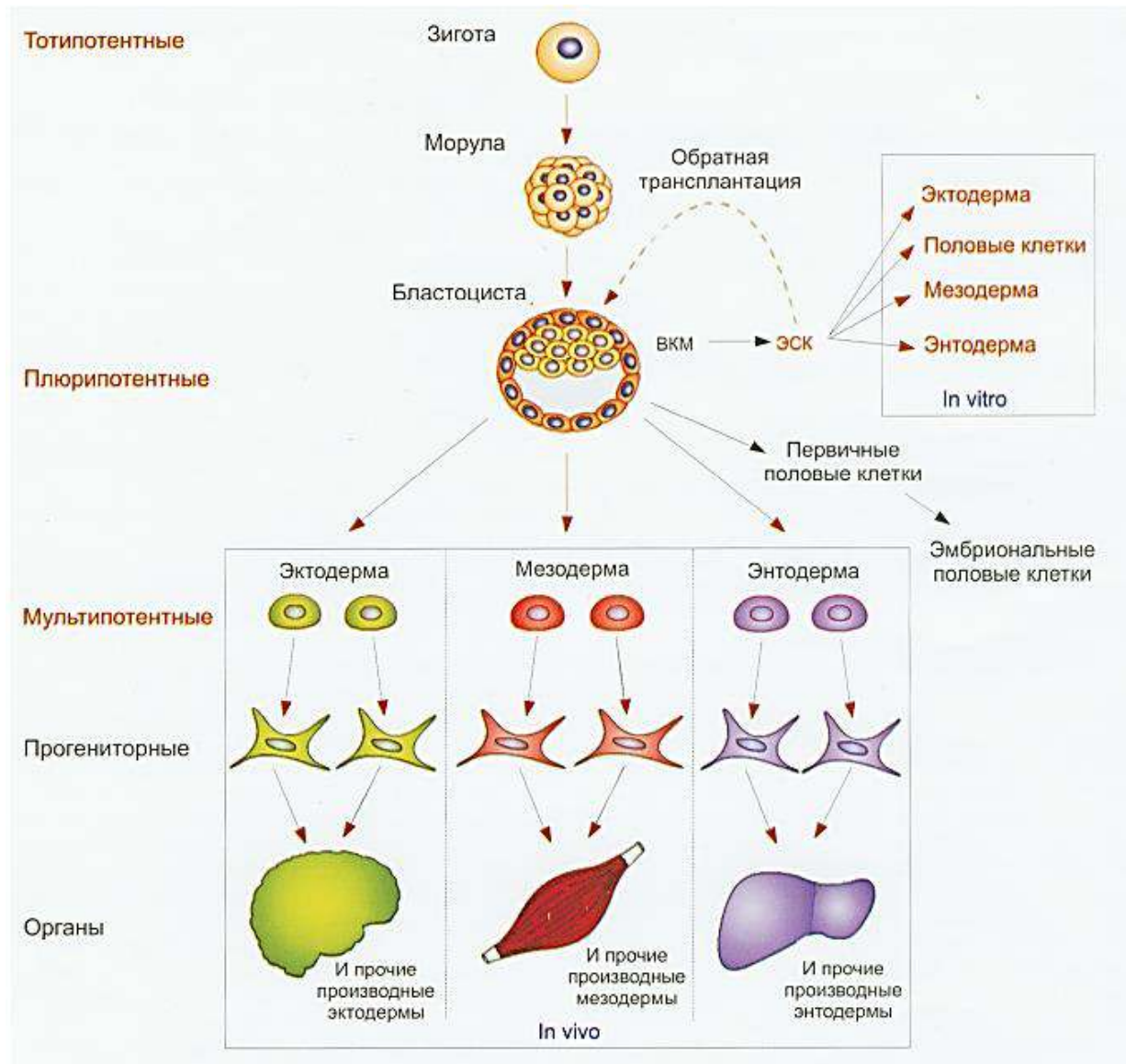


**Математическое моделирование
переходных состояний эмбриональных
стволовых клеток с использованием
современных данных полногеномного
секвенирования РНК**

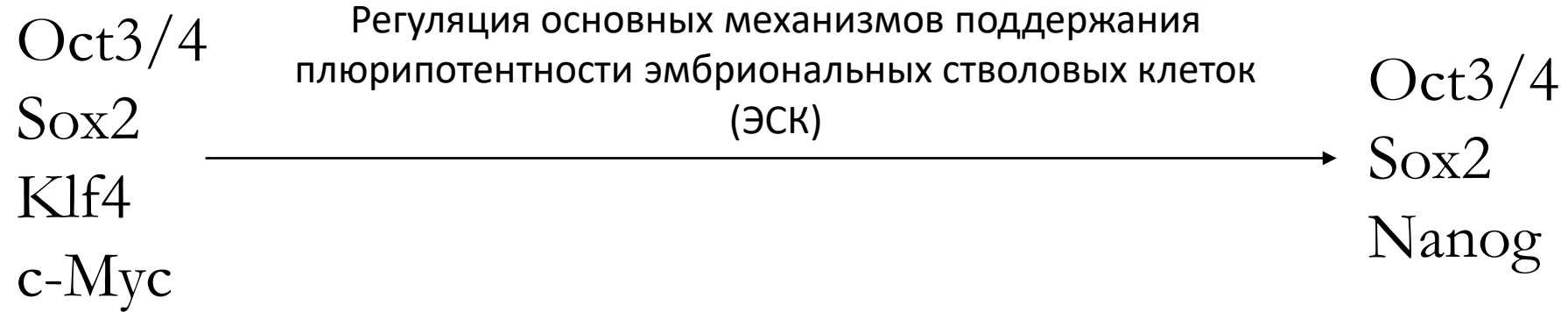
**Бабич М.Д., кафедра информационной биологии
Научный руководитель: к.б.н., н.с. Акбердин И.Р.**

Эмбриональные стволовые клетки: основные свойства



Григорян А.С., Кругляков П.В. Эмбриональные стволовые клетки
мышцы как модельный объект исследований эмбриональных
стволовых клеток.

Влияние транскрипционных факторов



“Коктейль Яманаки”

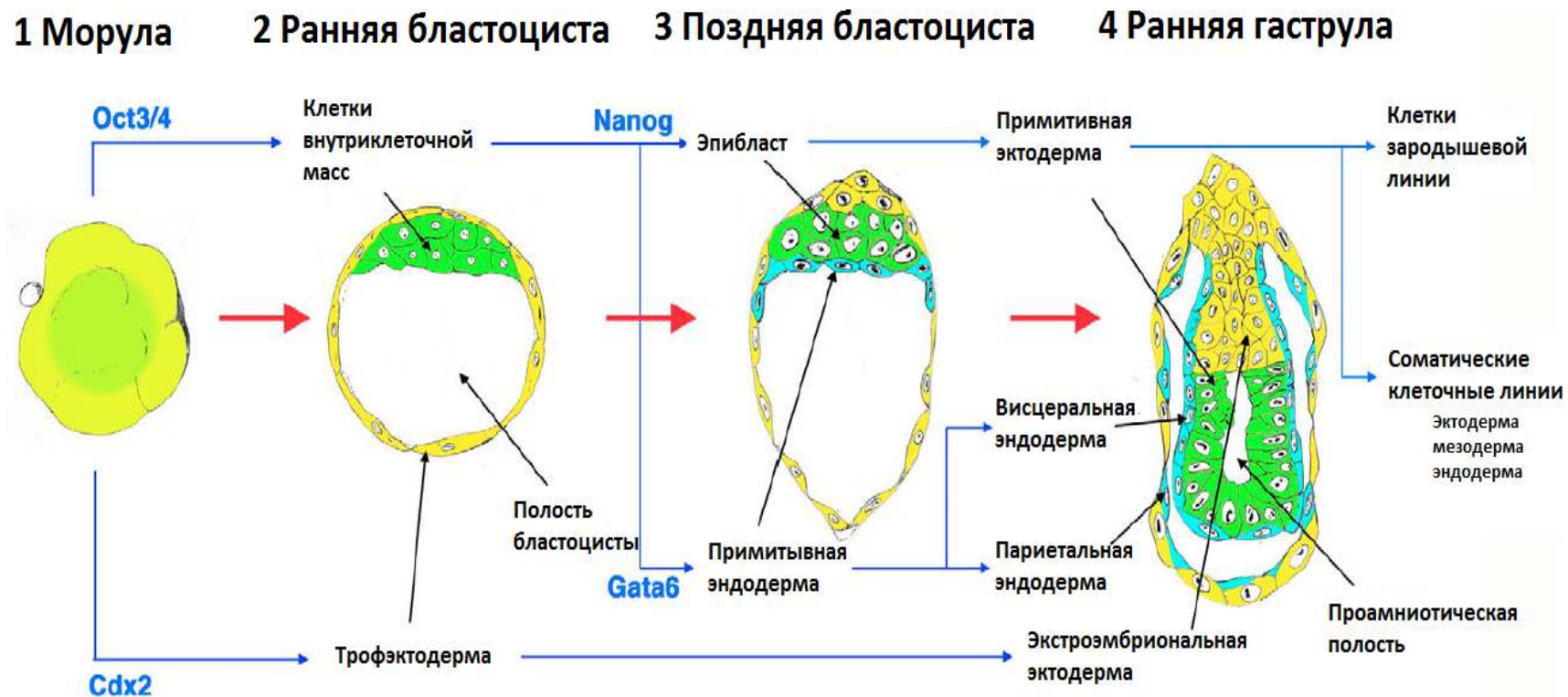
Takahashi&Yamanaka, 2006

“Коровая сеть плюрипотентности”

Niwa, 2007

Jaenisch&Young, 2008

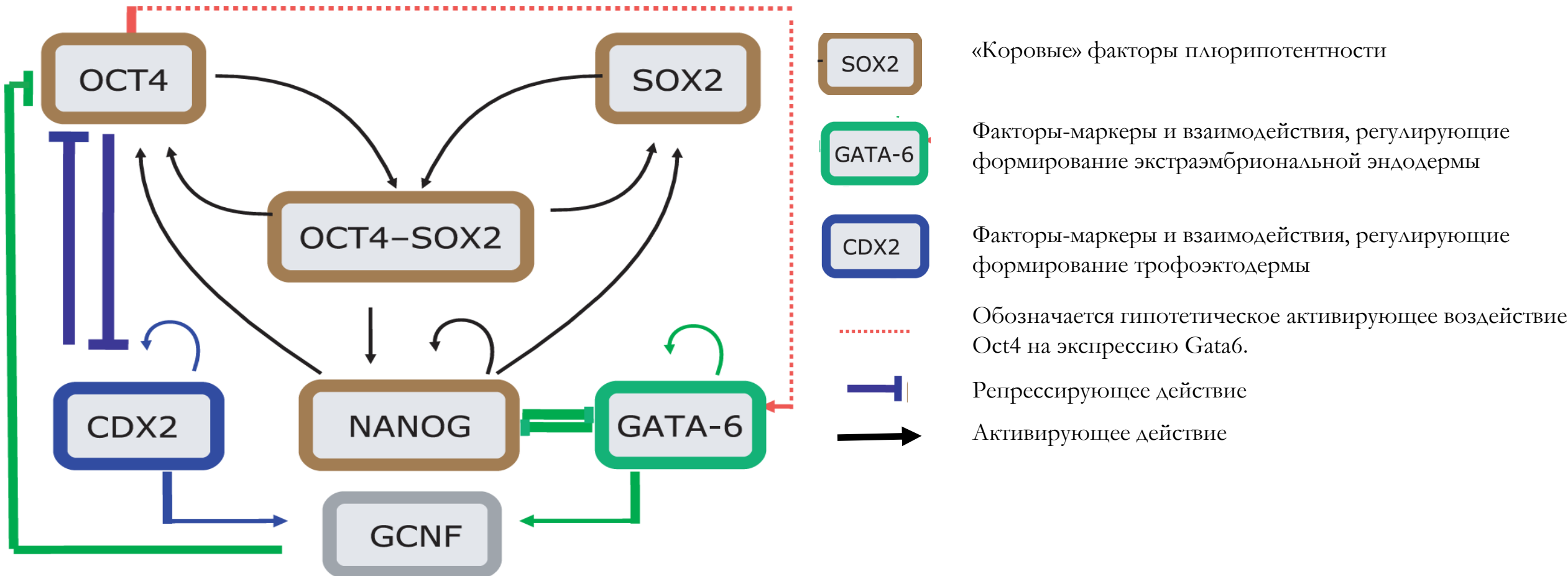
Развитие эмбриона перед имплантацией



Niwa, 2007

EPI – клетки эпибласта
 PE – клетки примитивной энтодермы
 TE – трофэктодермальные клетки

Математическая модель взаимодействия «коровых» транскрипционных факторов ЭСК:

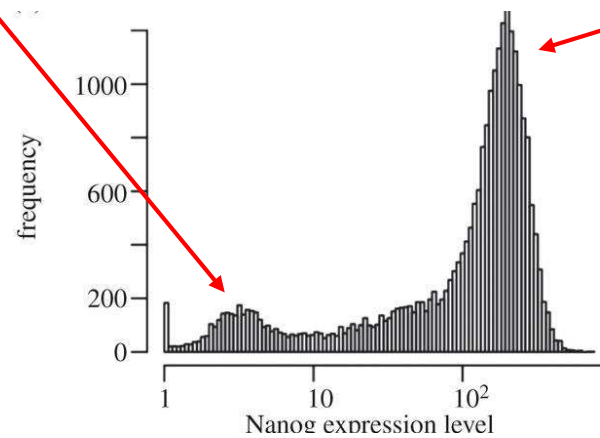


Нерешенный вопрос:

Гетерогенность в экспрессии Nanog

?

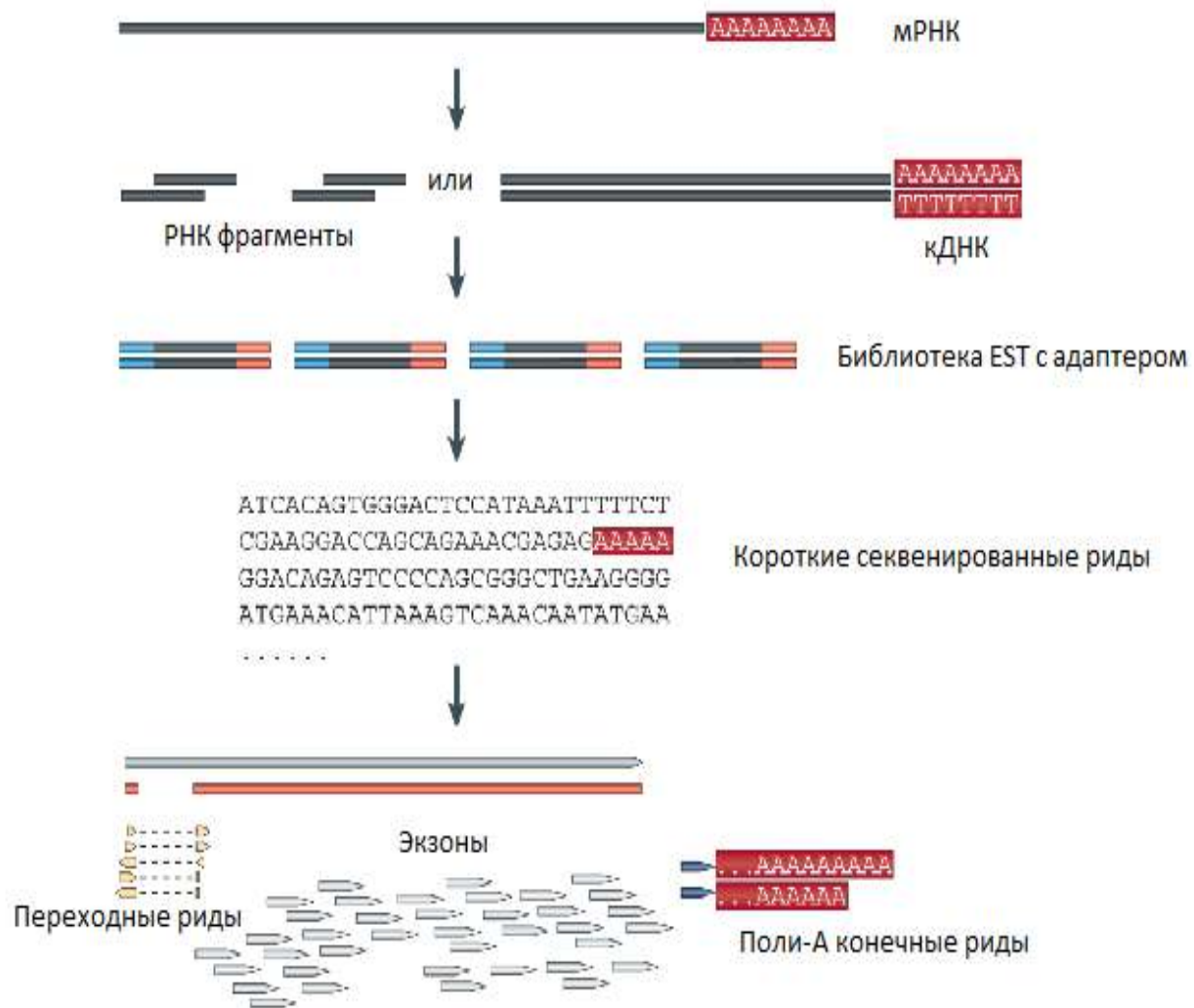
Nanog^{low} ← → Nanog^{high}



Luo *et al.*, 2012

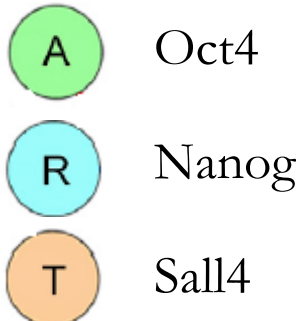
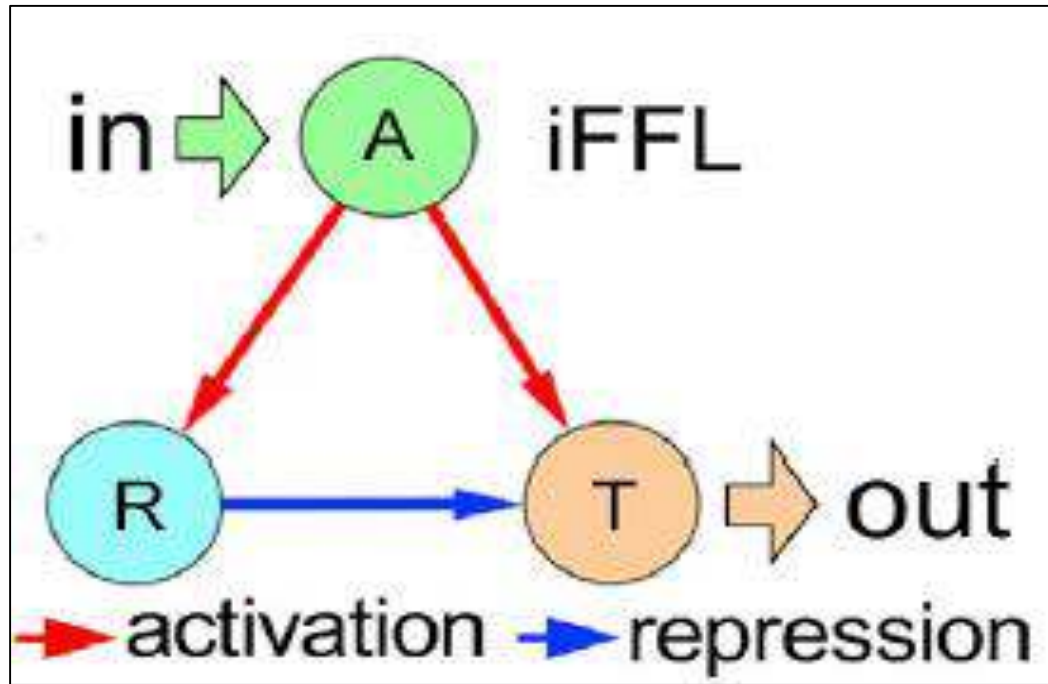
Распределение экспрессии Nanog в единичной ЭСК

Метод секвенирования РНК

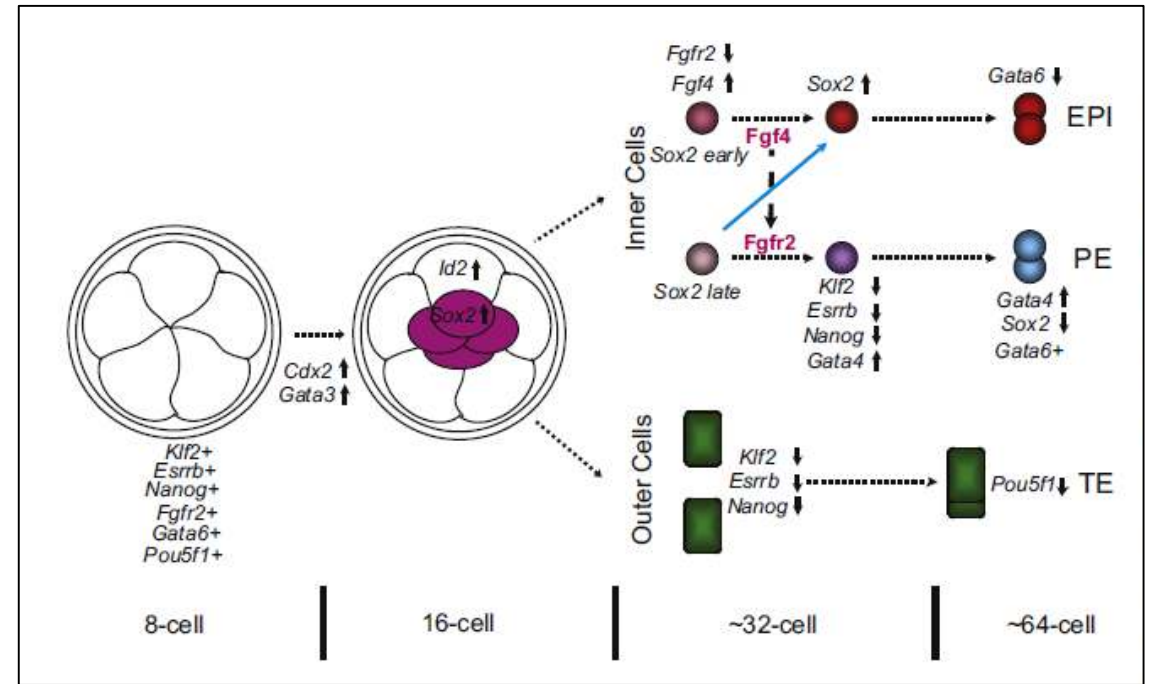


Wang Z. *et al.*, 2009

Взаимная регуляция между факторами Oct4, Nanog и Sall4.



Papatsenko, 2015



Guo, 2010

Цель исследования:

Исследование динамики регуляторной сети, полученной на основе полногеномных данных секвенирования РНК в единичной клетки, методами математического моделирования.

Задачи:

- Статистический анализ экспериментальных данных полногеномного секвенирования РНК в единичной ЭСК.
- Реконструкция и анализ математической модели поддержания плюрипотентности и дифференцировки мЭСК;
- Биологическая интерпретация полученных результатов моделирования.

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 (Nanog, Oct4, Sox2, Dax1 и т.д., например);

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 -го компонента системы на функционирование моделируемого процесса;

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



Исследуемая модель

$$\frac{dOct4}{dt} = \frac{k_{Oct4} + k_A * A}{1 + A} - k_1 * x_1$$

$$\frac{dNanog}{dt} = \frac{k_{Nanog} + c * (x_1/k_{22})^h}{1 + (x_1/k_{22})^h + w_1 (x_1/k_{24})^h (x_2/k_{25})^h} - k_2 * x_2$$

$$\frac{dSall4}{dt} = \frac{k_{Sall4} + c * (x_1/k_{33})^h}{1 + (x_1/k_{33})^h + (x_2/k_{34})^h} - k_3 * x_3$$

$k_1 - k_3$ - константы деградации, 1/мин

$k_{Oct4}, k_{Nanog}, k_{Sall4}$ - константы базального уровня транскрипции, mM/мин

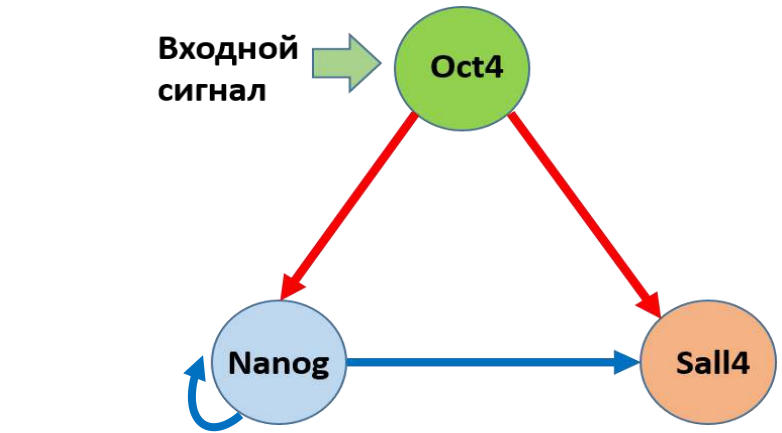
h - Константа степени нелинейного влияния компонентов системы на функционирование процесса, безразмерная

c - константа эффективности активации соответствующих т.ф., безразмерная

k_{ij} - константы эффективности влияния факторов друг на друга, 1/mM

A - константа входного сигнала, безразмерная

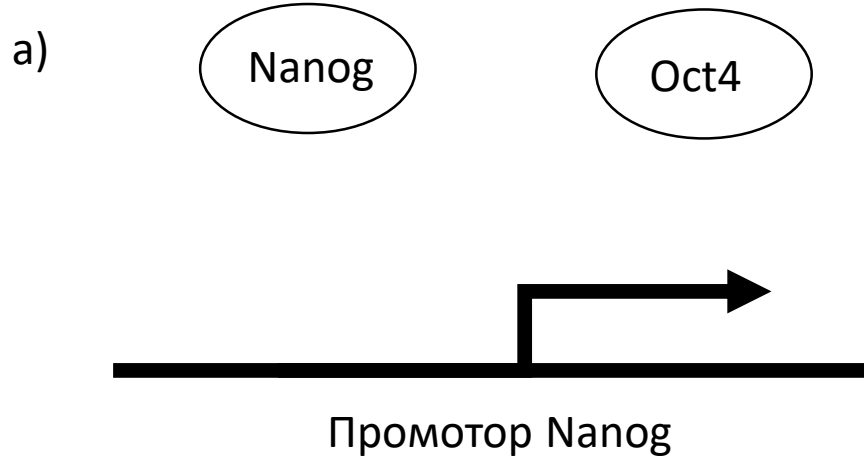
x_1, x_2, x_3 - концентрация т.ф. Oct4, Nanog, Sall4



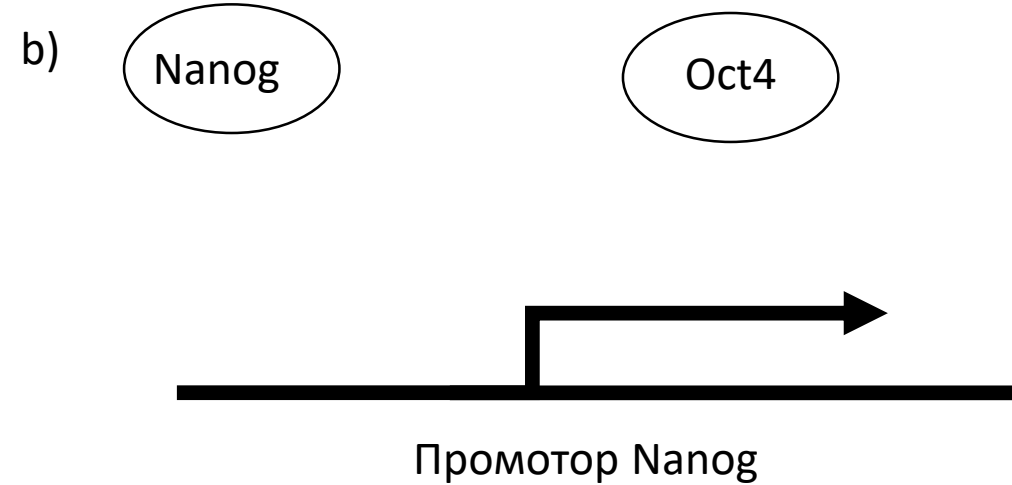
k_A - константа эффективности активирующего воздействия входного сигнала A , безразмерная

w_1 - константа кооперативного действия Oct4 и Nanog, безразмерная

Два вида связывания с промотором Nanog

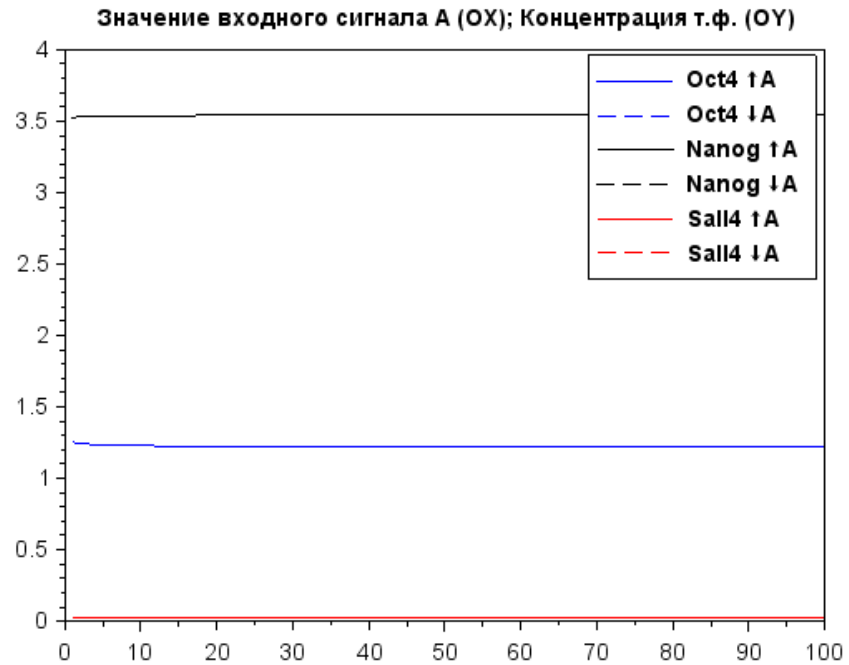


Независимое связывания Nanog со своим сайтом, конкурентное взаимодействие



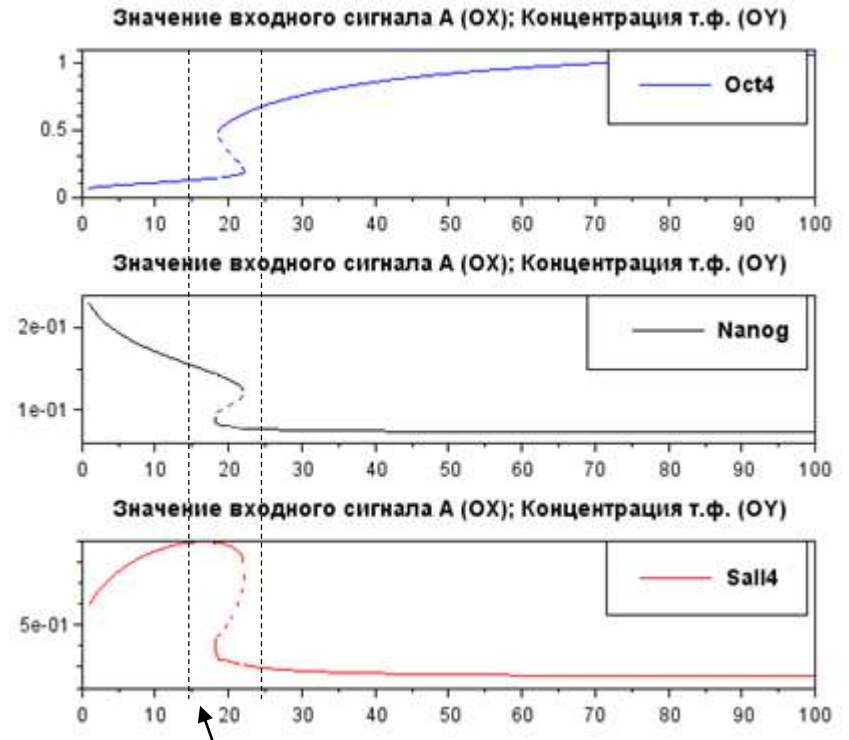
Последовательное связывания Oct4 с промотором Nanog, затем связывание Nanog со своим промотором

Результаты анализа двух типов регуляции экспрессии Nanog



Независимое и конкурентное связывания Nanog со своим сайтом

$$z1 * (x_{Nanog}/k)^h + z2 * (x_{Oct4}/k)^h$$

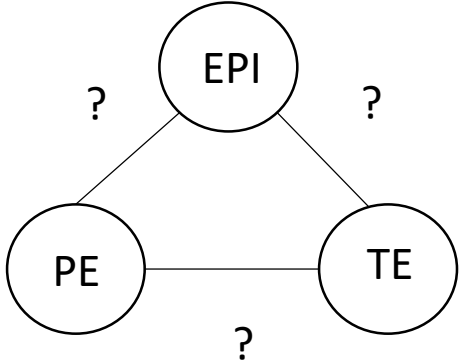
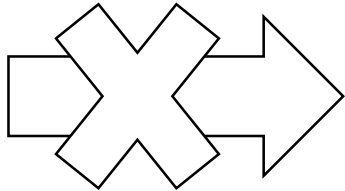
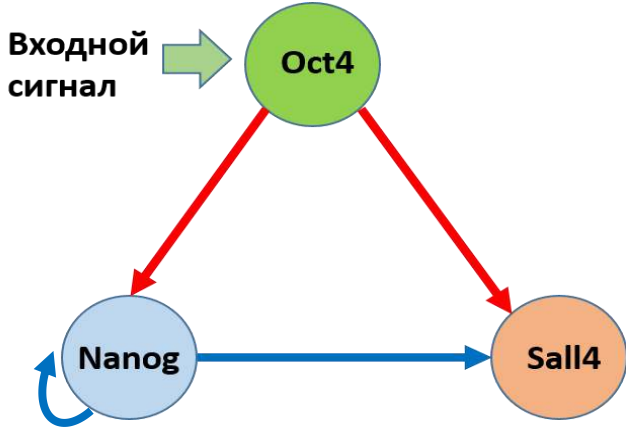


Зона бистабильности

Связывание Oct4 с промотором гена nanog с последующим связыванием фактора Nanog со своим промотором

$$w1 * (x_{Oct4}/k)^h * (x_{Nanog}/k)^h$$

Расширение сети



Developmental Cell
Resource

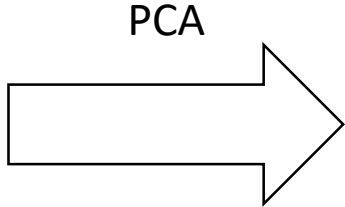
Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst

Guo J Guo,^{1,2,4} Mikael Huss,^{1,4} Guo Qing Tong,^{2,5} Chaoyang Wang,² Li Li Sun,² Neil D. Clarke,³ and Paul Robson^{1,2,4*}
¹Department of Biological Science, National University of Singapore, Singapore 117543
²Stem Cell & Developmental Biology
³Computational and Systems Biology Group
⁴Genome Institute of Singapore, Singapore 138672
⁵These authors contributed equally to this work
^{*}Present address: Department of Obstetrics and Gynecology, Nanjing Maternal and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210004, China
^{*}Correspondence: robsonp@gis.a-star.edu.sg
 DOI 10.1016/j.devcel.2010.02.012

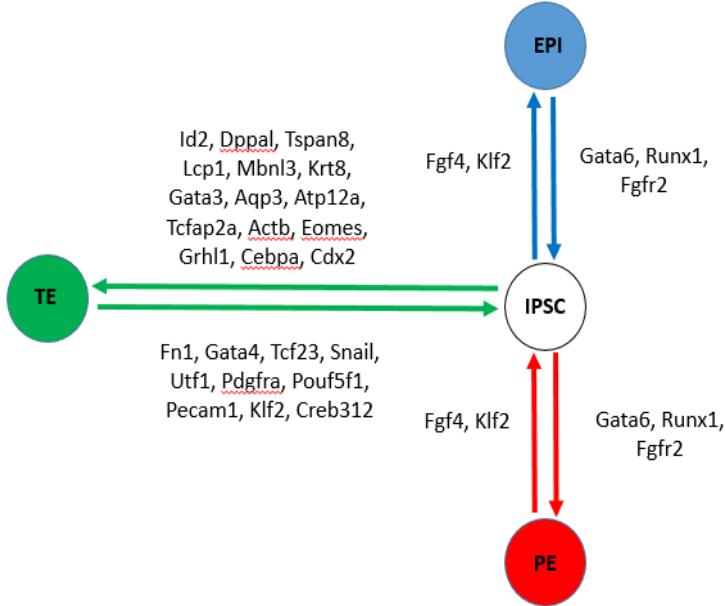
SUMMARY

Three distinct cell types are present within the 64-cell stage mouse blastocyst. We have investigated cellular development in this stage using single-cell expres-

embryonic stem (ES) cell. Though much insight has been gained from classical developmental studies, there still remains only a rudimentary understanding of the developmental genetic regulatory architecture controlling these first cell fate decisions. Though zygotic activation of transcription is initiated early at



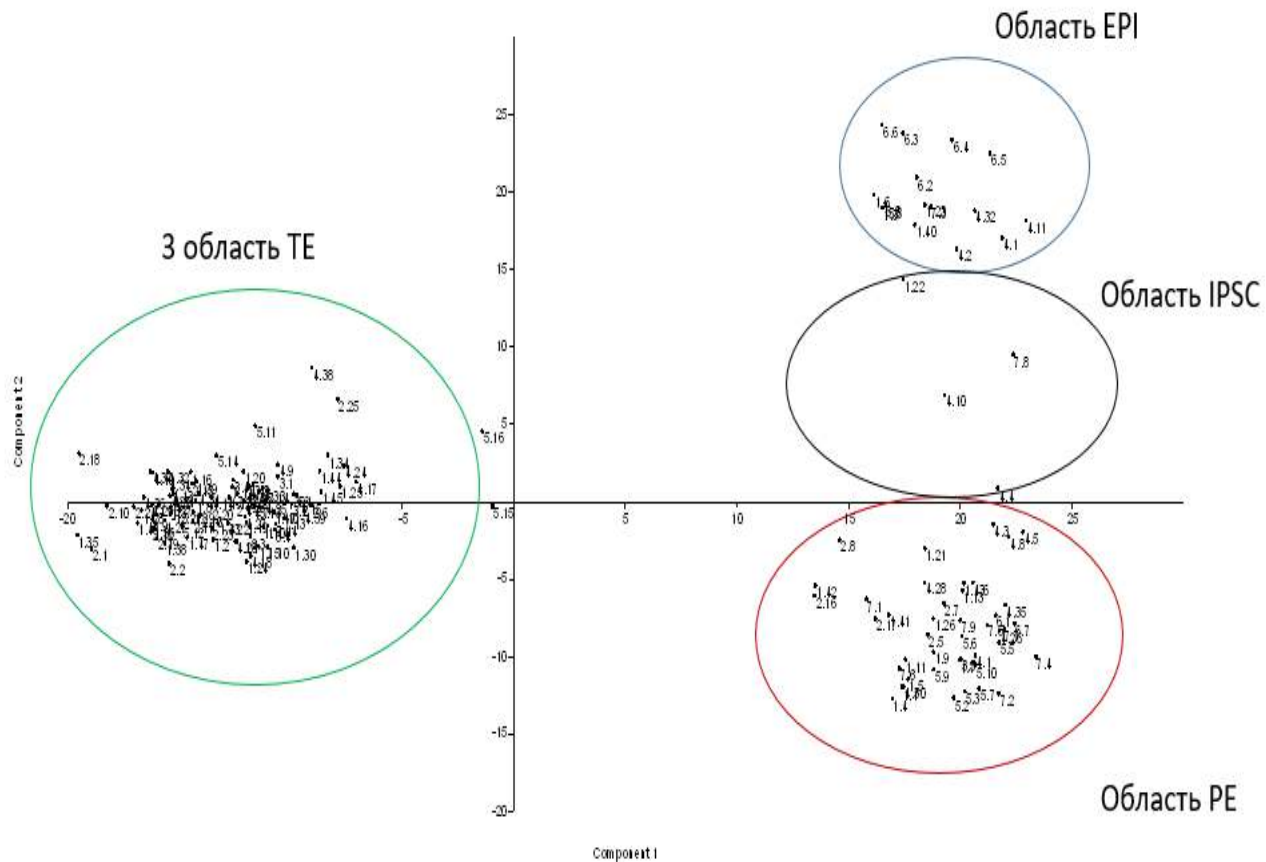
Корреляционный анализ



Guo, 2010

EPI – клетки эпибласта
 PE – клетки примитивной энтодермы
 TE – трофоэктодермальные клетки

Статистический анализ



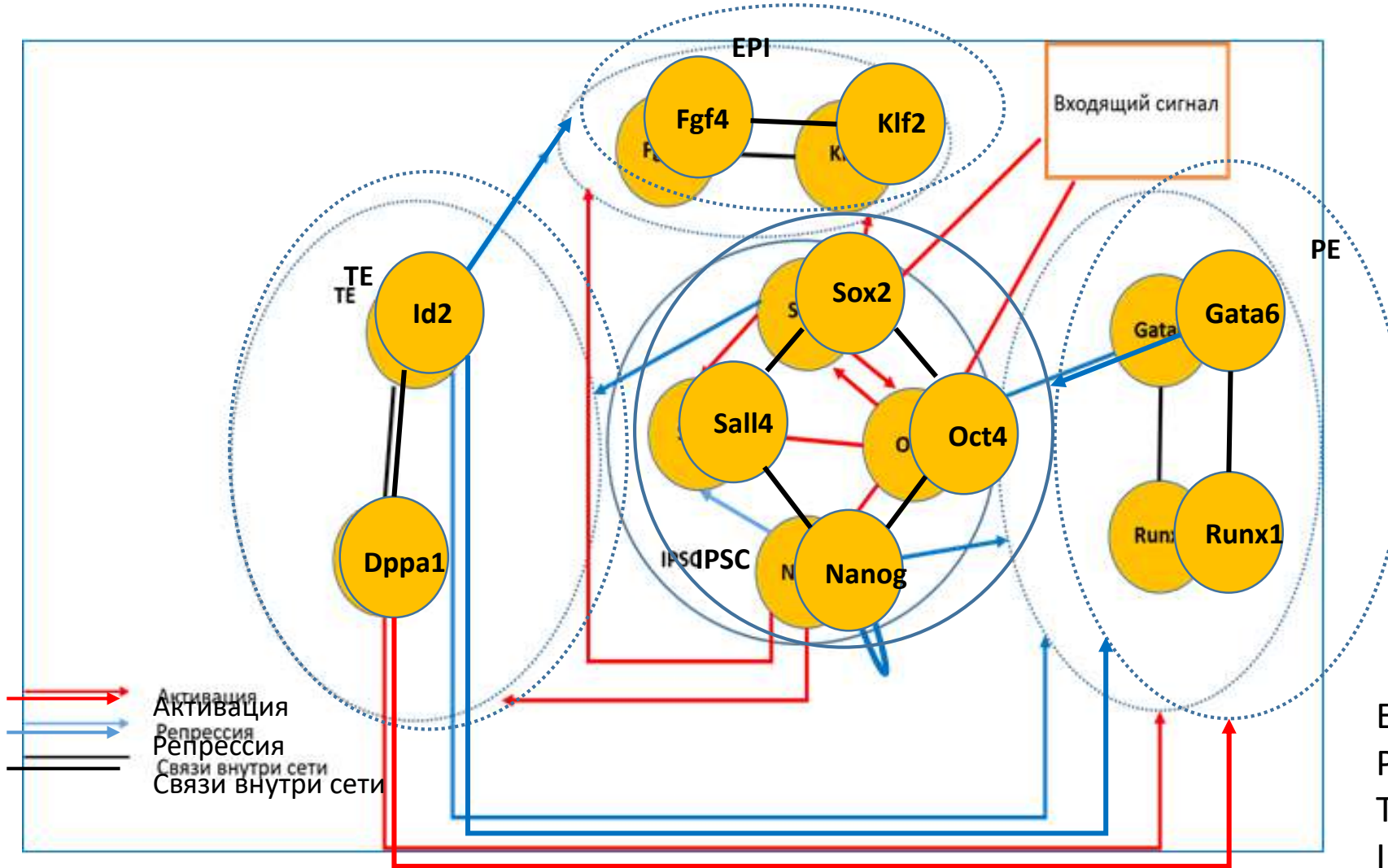
PCA

Т.Ф.	PC1	PC2	Т.Ф.	PC1	PC2
Fn1	-0,86	0,21	Msx2	0,24	-0,43
Gata4	-0,80	-0,53	Pdgfa	0,27	0,27
Tcf23	-0,79	-0,41	Klf5	0,36	-0,32
Snail	-0,79	-0,44	Gapdh	0,37	-0,07
Utf1	-0,78	0,10	Sox13	0,40	0,14
Pdgfra	-0,77	-0,58	Dab2	0,56	-0,56
Pou5f1	-0,77	0,03	Fgfr2	0,59	-0,70
Pecam1	-0,75	0,40	Tcfap2c	0,63	0,08
Klf4	-0,73	0,10	Cdx2	0,75	0,05
Creb312	-0,72	-0,55	Cebpa	0,77	0,05
Sox2	-0,67	0,50	Grhl2	0,78	0,16
Hnf4a	-0,66	-0,26	Grhl1	0,80	0,17
Esrrb	-0,61	0,43	Eomes	0,81	-0,13
Ahcy	-0,61	0,00	Actb	0,81	-0,10
Bmp4	-0,59	0,58	Tcfap2a	0,83	-0,09
Fgf4	-0,48	0,80	Atp12a	0,83	0,05
Sox17	-0,44	-0,40	Aqp3	0,83	0,40
Klf2	-0,40	0,61	Gata3	0,87	0,00
Nanog	-0,37	0,61	Krt8	0,87	-0,07
Sall4	-0,36	-0,23	Mbnl3	0,90	-0,03
Runx1	-0,07	-0,82	Lcp1	0,91	0,18
Hand1	-0,06	0,17	Tspan8	0,93	0,15
Gata6	-0,06	-0,77	Dppal	0,94	0,10
Msc	0,20	0,43	Id2	0,95	-0,04

Корреляционный анализ

*Красным цветом выделены отобранные транскрипционные факторы

Расширенная генная сеть



EPI – клетки эпибласта
 PE – клетки примитивной эндодермы
 TE – трофоэктодермальные клетки
 IPSC - индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

Математическая модель расширенной генной

СЕТИ

Синий – процессы синтеза
Красный – процессы деградации

$$\frac{dOct4}{dt} = \frac{(k_{Oct4} + c * (\frac{x_3}{k_{oc1}})^h + c * (\frac{x_4}{k_{oc2}})^h + k_A * A)}{1 + (\frac{x_3}{k_{oc1}})^h + (\frac{x_4}{k_{oc2}})^h + (\frac{x_9}{k_{oc3}})^h + A} - k_1 * x_1$$

$$\frac{dNanog}{dt} = \frac{(k_{Nanog} + c * (\frac{x_1}{k_{na1}})^h)}{1 + (\frac{x_1}{k_{na1}})^h + (\frac{x_2}{k_{na2}})^h + (\frac{x_9}{k_{na3}})^h} - k_2 * x_2$$

$$\frac{dSall4}{dt} = \frac{(k_{Sall4} + c * (\frac{x_1}{k_{sa1}})^h + c * (\frac{x_4}{k_{sa2}})^h)}{1 + (\frac{x_1}{k_{sa1}})^h + (\frac{x_4}{k_{sa2}})^h + (\frac{x_2}{k_{sa3}})^h + (\frac{x_9}{k_{sa4}})^h} - k_3 * x_3$$

$$\frac{dSox2}{dt} = \frac{(k_{Sox2} + c * (\frac{x_1}{k_{so1}})^h) + k_A * A}{1 + (\frac{x_1}{k_{so1}})^h + (\frac{x_9}{k_{so2}})^h + A} - k_4 * x_4$$

IPSC

$$\frac{dGata6}{dt} = \frac{(k_{Gata6} + c * (\frac{x_6}{k_{ga1}})^h)}{1 + (\frac{x_6}{k_{ga1}})^h + (\frac{x_2}{k_{ga2}})^h + (\frac{x_5}{k_{ga3}})^h} - k_9 * x_9$$

$$\frac{dRunx1}{dt} = \frac{(k_{Gata6} + c * (\frac{x_6}{k_{ru1}})^h)}{1 + (\frac{x_6}{k_{ru1}})^h + (\frac{x_2}{k_{ru2}})^h + (\frac{x_5}{k_{ru3}})^h} - k_{10} * x_{10}$$

PE

TE

$$\frac{dId2}{dt} = \frac{(k_{Id2} + c * (\frac{x_2}{k_{id1}})^h)}{1 + (\frac{x_2}{k_{id1}})^h + (\frac{x_4}{k_{id2}})^h} - k_5 * x_5$$

$$\frac{dDppa1}{dt} = \frac{(k_{Id2} + c * (\frac{x_2}{k_{dp1}})^h)}{1 + (\frac{x_2}{k_{dp1}})^h + (\frac{x_4}{k_{dp2}})^h} - k_6 * x_6$$

$$\frac{dFgf4}{dt} = \frac{(k_{Fgf4} + c * (\frac{x_2}{k_{fg1}})^h + c * (\frac{x_4}{k_{fg2}})^h)}{1 + (\frac{x_2}{k_{fg1}})^h + (\frac{x_4}{k_{fg2}})^h + (\frac{x_5}{k_{fg5}})^h} - k_7 * x_7$$

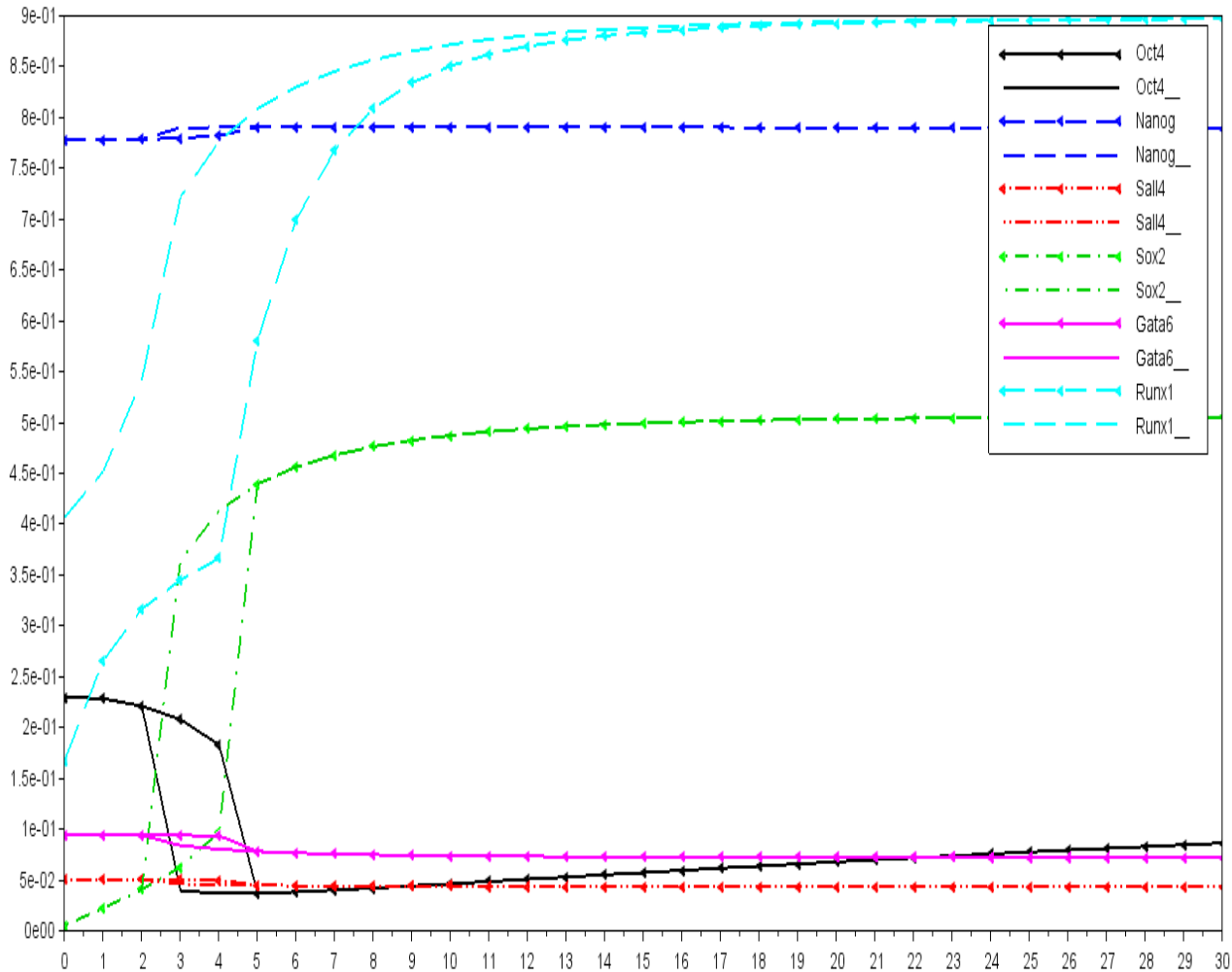
$$\frac{dKlf2}{dt} = \frac{k_{klf2} * (1 + c * (\frac{x_2}{k_{kl1}})^h + c * (\frac{x_4}{k_{kl2}})^h)}{1 + (\frac{x_2}{k_{kl1}})^h + (\frac{x_4}{k_{kl2}})^h + (\frac{x_5}{k_{kl5}})^h} - k_8 * x_8$$

EPI

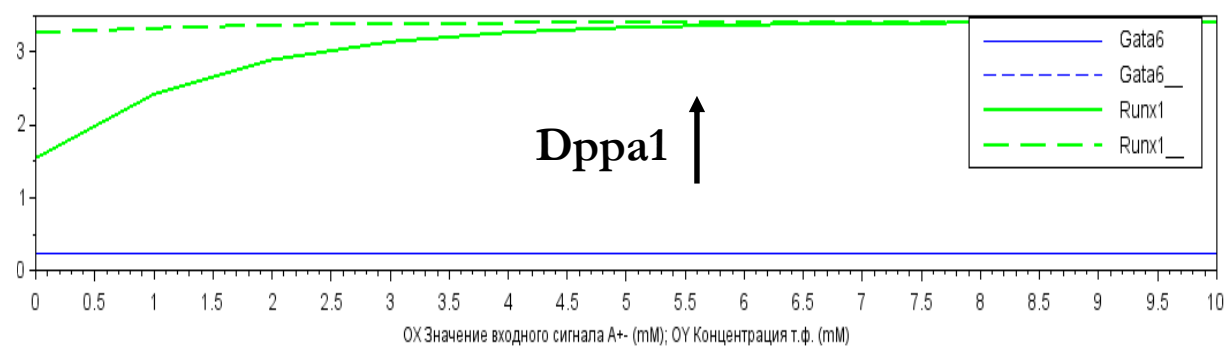
Анализ расширенной геной сети

Переход из iPSC в PE

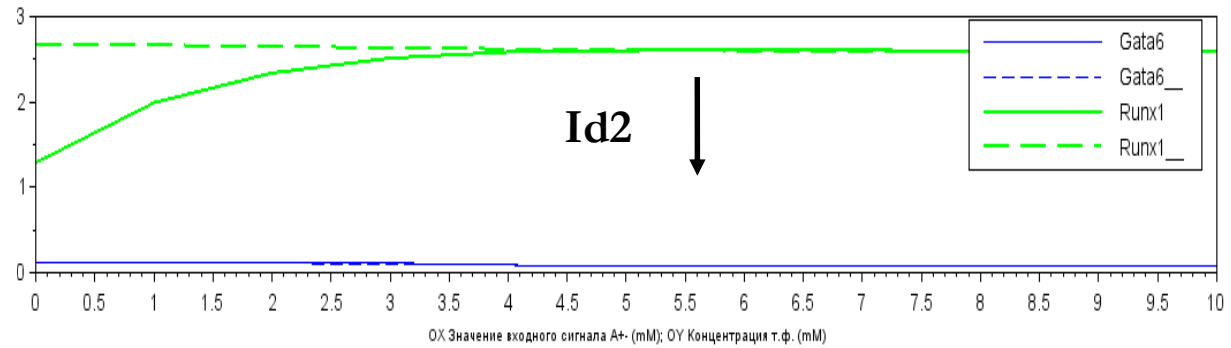
OX Значение входного сигнала A+ (mM); OY Концентрация т.ф. (mM)



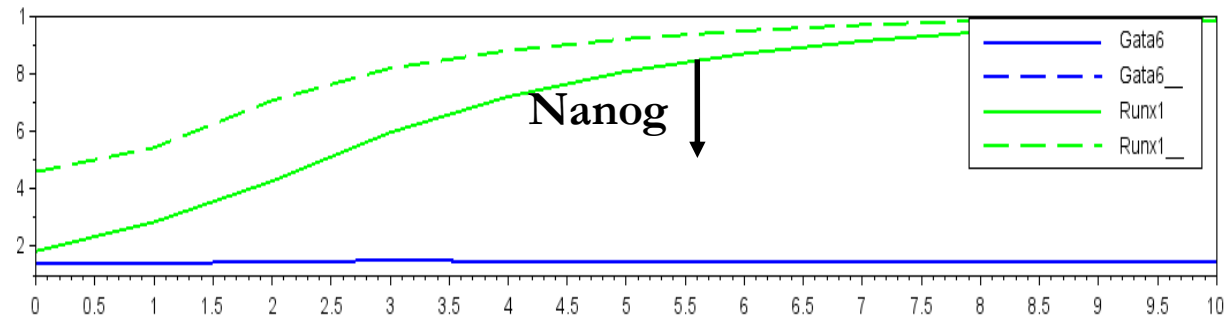
OX Значение входного сигнала A+ (mM); OY Концентрация т.ф. (mM)



OX Значение входного сигнала A+ (mM); OY Концентрация т.ф. (mM)

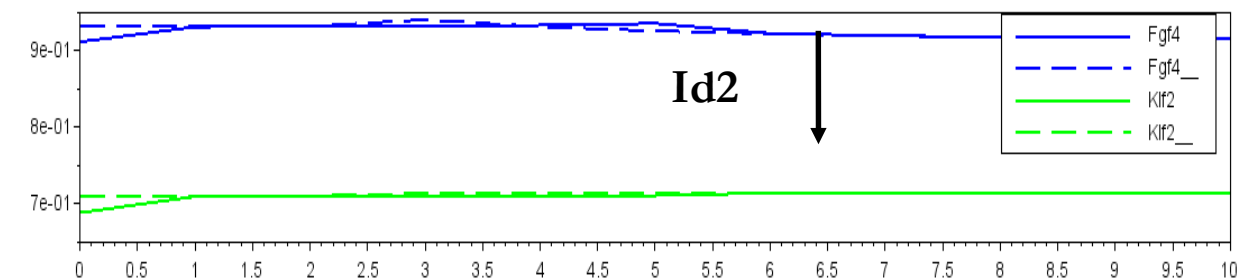
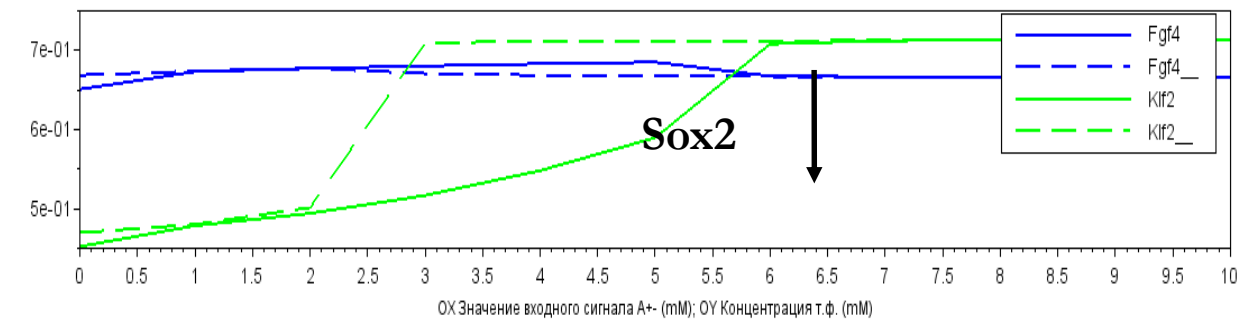
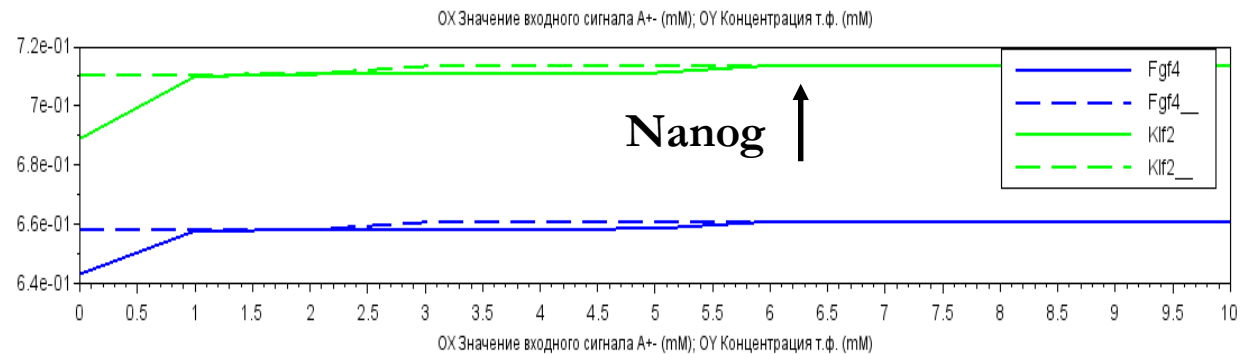
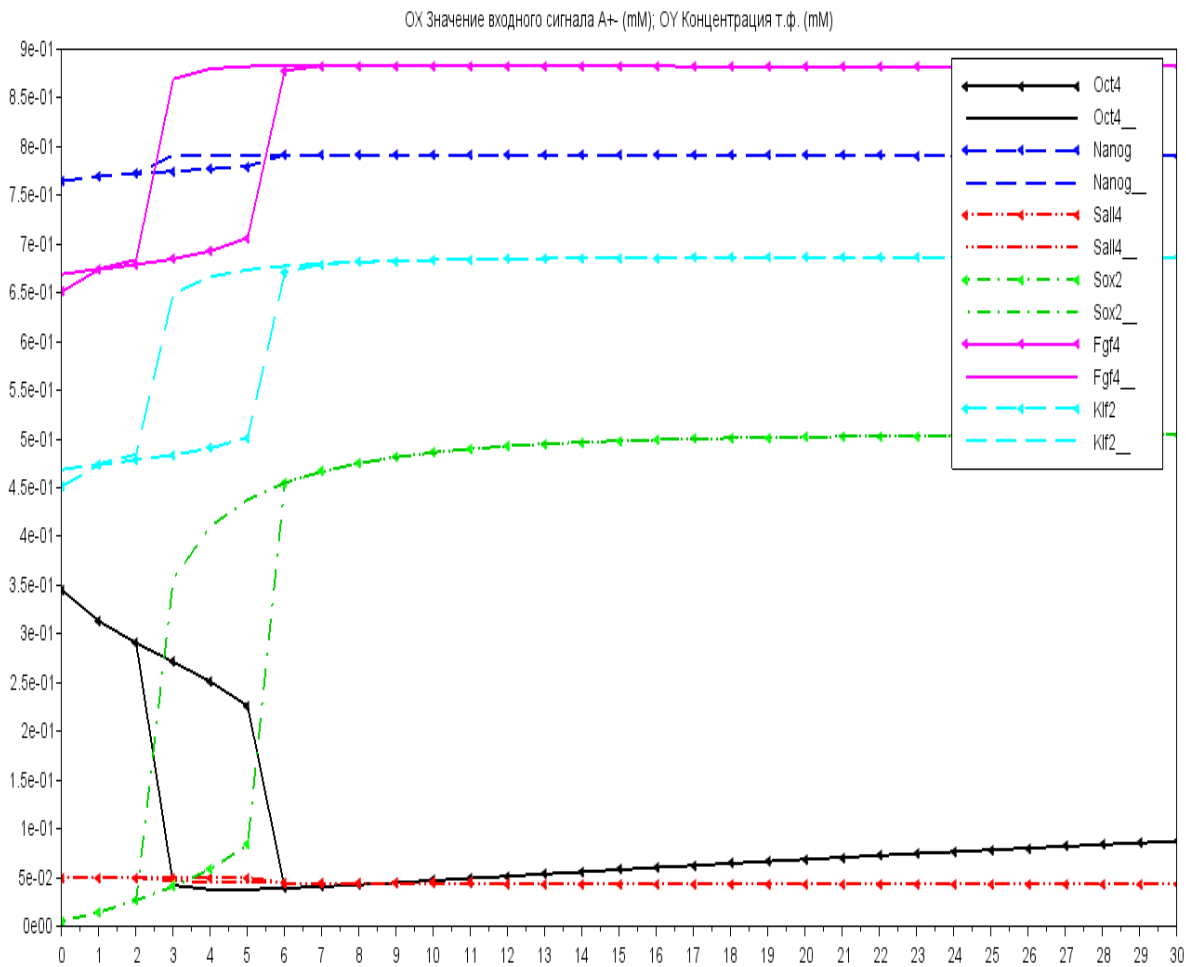


OX Значение входного сигнала A+ (mM); OY Концентрация т.ф. (mM)



Анализ расширенной генной сети

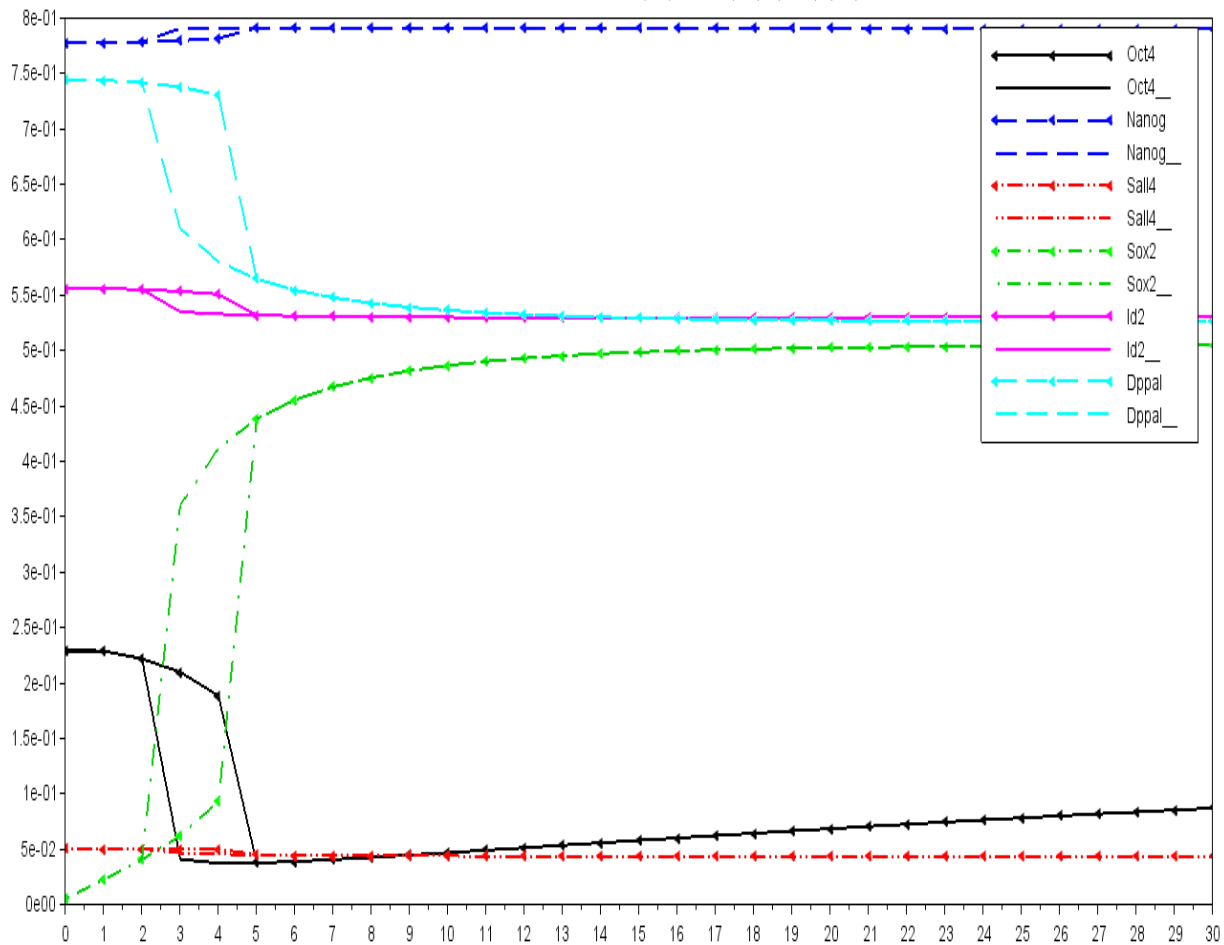
Переход из iPSC в EPI



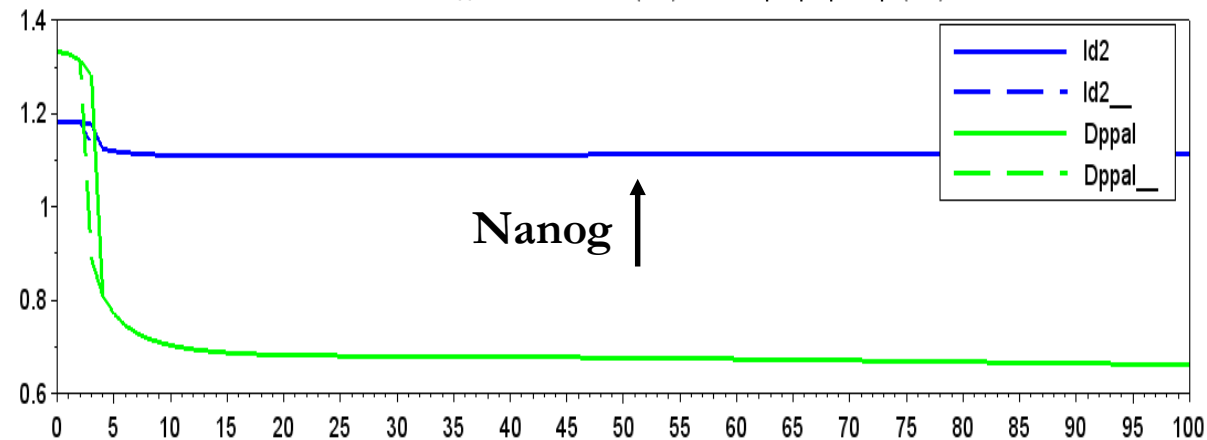
Анализ расширенной геной сети

Переход из iPSC в TE

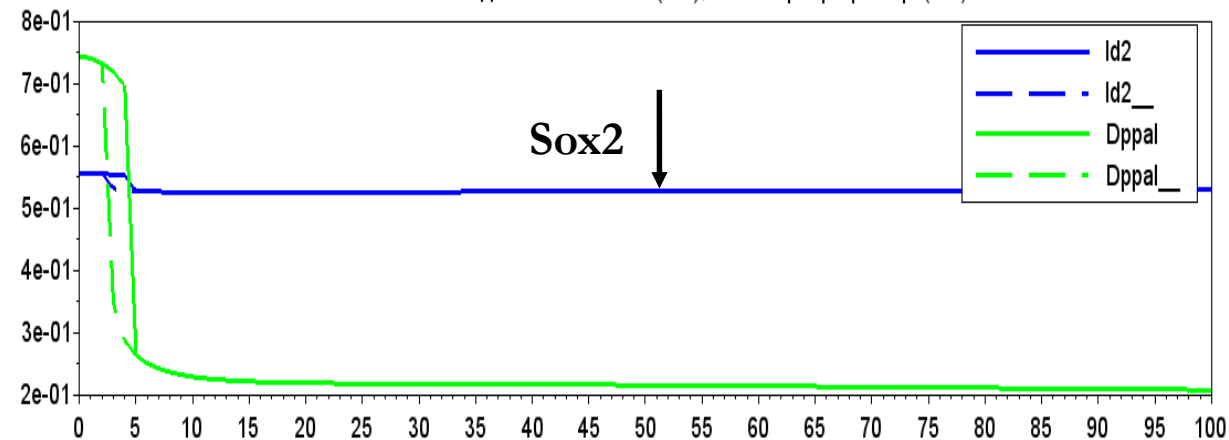
OX Значение входного сигнала A+ (mM); OY Концентрация т.ф. (mM)



OX Значение входного сигнала A+ (mM); OY Концентрация т.ф. (mM)



OX Значение входного сигнала A+ (mM); OY Концентрация т.ф. (mM)



Выводы

1. Анализ модели минимального регуляторного контура регуляции плюрипотентности ЭСК показал, что переход как из дифференцированного состояния в плюрипотентное, так и обратно, возможны только в случае кооперативного взаимодействия факторов OCT4 и NANOG при регуляции экспрессии гена Nanog.
2. На основе статистического анализа данных RNA-seq была реконструирована расширенная генная сеть, включающая в себя регуляторные взаимодействия между транскрипционными факторами OCT4, NANOG, SOX2, SALL4, FGF4, KLF2, ID2, DPPAL1, GATA6, RUNX1.
3. Анализ модели, учитывающей регуляторные взаимоотношения расширенной генной сети, показал, что для перехода в состояние PE наиболее эффективно уменьшать регуляторное влияние фактора ID2, нежели ингибировать действия NANOG или увеличивать воздействие фактора DPPA1.
4. Численный анализ расширенной модели также показал, что для перехода в состояние EPI наиболее эффективно подавлять регуляцию фактором ID2, чем увеличивать регуляторные воздействия SOX2 или NANOG на экспрессию Fgf4 и Klf2.
5. Математическая модель предсказывает наибольшую эффективность получения трофобластических клеток из индуцированных плюрипотентных клеток за счет увеличения активирующего воздействия NANOG на экспрессию генов Id2 и Dppa1.