

АВТОВОЛНОВАЯ МОДЕЛЬ БИФУРКАЦИОННОГО ПОВЕДЕНИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОЛИСАХАРИДА

© 2017 г. Е.А. Генералов, Н.Т. Левашова*, А.Э. Сидорова*,
П.М. Чумаков, Л.В. Яковенко*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: Generals1179@gmail.com

Поступила в редакцию 27.07.17 г.

Полисахарид с молекулярной массой 1–2 МДа, выделенный из *Helianthus tuberosus L.*, обладает широким спектром биологических активностей, включающих, в частности, переключение трансформированных клеток на путь апоптоза. Ранее было предложено качественное объяснение этого эффекта, основанное на взаимодействии компонентов внутриклеточных сигнальных путей с участием рецепторов Dectin-1, TLR-6 и TNFR1, а также внутриклеточных факторов регуляции апоптоза. В настоящей работе предложена автоволновая модель переключения альтернативных путей поведения клетки при воздействии полисахарида на основе модифицированной системы уравнений ФитцХью–Нагумо и получены численные оценки ее параметров.

Ключевые слова: автоволны, бифуркация, апоптоз, полисахариды, Dectin-1, TLR-6, TNF.

Полисахарид с молекулярной массой 1–2 МДа, выделенный из *Helianthus tuberosus L.* (HTLP) и состоящий в основном из глюкозы (30%), галактозы (23%), глюкуроновых и галактуроновых кислот (15 и 13% соответственно), при добавлении к культурам трансформированных клеток, в частности L-929 и Her-2, вызывал торможение клеточного роста, которое не связано с прямым цитотоксическим действием полисахарида. Ранее экспериментально было показано, что β -(1→3)- и β -(1→4)-гликозидные связи необходимы для проявления биологической активности HTLP и что в модели синтеза фактора некроза опухолей (TNF) макрофагами RAW 264.7 существенны его взаимодействия с двумя рецепторами: Dectin-1 и TLR-6 [1–4]. Эти данные позволяют предложить упрощенную принципиальную схему формирования внутриклеточных регуляторных сигналов (рис. 1), определяющих судьбу клетки, при связывании полисахарида с рецепторами и формировании петли обратной связи с участием TNF и его рецептора первого типа (TNFR1). Последовательность событий можно представить следующим образом.

На наружной стороне мембраны HTLP связывается с рецептором Dectin-1 (или TLR-6), а затем с TLR-6 (или Dectin-1). Взаимодействие HTLP с Dectin-1 приводит к димеризации рецептора. Связывание с рецепторами Dectin-1 и TLR-6 приводит к синтезу цитокина TNF (предположительно по пути через NF- κ B) и активации внутриклеточного белкового комплекса TRADD/FADD рецептора TNFR1 через адапторный белок MyD88. Последняя стадия ингибируется при связывании белка SODD с цитоплазматическим «доменом смерти». SODD постоянно присутствует в цитоплазме и препятствует переходу клетки на путь апоптоза через TRADD, причем цикл связывания–диссоциации SODD с «доменом смерти» имеет длительность около 10 мин.

Вместе с тем по пути через NF- κ B передается и противоапоптотический сигнал, увеличивающий наработку в клетке TNF, TNFR1 и второго ингибитора апоптоза – с-FLIP-белка, который, взаимодействуя с каспазой 8, ингибирует формирование апоптотического каспазного комплекса. Этот фактор активируется опосредованно, с участием NF- κ B-пути.

Вновь синтезированные TNF и TNFR1 способны образовывать комплексы, которые взаимодействуют и образуют тримеры (TNF–

Сокращения: HTLP – полисахарид из *Helianthus tuberosus L.*, TNF – фактор некроза опухолей, TNFR1 – рецептор TNF первого типа.

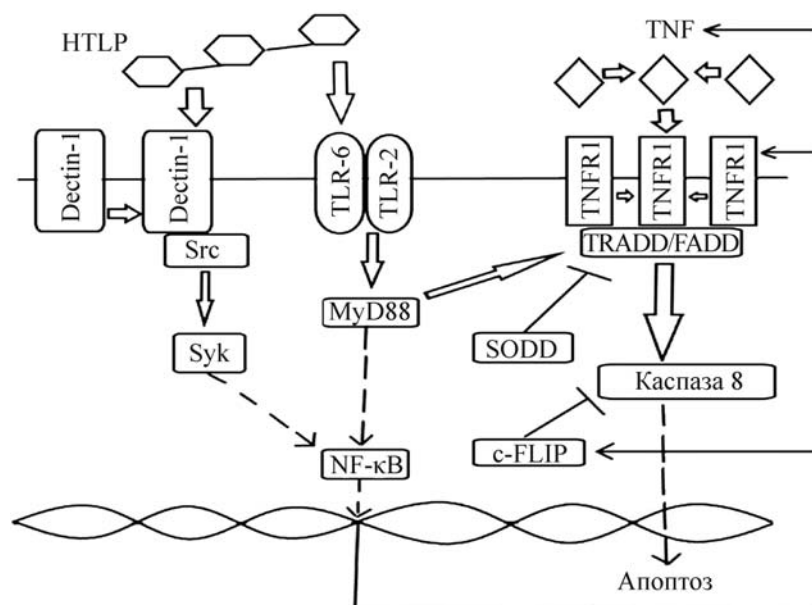


Рис. 1. Принципиальная схема формирования регуляторных сигналов в клетке при взаимодействии НТЛР с рецепторами Dectin-1 и TLR-6. Геном изображен в виде двойной спирали ДНК. Сигнал через NF-κB приводит к активации c-FLIP, увеличению экспрессии TNF и TNFR1. Образование тримера (TNF–TNFR1)₃ приводит к усилению экспрессии как TNF, так и TNFR1.

TNFR1)₃, что приводит к генерации внутриклеточного сигнала для увеличения экспрессии как TNF, так и TNFR1 [5]. Таким образом, формируется петля положительной обратной связи, усиливающая проапоптотический сигнал в результате образования все большего числа активных TRADD- и FADD-белков путем автофосфорилирования. После достижения порогового уровня этого сигнала клетка может перейти из проапоптотического состояния к пред-апоптотическому состоянию и апоптозу.

Известные экспериментальные данные недостаточны для определения всех параметров полной кинетической модели, соответствующей схеме, приведенной на рис. 1. Этим обусловлена необходимость дальнейшего упрощения модели с сохранением физической сути процессов регуляции переключений между различными формами реакции клетки на присутствие НТЛР во внеклеточной среде. В нормальном состоянии клетки уровень проапоптотического сигнала низок, вероятность перехода в пред-апоптотическое состояние мала, и клетка выживает, несмотря на присутствие НТЛР. В трансформированной клетке ситуация другая (использовался параметр ϵ для учета различий в состояниях трансформированных и нормальных клеток). При воздействии НТЛР проапоптотический сигнал может превысить некий пороговый уровень и происходит бифуркация: состояние клетки становится неустойчивым, с большой вероятностью она может перейти не только в пред-

апоптотическое состояние, но и к апоптозу. В связи с этим представляется возможным описание такого бифуркационного поведения клетки с помощью всего двух переменных, выбранных специальным образом.

Все реакции в регуляторных путях происходят самопроизвольно, т.е. с понижением энергии Гиббса системы, поэтому клетку можно рассматривать как активную среду. (Имеются в виду не элементарные, а суммарные реакции, связанные с переносом сигнала между узлами регуляторной сети.) В качестве обобщенной координаты x будем использовать некую условную функцию состояния графа реакций в регуляторной сети, такую, что для реакций на клеточной мембране она равна нулю, а в «геноме» – единице. Две переменные, описывающие поведение клетки, зависят от координаты и времени и соответствуют вероятностям формирования сигналов для выбора проапоптотического или противоапоптотического пути. Поскольку узлов в графе реакций много, перенос сигнала по обобщенной координате можно описать как диффузию [6]. В дальнейшем под диффузией понимается именно такой перенос сигнала.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Для описания поведения клетки в ответ на воздействие НТЛР предлагается использовать

модифицированную систему уравнений ФитцХью–Нагумо [7]:

$$\begin{aligned}\varepsilon^2 \frac{\partial u}{\partial t} - \varepsilon^2 D_u \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} &= -u(u - \alpha)(u - 1) + \gamma uv, \\ \varepsilon \frac{\partial v}{\partial t} - \varepsilon^2 D_v \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} &= -\gamma v + \beta(t)u,\end{aligned}$$

сходную с использованной ранее при моделировании структурообразования в урбоэкосистемах [8]. Система решается численно, при этом на границах области расчета задаются краевые условия Неймана.

В этой системе безразмерные переменные u и v соответствуют вероятностям формирования про- («активатор») и противоапоптотического («ингибитор») сигнала (можно говорить и об интенсивностях соответствующих сигналов). Параметры D_u и D_v – безразмерные коэффициенты диффузии, $\beta(t) > 0$ – кинетический параметр взаимодействия активатора и ингибитора, α – параметр активации системы, γ – кинетический параметр затухания противоапоптотического сигнала, ε – кинетический параметр, позволяющий учесть различие в скоростях распространения про- и противоапоптотического сигнала. Связь параметров модели с реальными характеристиками сигнальной сети и их численные оценки будут приведены ниже.

Для многих интермедиатов регуляторных реакций характерны колебания чисел молекул с разными средними значениями периодов. Так, количество молекул SODD (N_{SODD}) в цитоплазме осциллирует со средним периодом около 10 мин [9]. Оценка среднего периода колебаний числа молекул c-FLIP ($N_{\text{c-FLIP}}$) на основе данных работы [10] дает значение около 15 мин. Для упрощения задачи колебания чисел молекул аппроксимированы гармонической функцией, при этом

$$\beta(t) = 0,2 + 0,05\sin(0,004t),$$

где время t выражено в секундах. Для среднего значения $N_{\text{c-FLIP}}$ получаем значение 1475 (изменения в пределах от 950 до 2000), что не противоречит известным данным [11]. Количество рецепторов TNFR1 (N_{TNFR1}) на клеточной мембране составляет от 500 до 5000 [12], а при внесении HTLP синтезируется около 1200 молекул TNF [3], поэтому в качестве оценки можно принять, что число тримеров рецепторов с лигандом равно 400. Предельное значение N_{SODD} равно количеству связанных триплетов (TNF–TNFR1)₃ ($N_{\text{(TNF–TNFR1)3}}$), т.е. 400.

Для оценок других параметров модели надо определить количество сайтов связывания

HTLP с рецепторами Dectin-1 и TLR-6. Для связывания с рецепторами требуется последовательность из 10–11 мономеров глюкозы с β -(1→3)- или β -(1→4)-гликозидной связью [13]. Средняя молекулярная масса HTLP составляет 1,5 МДа, он содержит примерно 30% глюкозы с молекулярной массой около 180 Да, поэтому в качестве оценки количества сайтов связывания с рецепторами β -глюканов на молекуле HTLP (N_{HTLP}) можно принять значение 250, при этом максимальное значение составляет около 330.

Параметр активации системы α пропорционален числу сайтов связывания полисахарида и обратно пропорционален числу рецепторов связывания Dectin-1 и TLR-6. На клеточной мембране находится примерно 600 рецепторов Dectin-1 (N_{Dectin}) [14,15] и около 15 димеров рецепторов TLR-2/TLR-6 ($N_{\text{TLR-6}}$) [16,17]. Для оценки параметра α можно использовать соотношение: $\alpha = \frac{N_{\text{HTLP}}}{N_{\text{Dectin}} + N_{\text{TLR-6}}} = 0,4$ – параметр

активации системы. Кинетический параметр затухания противоапоптотического сигнала γ можно оценить по соотношению: $\gamma = \frac{N_{\text{TLR-6}} + N_{\text{(TNF–TNFR1)}}}{N_{\text{SODD}} + N_{\text{c-FLIP}}} = \frac{415}{400 + 1475} = 0,2$.

Для коэффициентов диффузии можно получить оценки на основании формулы Эйнштейна: $D_i = \frac{x^2}{t_i}$, где $x = 1$, а t_i – время переноса

соответствующего сигнала. Время формирования каспазного комплекса и его миграция к ДНК может составлять 15 мин (0,25 ч) [18],

поэтому: $D_u = \frac{1}{0,25} = 4$. Время формирования

комплексов белков p50 и p65 с ДНК по пути через NF-кВ может составлять 30 мин

(0,5 ч) [10,19,20], поэтому $D_v = \frac{1}{0,5} = 2$. Для

кинетического параметра ε принято значение 0,01, позволяющее получить поведение модели, согласующееся с экспериментальными данными. Период полураспада TNF составляет около 4 ч, и ему должен соответствовать период осцилляций T во всей системе регуляции, но для удобства счета в модели использовано безразмерное время (нормированное на T).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2–4 приведены рассчитанные зависимости интенсивностей сигналов от координаты для различных интервалов времени. Зна-

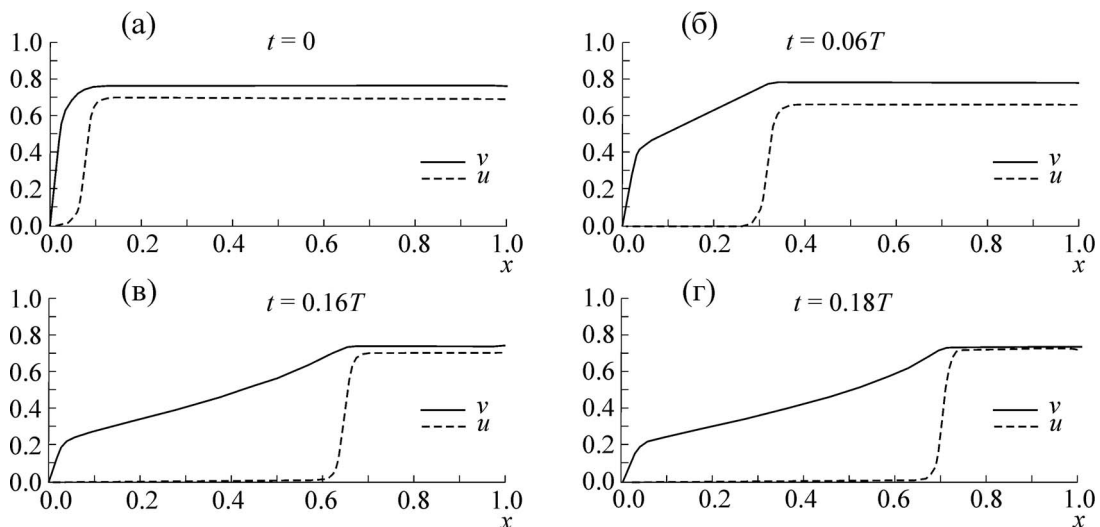


Рис. 2. Пространственное распределение интенсивностей про- и противоапоптотических сигналов на начальных стадиях переноса. Вероятность выживания клетки выше вероятности перехода в предапоптотическое состояние.

чения u и v при $x = 1$ определяют вероятности экспрессии факторов регуляторной сети, ответственных за переход клетки либо в предапоптотическое состояние, либо в состояние, соответствующее ее выживанию. Максимумы распределения u и v по x соответствуют координатам узлов сети, несущих наибольшую нагрузку в формировании сигналов в данный момент времени. После установления соответствия между полной кинетической моделью и моделью, рассмотренной в настоящей работе, появится возможность идентификации реальных участников переноса сигналов.

На малых временах ($t < 0,18T$) интенсивность противоапоптотического сигнала, поступающего в геном, выше интенсивности проапоптотического сигнала, и вероятность выживания клетки больше вероятности гибели (рис. 2). Передача проапоптотического сигнала в геном приводит к увеличению экспрессии TNF и TNFR1, что, в свою очередь, приводит к увеличению вероятности формирования каспазного проапоптотического комплекса и переключению клетки на путь к предапоптотическому состоянию или апоптозу. Миграции TNF и TNFR1 к мембране и формированию их комплексов соответствует пространственное расширение проапоптотического сигнала на рис. 4. Если связывание лиганда с рецептором, приводящее к наработке TNF и TNFR1, достаточно продолжительно ($t > 0,25T$), то вероятность перехода клетки в предапоптотическое состояние превышает вероятность выживания (рис. 3). Если же клетка изменена недостаточно и ее компенсаторные (регуляторные) механизмы работают нормально, то вероятна ситуация, при

которой клетка выживет, нивелировав воздействие НТЛР. Такой ход событий наблюдается в экспериментах с нормальными клетками, например, с мононуклеарами периферической крови доноров [21].

По мере активации системы происходит частичное перераспределение интенсивностей противо- и проапоптотических сигналов за счет связывания части ингибиторов адапторных белков, участвующих в передаче сигнала, приводящего к апоптозу клетки. Благодаря механизмам обратной связи и противоапоптотическим сигналам, передающимся в геном по пути через NF-κB, возрастает вероятность обратного переключения клетки, т.е. ее выживания. На больших временах количество рецепторов, связанных с НТЛР и TNF, уменьшается за счет деградации, что приводит ко второму переключению поведения клетки и ее выживанию. При этом переключение возможных форм поведения клетки – выживание или переход к апоптозу – становится циклическим.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенная нами модель позволяет проиллюстрировать бифуркационные процессы, индуцируемые в клетке внешним воздействием в виде полисахарида. Показана возможность цикличности переключений между формами поведения клетки. Использованный подход, при его расширении и доработке, может быть полезен в качестве прогностического при разработке лекарств и проверке их действия на живую клетку *in situ*.

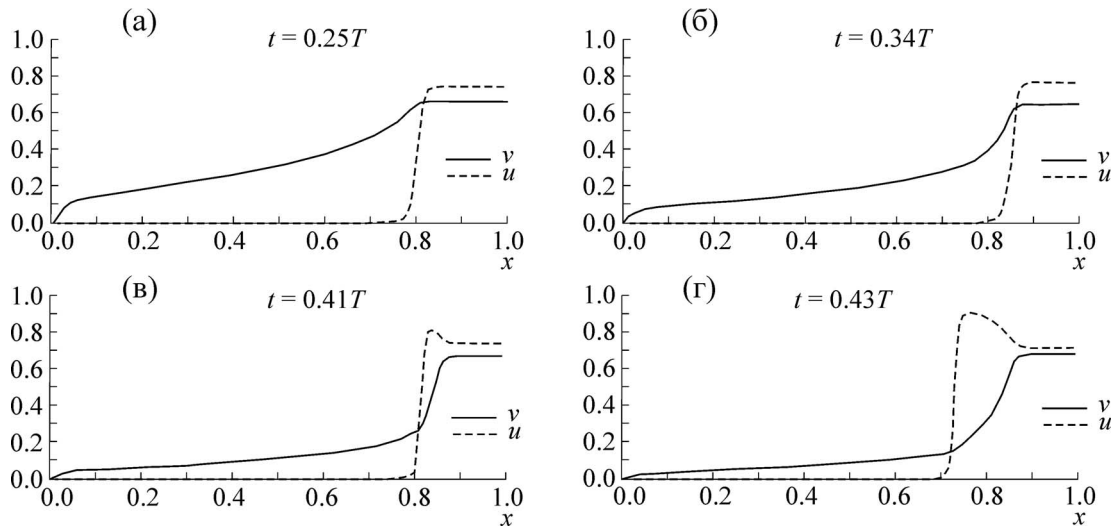


Рис. 3. Пространственное распределение интенсивностей про- и противоапоптотических сигналов на промежуточных стадиях переноса. Вероятность перехода клетки в предапоптотическое состояние превышает вероятность выживания.

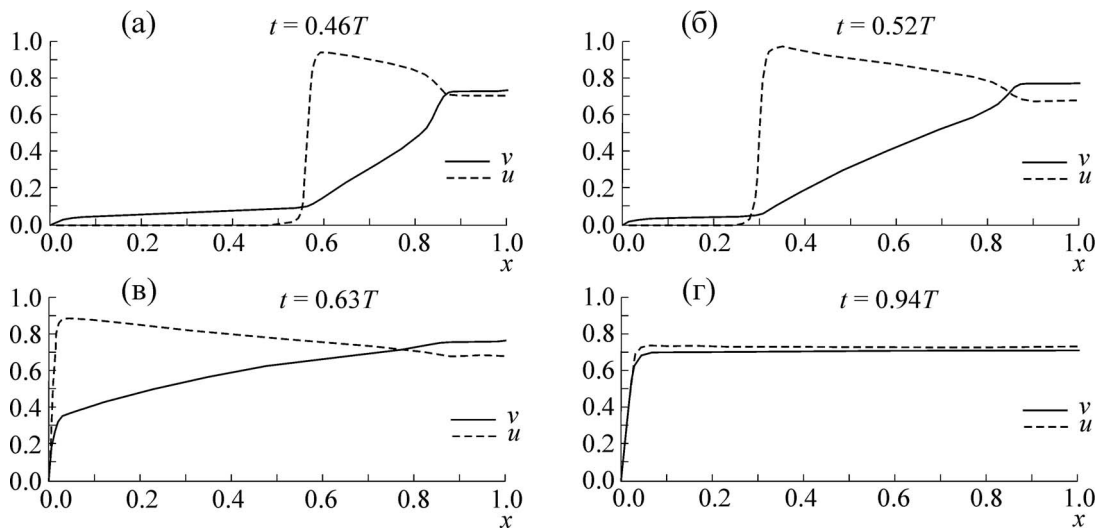


Рис. 4. Пространственное распределение интенсивностей про- и противоапоптотических сигналов на больших временах. Вероятность выживания клетки снова превышает вероятность перехода в предапоптотическое состояние, но в конце цикла эти вероятности практически совпадают.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке Министерства образования Российской Федерации (код проекта RFME-FI60714X0014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Е. А. Генералов, *Биофизика* **60** (1), 65 (2015).
2. Е. А. Generalov, *ARC J. Cancer Sci.* **1** (1), 5 (2015).
3. Е. А. Генералов и Л. В. Генералова, в сб. *Тезисы VIII Международной научной конференции #SCIENCE4HEALTH* (РУДН, М., 2017), с. 270.
4. Е. А. Генералов и А.И. Афремова, *Биофизика* **61** (4), 660 (2016).
5. S. Schütze, V. Tchikov, and W. Schneider-Brachert, *Mol. Cell Biol.* **9**, 665 (2008).
6. Н. Eyring and E. M. Eyring, *Modern chemical kinetics* (Reinhold publishing corporation, N.Y., 1963).
7. R. FitzHugh, *Biophys. J.* **1** (6), 445 (1961).
8. А. Э. Сидорова, Н. Т. Левашова, А. А. Мельникова и А. Е. Семина, *Математическая биология и биоинформатика* **12** (1), 186 (2017).
9. Q. Li, A. K.-K. Ching, B. C.-L. Chan, et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 52106-52116 (2004).

10. D. M. Underhill, E. Rosznagle, C. A. Lowell, and R. M. Simmons, *Blood* **106** (7), 2543 (2005).
11. K. Ranjan and C. Pathaka, *Sci. Rep.* **6**, 22787 (2016).
12. M. Fallahi-Sichani, M. A. Schaller, D. E. Kirschner, et al., *PLoS Comput. Biol.* **6** (5), e1000778 (2010).
13. A. S. Palma, T. Feizi, Y. Zhang, et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 5771 (2006).
14. A. Galès, A. Conduché, J. Bernad, et al., *PLoS Pathog.* **6** (1), e1000714 (2010).
15. P. R Taylor, S. Roy, S. M. Leal Jr, et al., *Nature Immunol.* **15**, 143 (2014).
16. A. M. Hajjar, D. S. O'Mahony, A. Ozinsky, et al., *J. Immunol.* **166** (1) 15 (2001).
17. T. Nishiya and A. L. DeFranco, *J. Biol. Chem.* **279**, 19008 (2004).
18. N. Gnesutta and A. Minden, *Mol. Cell Biol.* **23** (21), 7838 (2003).
19. *Trends in DNA research*, Ed. by C. R. Woods (Nova Biomedical Books, N.Y., 2006).
20. K. M. Dennehy, G. Ferwerda, I. Faro-Trindade, et al., *Eur. J. Immunol.* **38** (2), 500 (2008).
21. E. A. Генералов, *Биофизика* **60** (1), 73 (2015).

Autowave Model of Bifurcational Behaviour of Transformed Cells under the Action of Polysaccharide

E.A. Generalov*, N.T. Levashova, A.E. Sidorova**,
P.M. Chumakov*, and L.V. Yakovenko****

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

***Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia*

Polysaccharide with a molecular weight of 1–2 MDa, isolated from *Helianthus tuberosus L.* has a wide range of biological activities, including particularly the switching of the transformed cells to apoptosis. Previously, a qualitative explanation of this effect was proposed, based on interaction of the components of intracellular signalling pathways involving Dectin-1, TLR-6 and TNFR1 receptors, as well as intracellular factors of apoptosis regulation. In this work, an autowave model for switching alternative ways of cell behaviour under the action of polysaccharide based on the modified FitzHugh–Nagumo system of equations, was proposed and numerical estimation of its parameters was obtained.

Keywords: autowaves, bifurcation, apoptosis, polysaccharides, Dectin-1, TLR-6, TNF