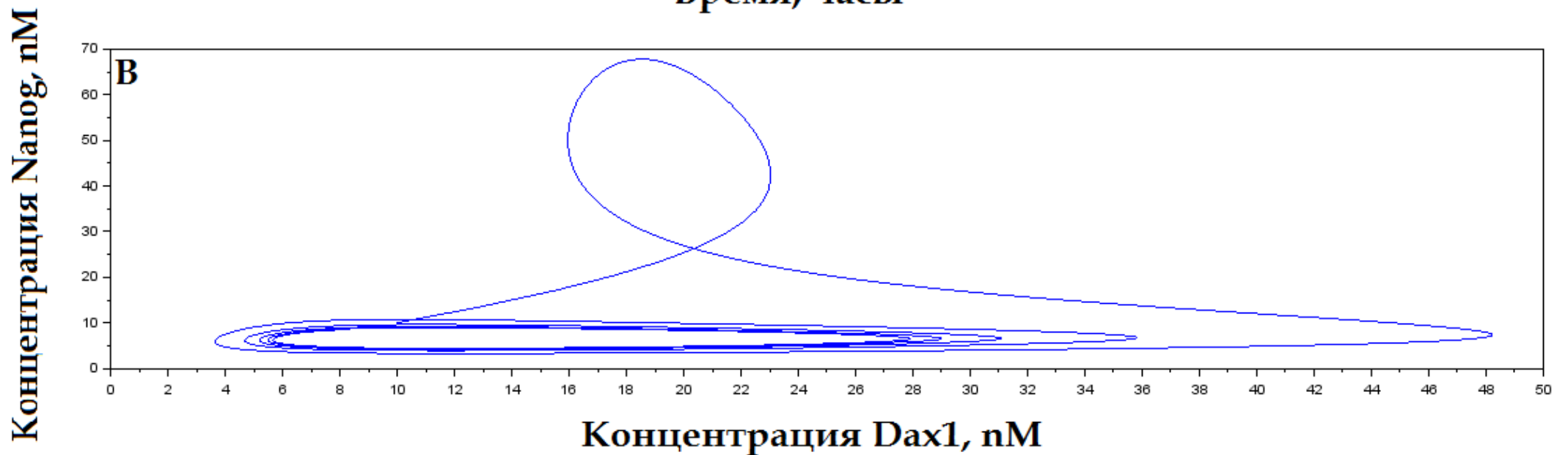
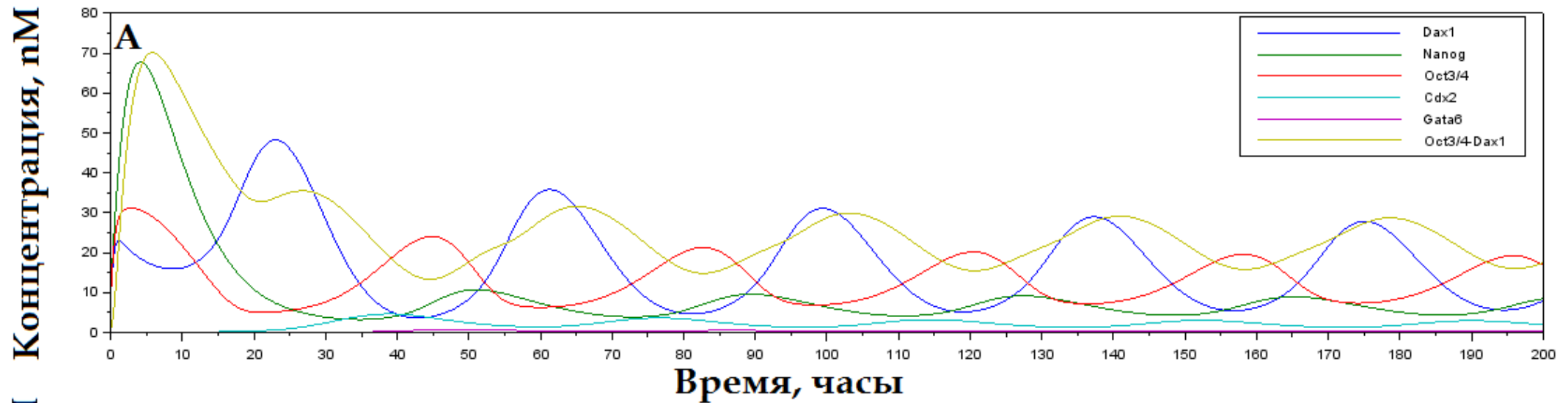
# Переход плюрипотентного состояния в дифференцированное



Goolam, M., et. al. Heterogeneity in Oct4 and Sox2 Targets Biases Cell Fate in 4-Cell Mouse Embryos // Cell. – 2016. – N. 165. – P. 61-74.

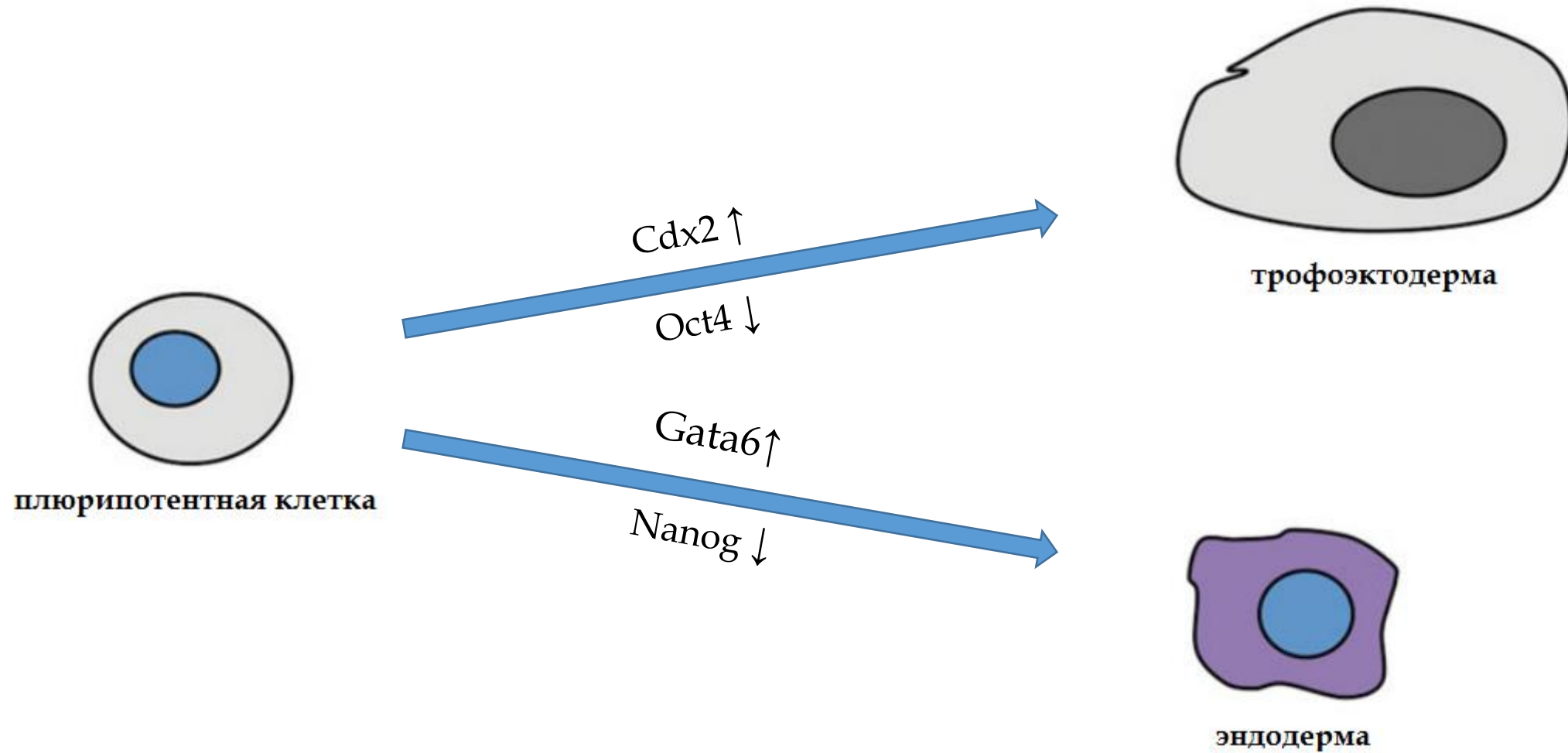
White, M. D., et. al. Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo // Cell. – 2016. – N. 165. – P. 75-87.

# Экспрессия генов при плюрипотентном состоянии ЭСК

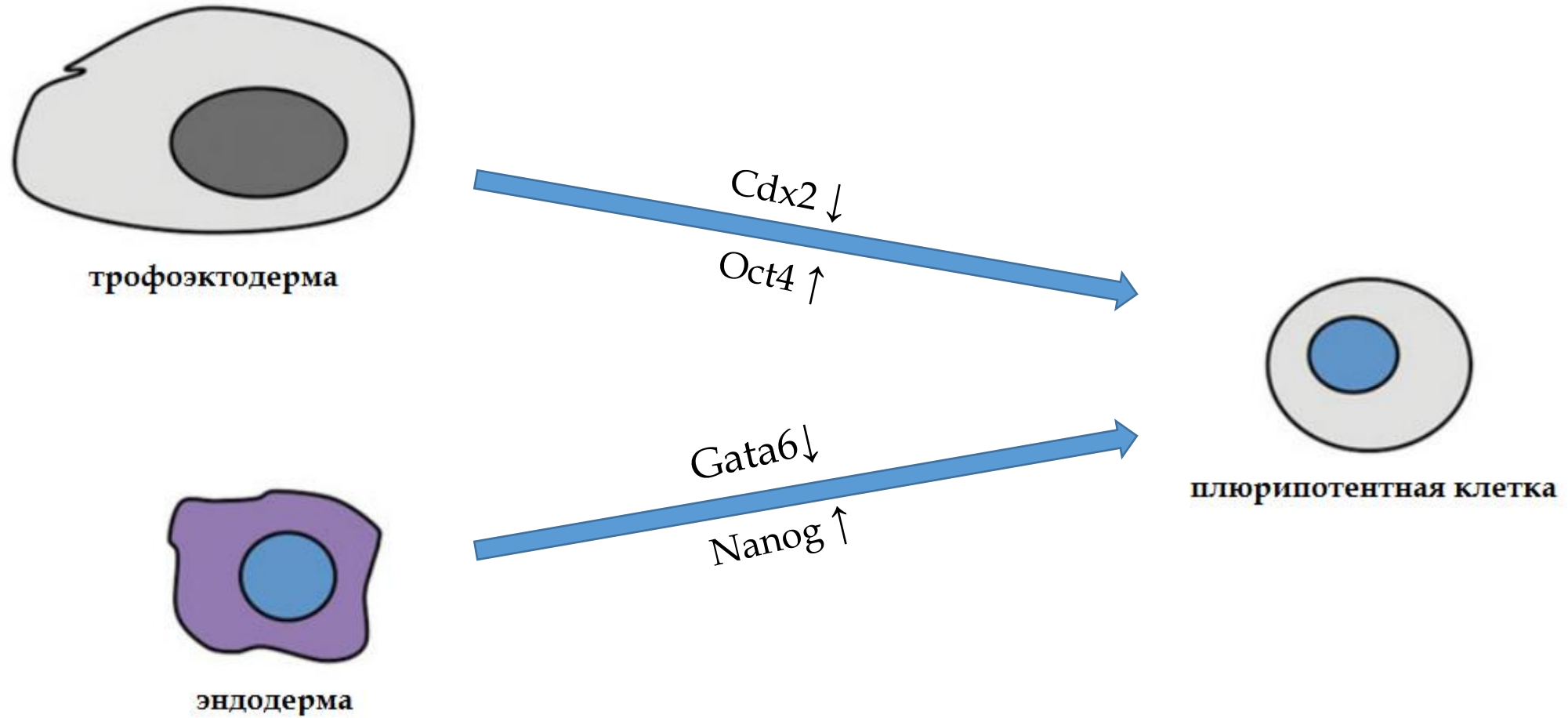




# Дифференцировка плюрипотентных клеток

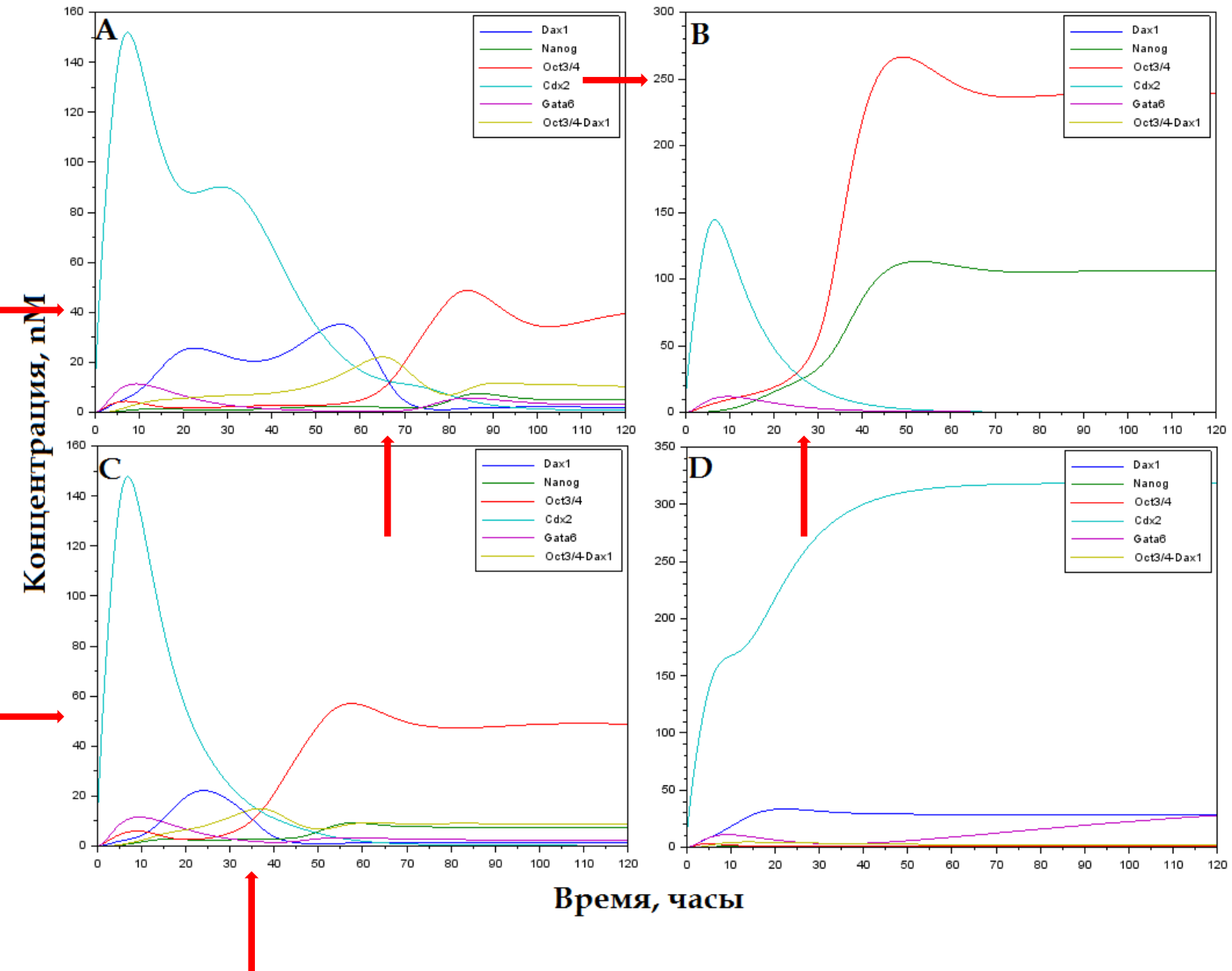


# Переход из дифференцированного состояния в плюрипотентное



Niwa, H., et. al., 2005  
Chickarmane, V., et. al., 2008

# Влияние Dax1 на динамику перехода при репрограммировании



А – репрограммирование из трофоэктодермального состояния  
В – репрограммирование в системе без Dax1  
С – репрограммирование при пониженном уровне экспрессии *Dax1*  
D – при повышенном уровне экспрессии *Dax1* переключение между состояниями не происходит

# Выводы (1)

1. В результате численного анализа разработанной модели было показано, что уменьшение значения внешнего активирующего сигнала приводит к переходу из плюрипотентного состояния в трофоэктодермальное за счет повышения экспрессии фактора Cdx2.
2. Параметрический анализ модели также показал, что для перехода из плюрипотентного состояния в эндодермальный путь развития необходимо не только ослабление активирующего воздействия среды культивирования, но и дополнительная активация транскрипции и трансляции фактора Gata6, что согласуется с ранними экспериментальными и теоретическими исследованиями.

# Выводы (2)

3. Разработанная модель предсказывает, что как эмбриональная стволовая клетка при дифференцировке, так и дифференцированная клетка при индукции плюрипотентности могут «проходить» ряд промежуточных функциональных состояний, которые характеризуются гетерогенной экспрессией факторов плюрипотентности и дифференцировки в культуре эмбриональных стволовых клеток.
4. Полномасштабный анализ чувствительности модели выявил, что при дифференцировке эмбриональных стволовых клеток мыши/их репрограммировании в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки эффективнее подавлять/активировать экспрессию *Nanog* (эндодерма), соответственно, и активировать/ингибировать экспрессию *Cdx2* (трофоэктодерма), соответственно.

Спасибо за внимание!