



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

**Петрова Кристина Олеговна**

Научный руководитель: к.б.н., н.с. **Акбердин И.Р.**

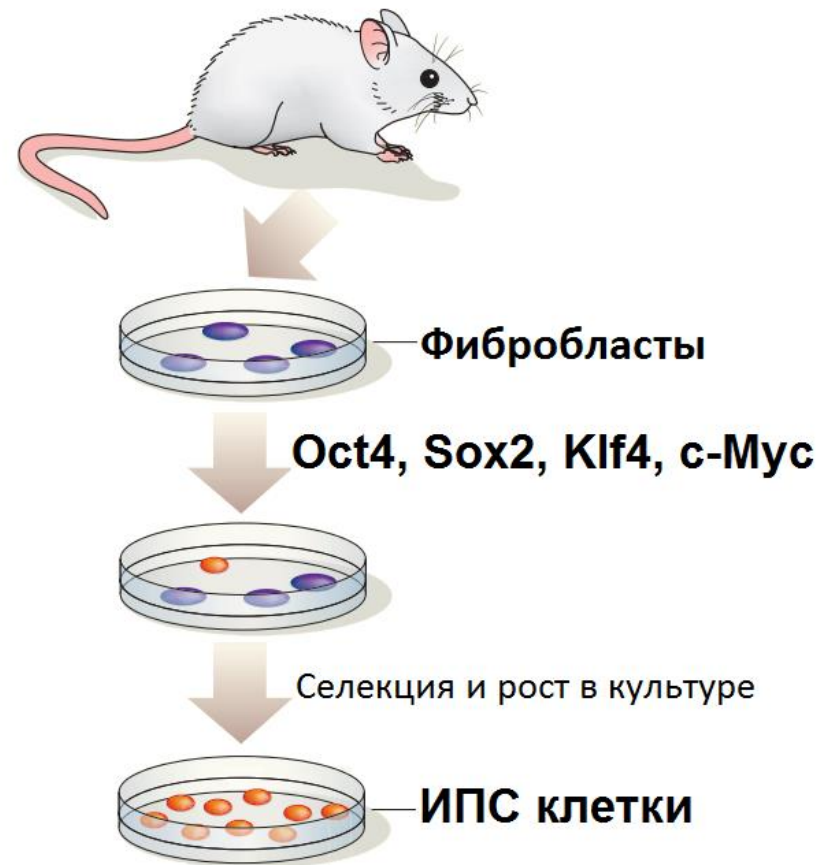
Новосибирск, 2016

# Плюрипотентные стволовые клетки

## Эмбриональные стволовые клетки



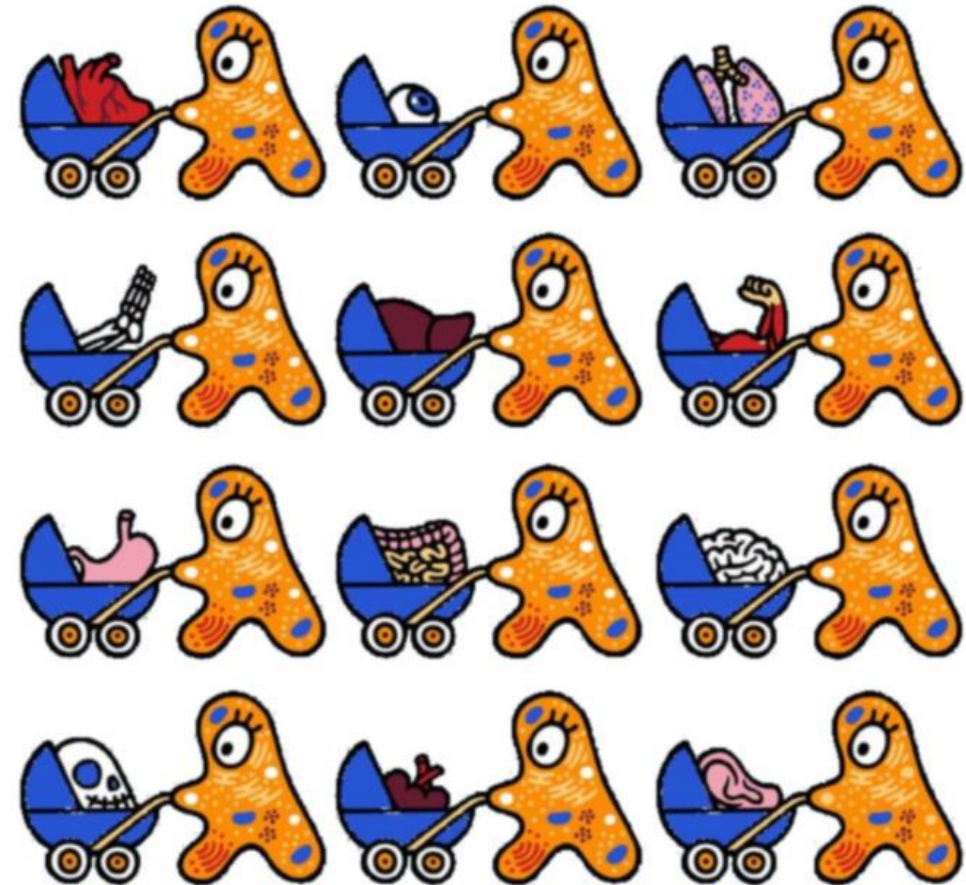
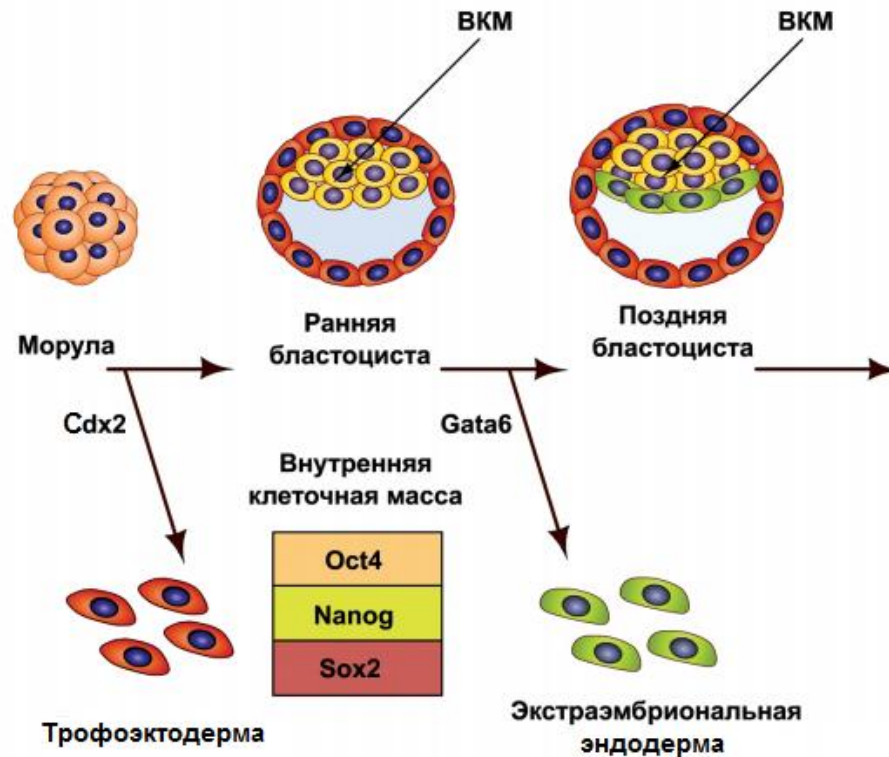
## Индуцированные стволовые клетки



# Изменение экспрессии транскрипционных факторов

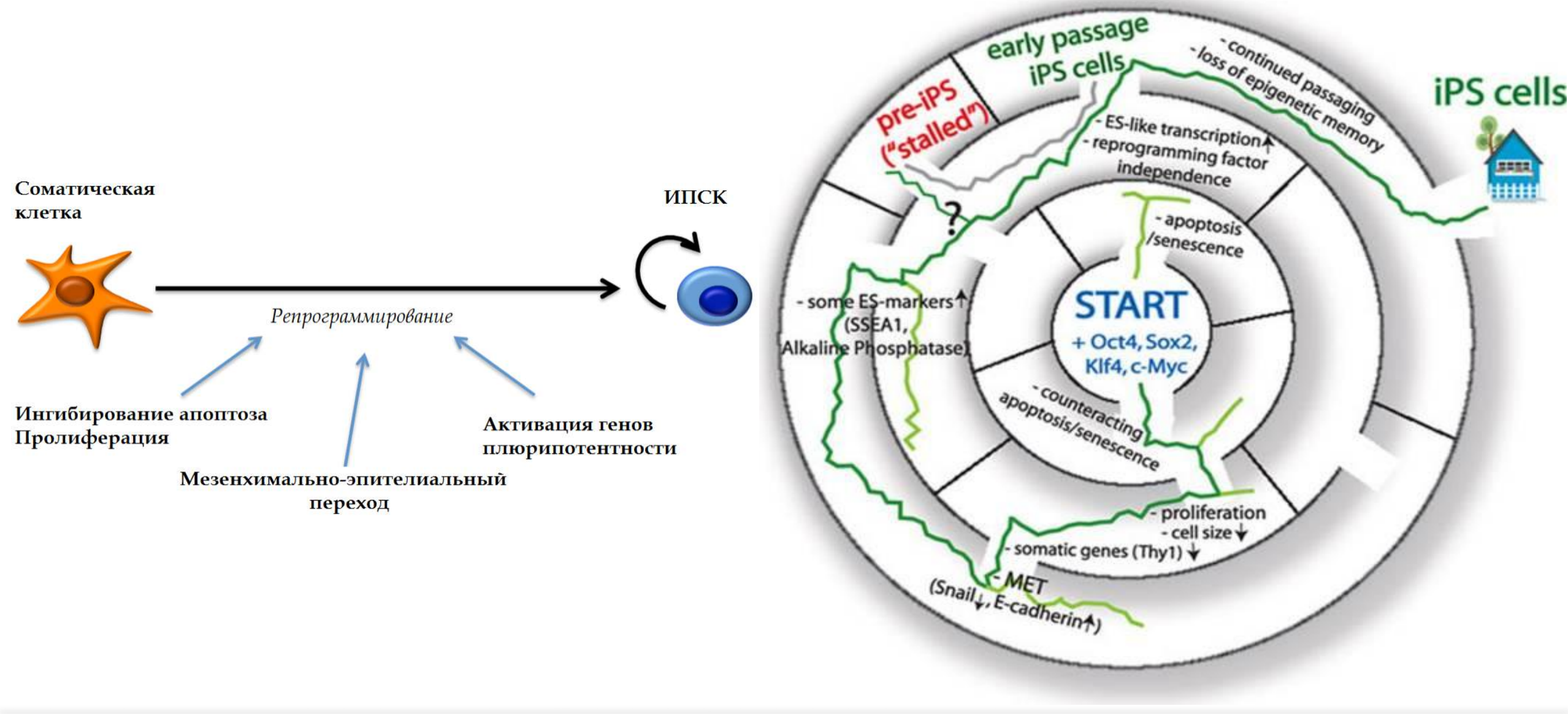
$Cdx2 \uparrow$   $Oct4 \downarrow$  - трофоэктодерма

$Gata6 \uparrow$   $Nanog \downarrow$  - примитивная энтодерма





# Индуктированные плюрипотентные стволовые клетки



# Цель исследования:

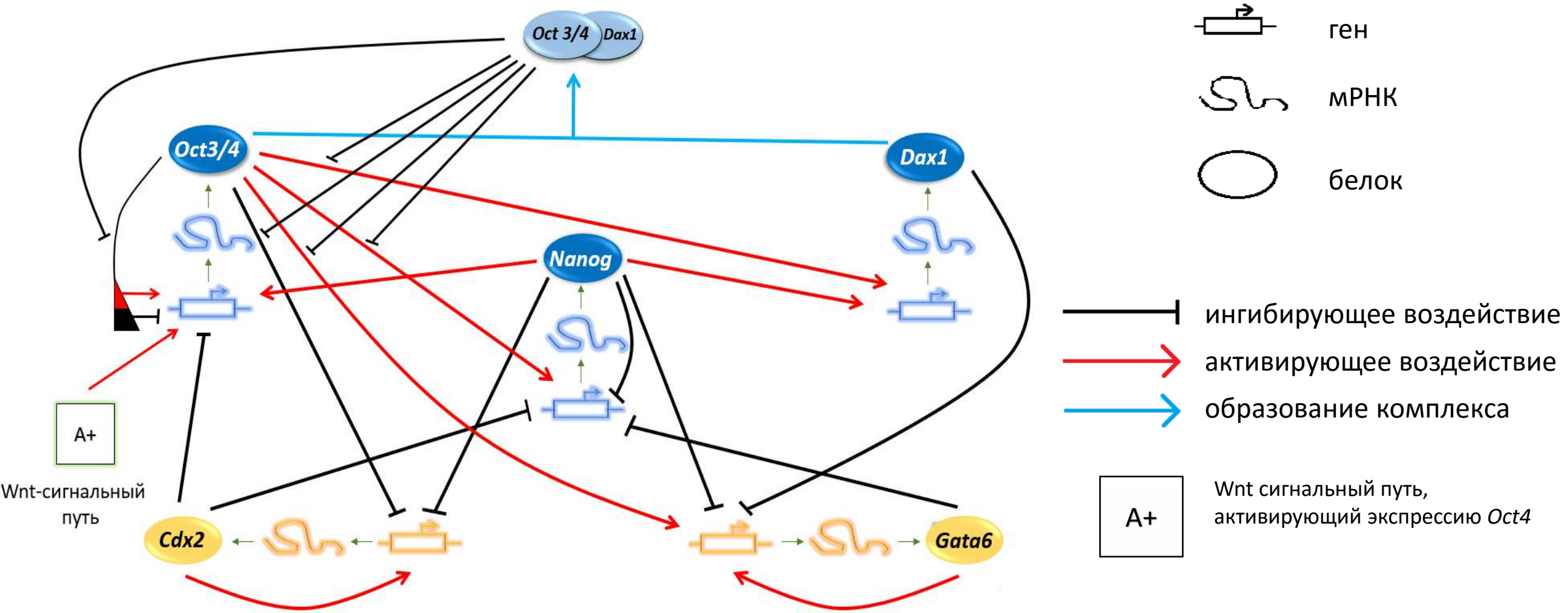
---

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 эмбриональных стволовых клеток мыши, поиск соответствующих кинетических параметров;
- Реконструкция новой регуляторной генной сети, включающей базовые и дополнительные механизмы поддержания плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши;
- Построение динамической модели, ее анализ и биологическая интерпретация полученных результатов.

# 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)

$$\frac{d[M_D]}{dt} = \frac{Kg_D \left( k0_D + d_{DO} \left( \frac{[O]}{Ka_{DO}} \right)^{h_O} + d_{DN} \left( \frac{[N]}{Ka_{DN}} \right)^{h_N} \right)}{1 + \left( \frac{[N]}{Ka_{DN}} \right)^{h_N} + \left( \frac{[O]}{Ka_{DO}} \right)^{h_O} + w_{DODO} \left( \frac{[O]}{Ka_{DO}} \right)^{h_O} \left( \frac{[DO]}{Ki_{DDO}} \right)^{h_{DO}}} \cdot k_{deg_{M_D}}[M_D]$$

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

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

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

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

- $M_D$  – мРНК *Dax1*
- $M_G$  – мРНК *Gata6*
- $M_C$  – мРНК *Cdx2*
- $M_N$  – мРНК *Nanog*
- $M_O$  – мРНК *Oct3/4*

Процессы синтеза
Процессы деградации
Изменение регуляторной роли транскрипционного фактора



# Реконструированная система дифференциальных уравнений (Белки)

$$\frac{d[N]}{dt} = k_N[M_N] - k_{degN}[N]$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_C[M_C] - k_{degC}[C]$$

$$\frac{d[G]}{dt} = k_G[M_G] - k_{degG}[G]$$

$$\frac{d[D]}{dt} = k_D[M_D] + k_{DO}^-[DO] - k_{DO}^+[D][O] - k_{degD}[D]$$

$$\frac{d[O]}{dt} = k_O[M_O] + k_{DO}^-[DO] - k_{DO}^+[D][O] - k_{degO}[O]$$

$$\frac{d[DO]}{dt} = k_{DO}^+[D][O] - k_{DO}^-[DO] - k_{degDO}[DO]$$

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

[i] – концентрация белка  
 [M<sub>i</sub>] – концентрация мРНК  
 k<sub>i</sub> – константа скорости трансляции  
 k<sub>DO</sub><sup>-</sup> – константа ассоциации комплекса  
 k<sub>DO</sub><sup>+</sup> – константа диссоциации комплекса  
 k<sub>degi</sub> – константа деградации белков

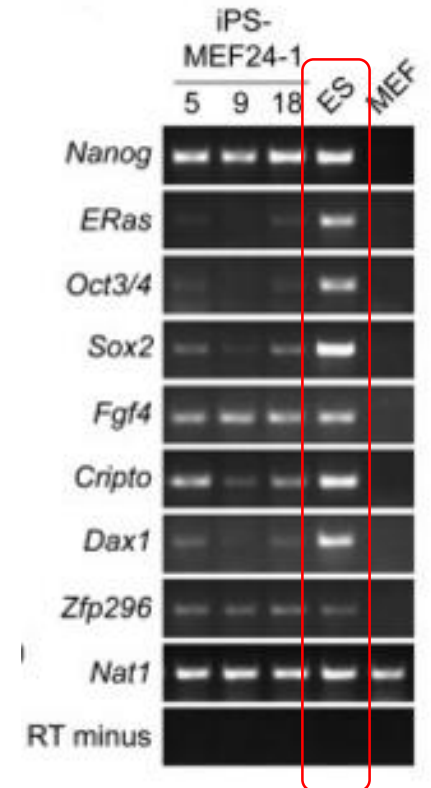
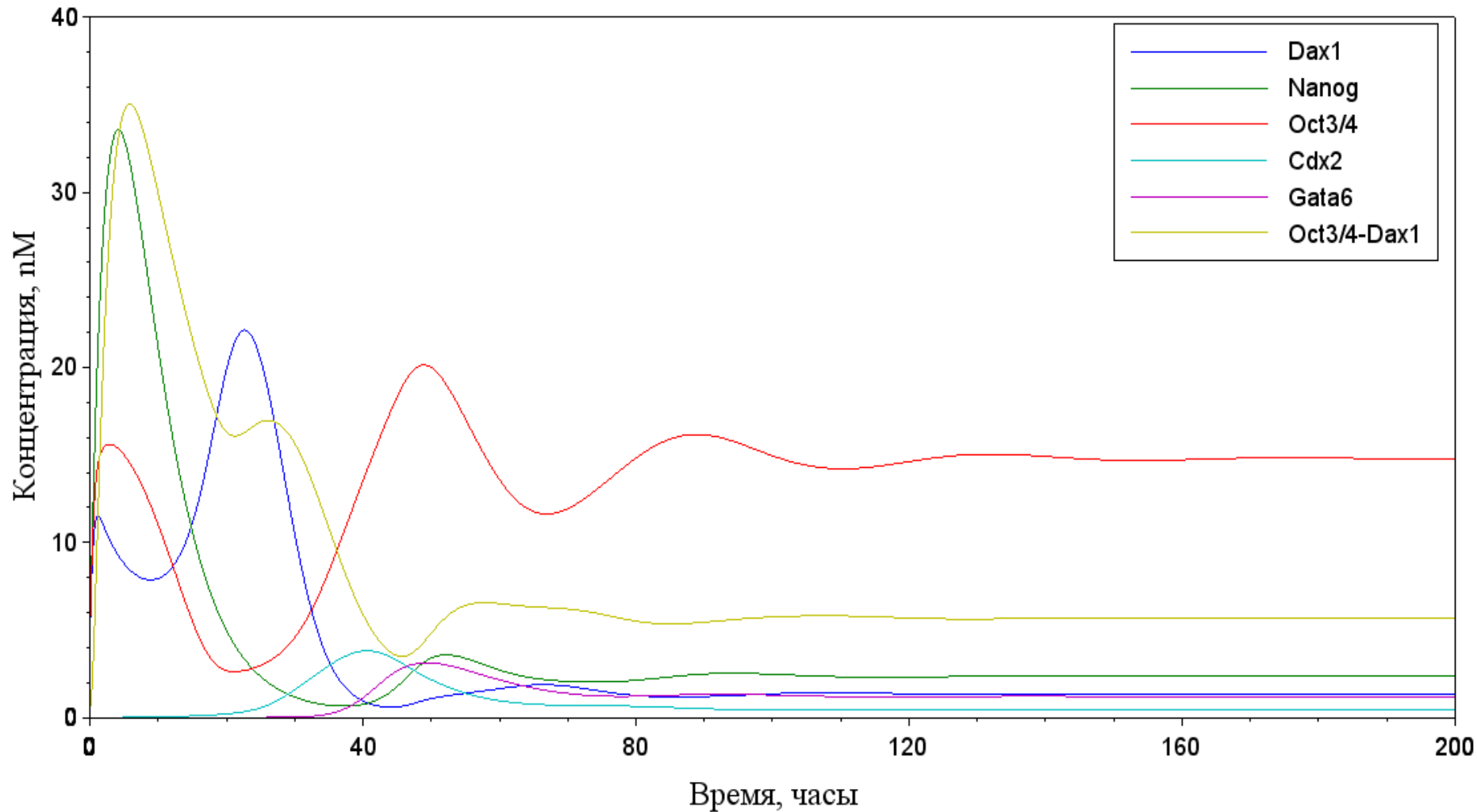
Процессы синтеза

Процессы деградации

Процессы ассоциации и диссоциации белкового комплекса

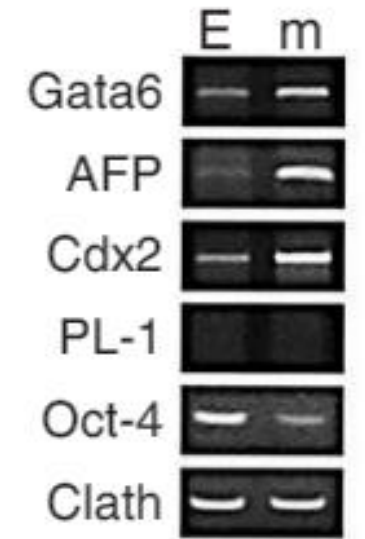
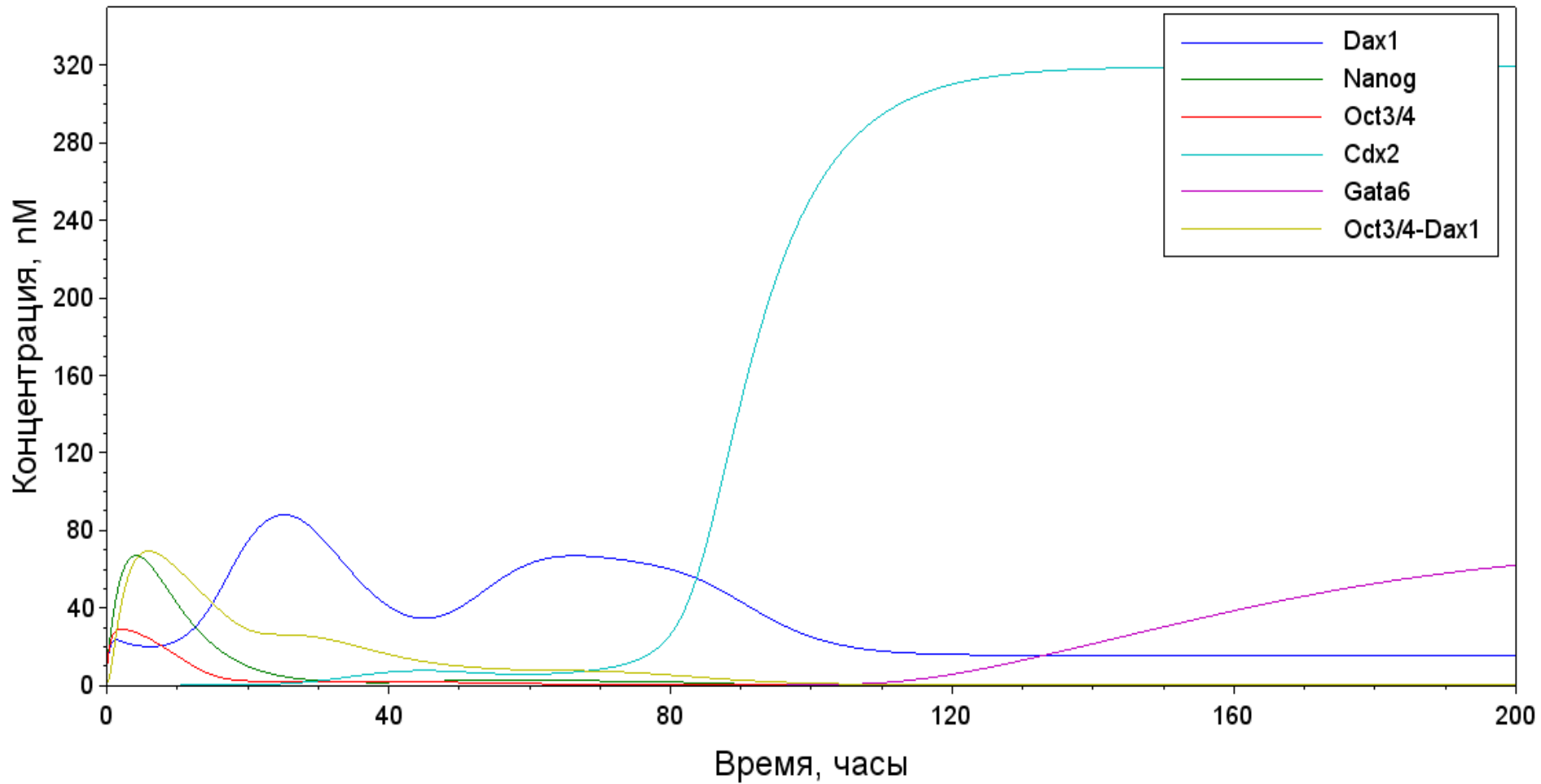


# Экспрессия генов при плюрипотентном состоянии ЭСК



RT-PCR маркерных генов ЭСК

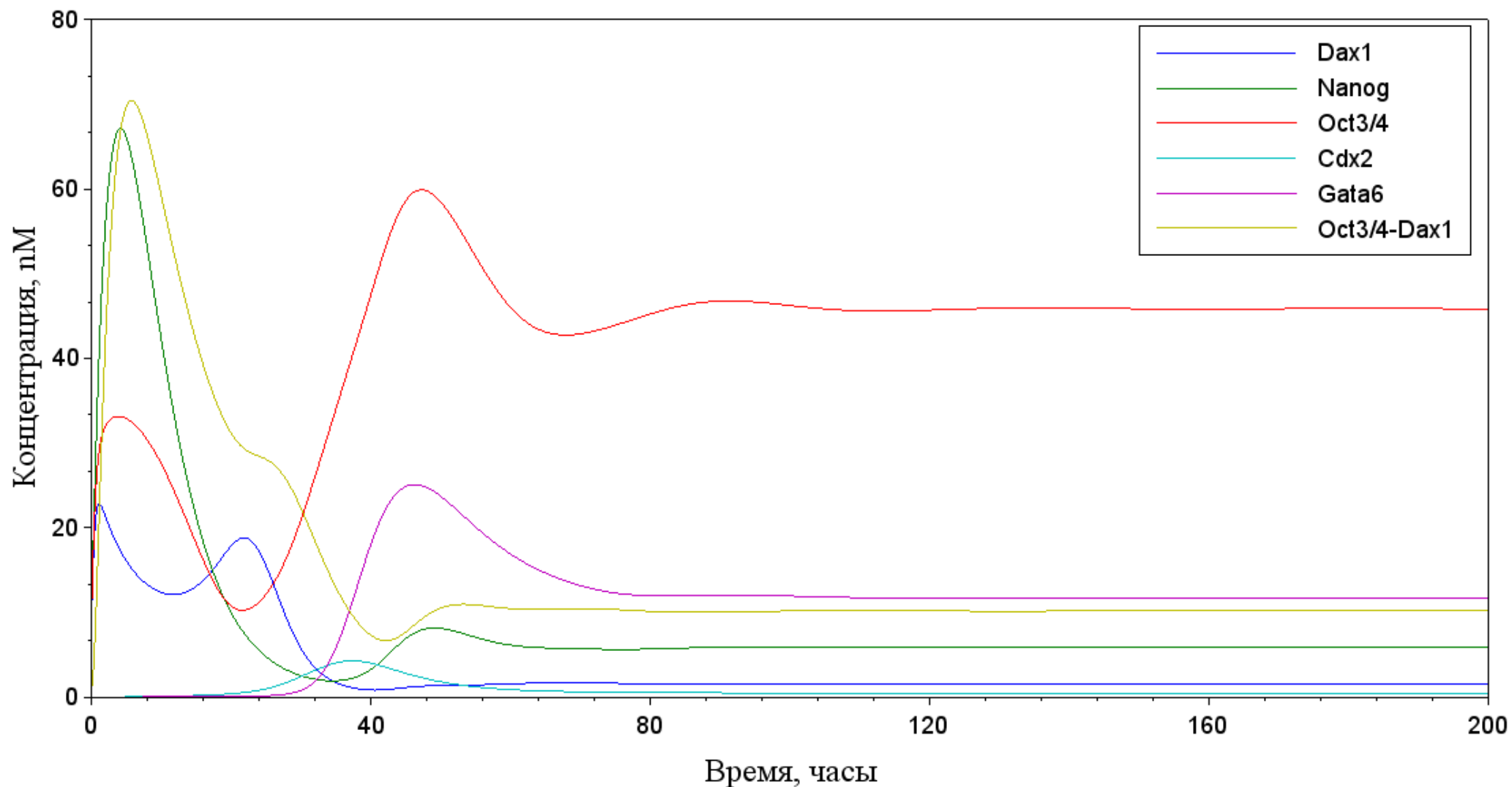
# Переход из плюрипотентного состояния в трофоэктодермальное



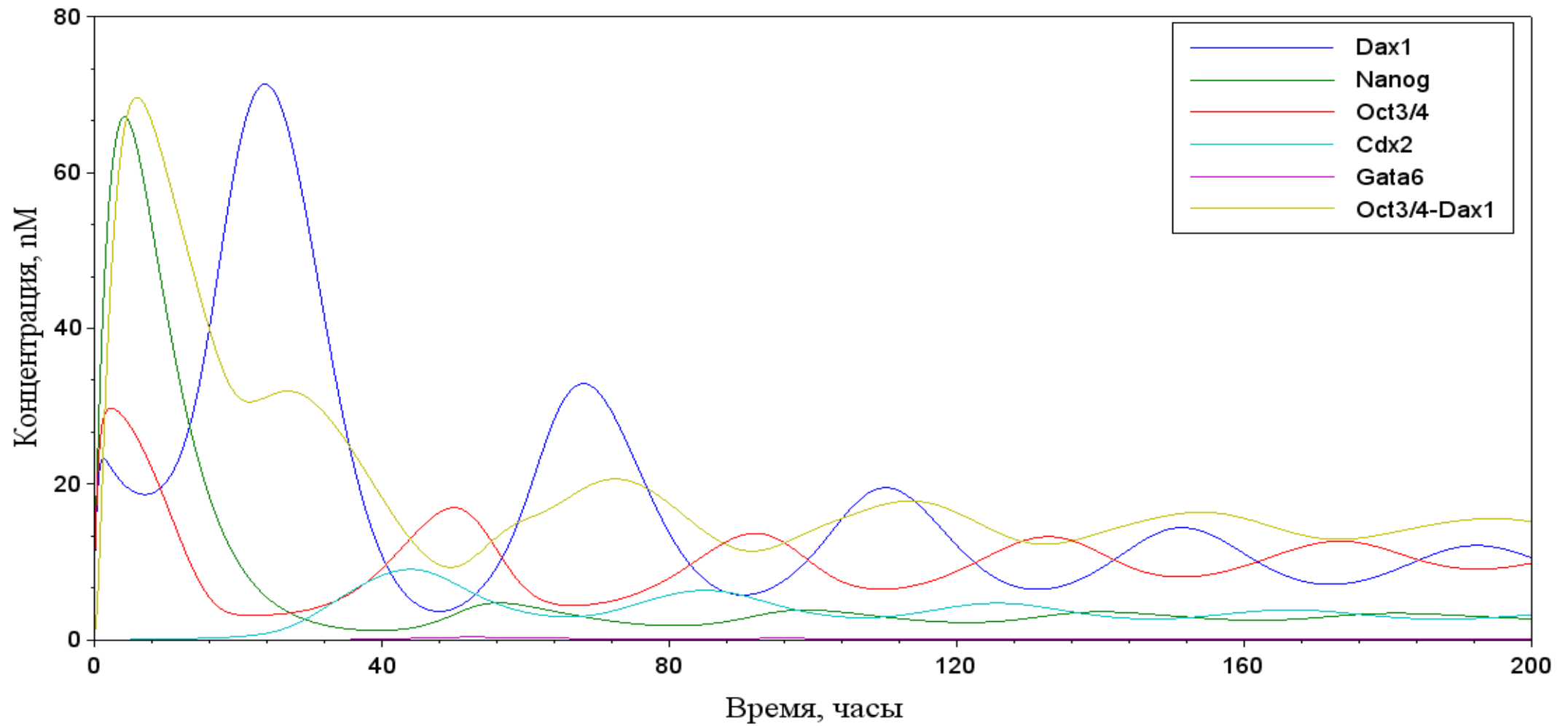
RT-PCR

E – трансфекция миРНК EGFP  
m – трансфекция миРНК Oct4

# Переход из плюрипотентного состояния в эндодермальное

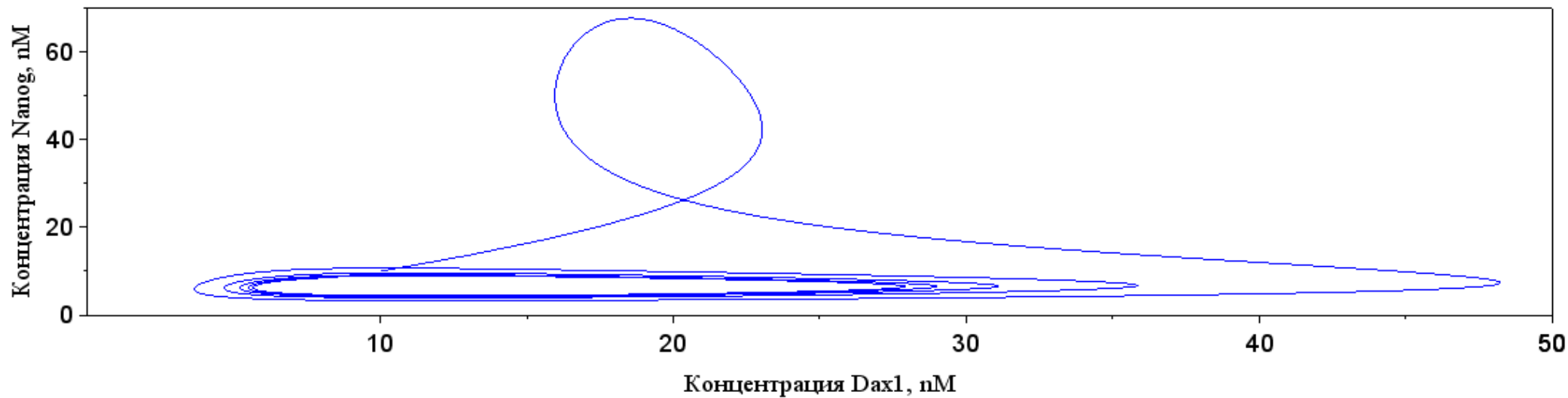
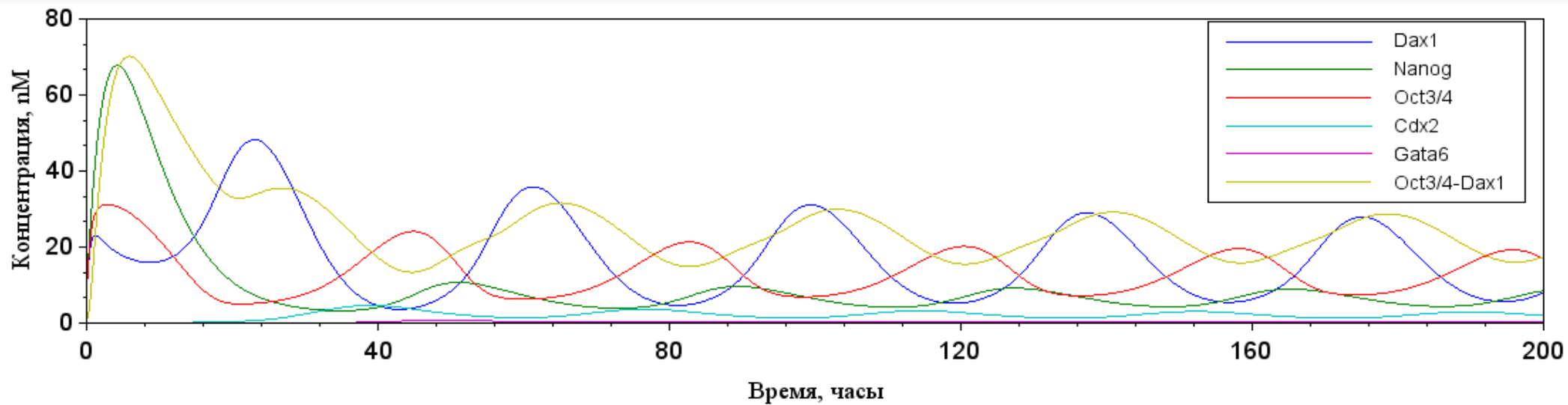


# Промежуточное состояние при переходе из плюрипотентного состояния в дифференцированное

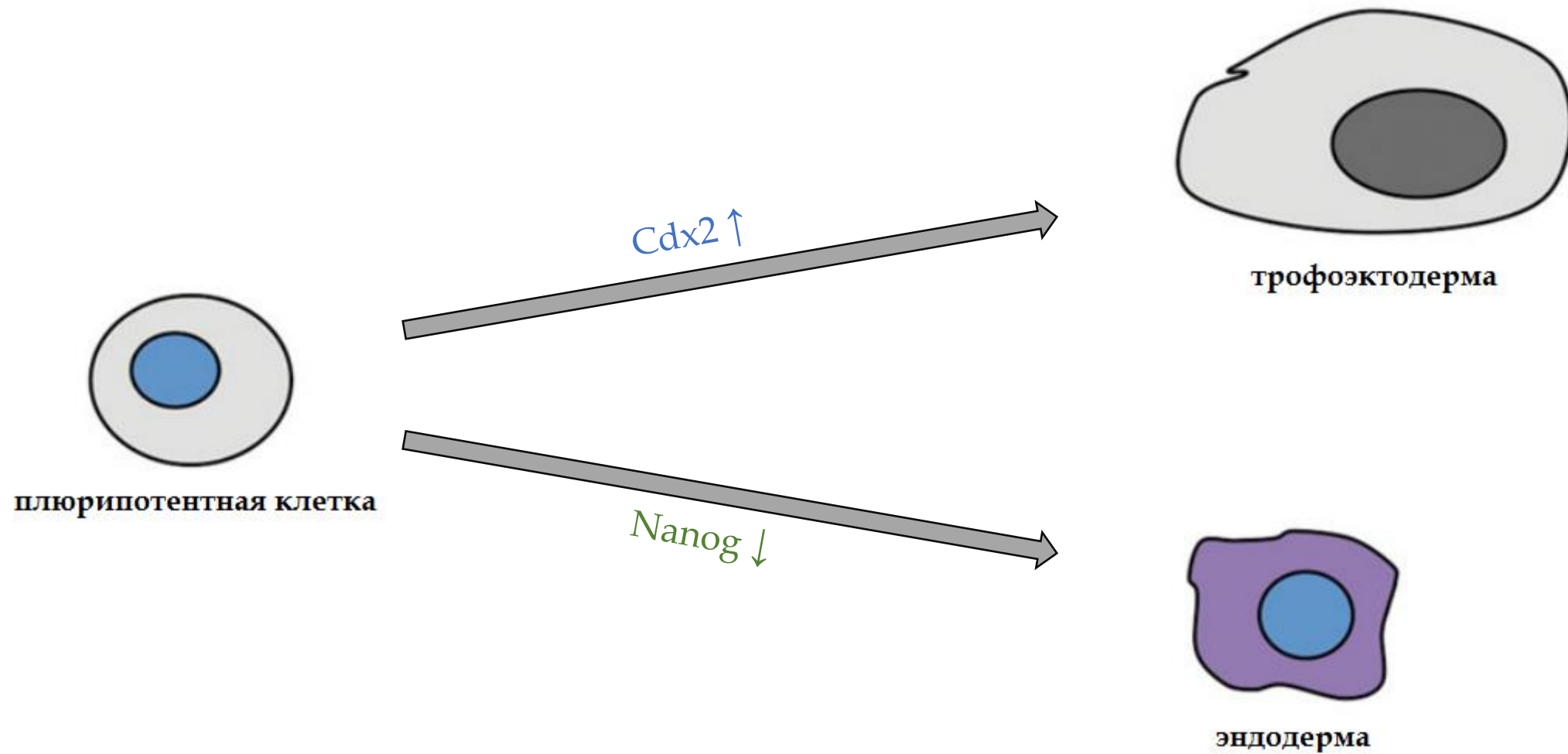




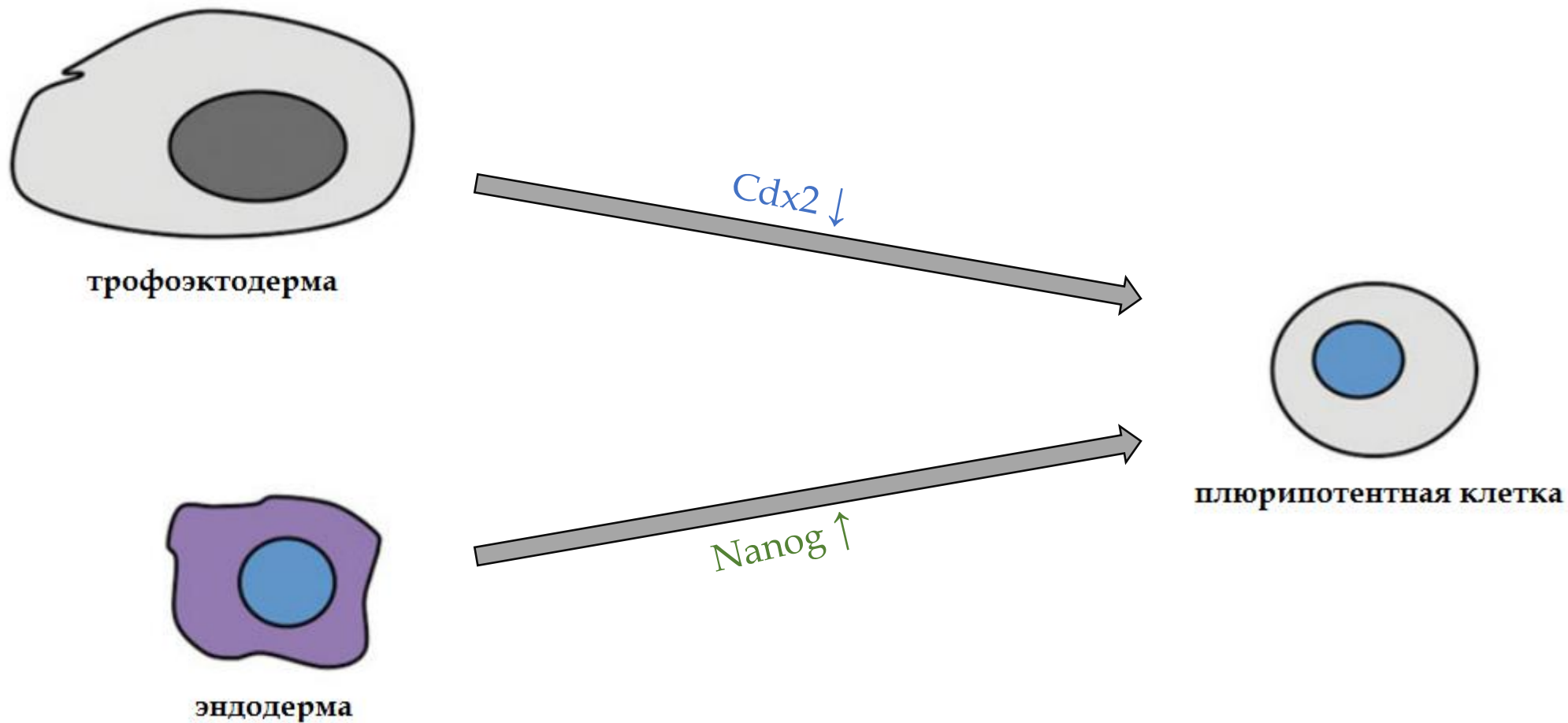
# Колебательный режим функционирования



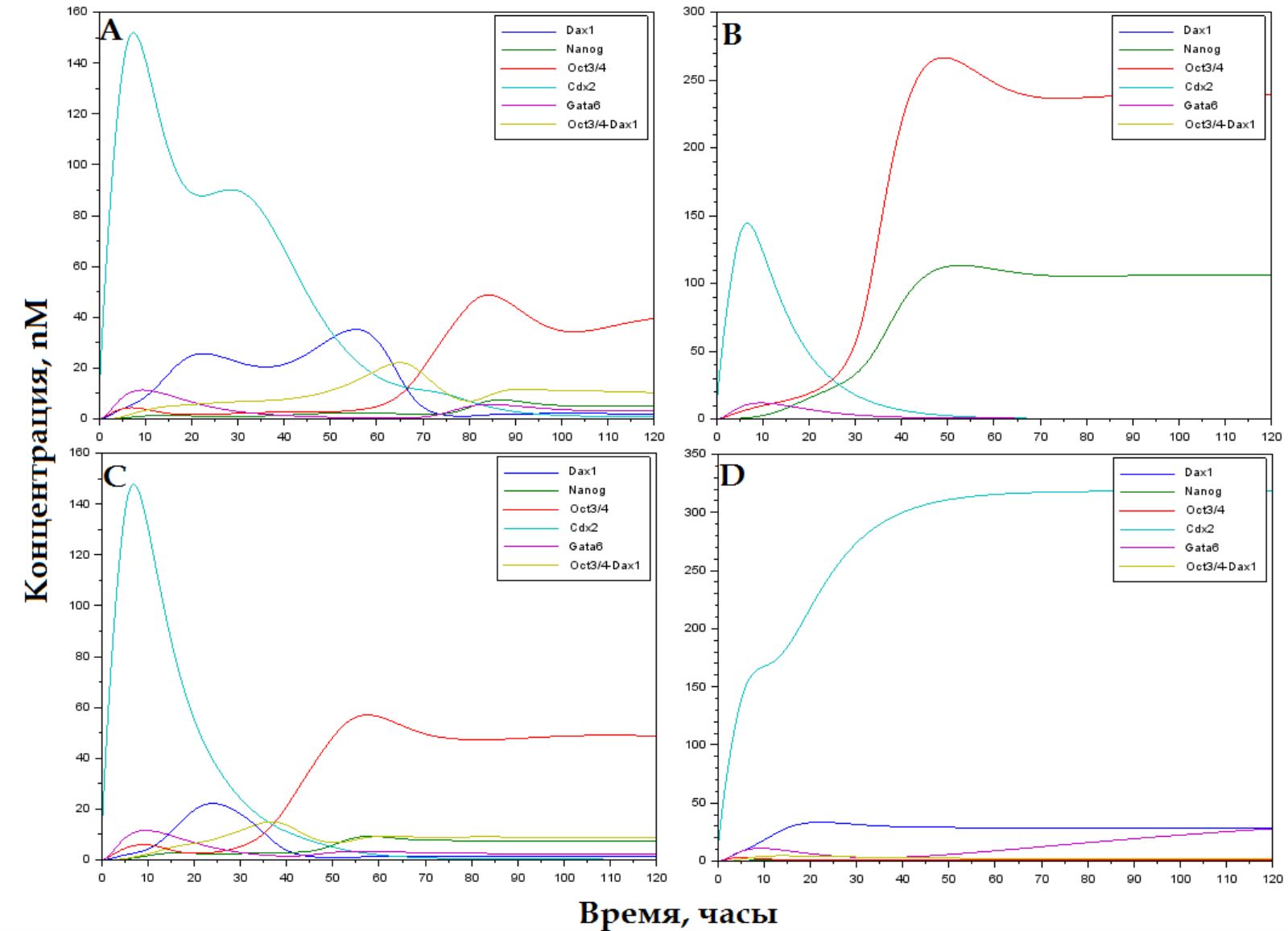
# Дифференцировка плюрипотентных клеток



# Переход из дифференцированного состояния в плюрипотентное



# 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 предпочтительнее подавлять/активировать экспрессию *Nanog* (эндодерма), соответственно, и активировать/ингибировать экспрессию *Cdx2* (трофоэктодерма), соответственно.