

СИСТЕМНАЯ БИОЛОГИЯ СЕТЕЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

© 2016 г. И.Н. Лаврик* **, М.Г. Самсонова***

*Университет Отто фон Гюрике, Магдебург, Германия;

**Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

***Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru

Поступила в редакцию 09.10.15 г.

Сети передачи сигнала играют центральную роль в регуляции как функционирования отдельных клеток, так и регуляции функции всего организма. В последнее время революционное развитие получили технологии системной биологии, которые используют комбинацию экспериментальных и математических методов и позволяют моделировать сигнальные пути на уровне отдельных клеток и на уровне клеточных популяций. Данный подход позволил выявить новую информацию о регуляции целого ряда биологических процессов. В данном обзоре мы обсуждаем основы математических формализмов, применяемых для создания моделей сетей передачи сигнала, и экспериментальные технологии, используемые в данной области.

Ключевые слова: сигнальные пути, математическое моделирование, системная биология, апоптоз.

Благодаря сетям передачи сигнала клетка контролирует условия своего существования и изменяет поведение для адекватного использования ресурсов. Такие сети координируют сигналы внешней среды, функционирование генома и метаболизм, и поэтому их изучение важно для понимания причинно-следственной связи между генотипом и фенотипом. Характерной особенностью сетей передачи сигнала является четкая выраженность уровней структурной организации: в таких сетях можно всегда выделить молекулы, запускающие сигнальный каскад, молекулы-передатчики и мишени. Создание математических моделей сигнальных путей позволяет описать события, происходящие в клетке на системном уровне, и выявить ключевые стадии, отвечающие за регуляцию изучаемого сигнального пути. Такой подход важен при создании лекарств против заболеваний, ассоциированных с дефектами в сигнальных каскадах, и в будущем позволит разработать специальные методы лечения, основанные на индивидуальных характеристиках организма.

Для разработки математических моделей сигнальных путей, а также для проверки предсказаний математической модели используют

целый ряд современных экспериментальных методов. Эти методы позволяют получить детальную информацию о концентрациях молекул в сигнальном пути, а также о константах их взаимодействия, что является необходимым базовым знанием для построения целого ряда математических моделей.

К настоящему моменту созданы математические модели целого ряда сигнальных каскадов, включая фосфорилирование активируемых протеинкиназ, активацию различных факторов транскрипции и процессы клеточной гибели [1,2].

Вместе с тем, несмотря на достигнутые успехи, создание предикативных математических моделей сетей передачи сигнала и их анализ остается сложной и крайне насущной проблемой. Заманчивым и простым подходом к моделированию сигнальных путей является использование моделей электрических сетей. Действительно, с точки зрения инженера, компоненты сети передачи сигнала можно рассматривать как сенсоры, трансдьюсеры и актуаторы [3]. Сенсоры располагаются на плазматической мембране или в компартментах клетки, осуществляют мониторинг окружающей среды и передают информацию актуаторам. Они в свою очередь воздействуют на компоненты, которые модулируют экспрессию генов, метаболизм или цитоскелет клетки и в конечном счете реали-

Сокращения: МАПК – митоген-активируемые протеинкиназы, FRET-сигнал – сигнал флуоресцентного резонансного переноса.

зуют фенотип, соответствующий условиям окружающей среды. К сожалению, такой формализм оказался применим только к сетям небольшого размера. Большинство же сетей передачи сигнала содержит большое число компонент, которые гетерогенны по составу, характеризуются разным динамическим поведением и разной пространственной локализацией, поэтому для их моделирования надо использовать другие, более сложные подходы [4,5].

В данном обзоре мы обсуждаем принципы организации путей передачи сигнала, а также экспериментальные и математические методы, применяемые для моделирования таких путей на уровне отдельных клеток и на уровне клеточных популяций, обсуждаем, почему это важно, а также приводим примеры моделей, которые показывают, как моделирование в пространстве и времени позволяет получить новую информацию о биологических процессах.

КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПОДХОДЫ К МОДЕЛИРОВАНИЮ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

В настоящее время для моделирования сигнальных путей используют два взаимодополняющих подхода: качественный и количественный. Количественный подход обычно применяют, если стоит задача расшифровки механизмов пути передачи сигнала. В идеале, количественная модель должна строго описывать концентрацию и локализацию каждого компонента пути при заданных условиях внешней среды, однако для такого описания требуется исчерпывающая информация о кинетических параметрах. Качественный же подход направлен на анализ структурной организации сигнального пути. Качественная модель позволяет идентифицировать, какой сигнальный путь приводит к изменению фенотипа клетки в ответ на то или иное изменение внешней среды, но не описывает концентрации компонент пути и их активности [6,7]. Такой формализм можно использовать для исследования топологических особенностей моделей сигнальных путей – для идентификации путей и кроссвзаимодействия между ними, а также для обнаружения «пробелов» – отсутствующих компонент пути. Отметим, что поскольку данные, генерируемые современными омиксными технологиями в лучшем случае являются полуколичественными, для анализа и моделирования сигнальных путей большого размера более уместным является качественный подход.

Качественные модели сигнальных путей. Логические модели дают общее представление о динамике больших систем. Такой формализм в биологии был впервые предложен С. Кауффманом [8,9] и Р. Тома [10]. Здесь мы рассмотрим формализм, развивающий подход Тома, в рамках которого возможен учет того, что разные уровни сигнала могут оказывать разный эффект на мишени [11–13]. В рамках этого формализма сигнальный путь и его динамика моделируются двумя графами, из которых один называют логическим графом регуляции (структурная модель), а другой – графом переходов (динамическое поведение модели).

В логическом графе регуляции узлы обычно соответствуют компонентам пути и их мишеням. Компонентами могут быть биологические молекулы (гены, белки, РНК, метаболиты и т.п.) или функциональные процессы (например, фаза клеточного цикла, начало апоптоза и т.п.). С каждым узлом ассоциирована логическая функция.

По умолчанию узел может принимать два значения: «1» – компонента активна – и «0» – компонента не активна. В случае необходимости допускается большее число уровней. Отметим, что если компоненты пути принимают только два значения из интервала $[0,1]$, то такая модель называется булевой. Узлы графа соединены ребрами, которым приписан положительный знак в случае активации мишени и отрицательный в случае ее ингибирования. Одному узлу может соответствовать несколько ребер, это позволяет описать взаимодействия по типу обратной связи или качественно разный эффект воздействия разных концентраций регулятора. Если исходящий узел имеет несколько уровней активности, пороговое значение (для булевых моделей по умолчанию – 1) должно быть приписано каждому из исходящих ребер. С помощью ребер можно описывать различные типы воздействий: транскрипционную регуляцию (т.е. активацию или репрессию транскрипции какого-либо гена), биохимические реакции (фосфорилирование/дефосфорилирование или деградацию белка и т.п.) или более сложные ситуации (например, модуляцию активности, действие кофакторов и т.п.).

Логическая модель представляет собой совокупность логических правил, ассоциированных с каждой компонентой графа. Логические правила объединяют позитивные и негативные воздействия с помощью логических операторов AND, OR и NOT и определяют значение мишени с учетом значений ее регуляторов [11,14].

Динамическое поведение модели описывается в виде графа переходных состояний. В

этом графе значения узлов соответствуют состоянию системы в данный момент времени, которое описывается вектором с элементами – значениями всех компонент графа регуляции. Ребра, соединяющие узлы, выступают в качестве транзаций, опосредованных логическими правилами. Таким образом, каждое последующее состояние системы вычисляется путем сравнения значений всех ее компонент в данный момент времени с соответствующими значениями, вычисленными с помощью логических правил. Если вычисленное значение компоненты отличается от текущего, должно произойти ее обновление. При этом вычисление нового состояния компоненты зависит от того, каким образом происходит обновление: синхронно или асинхронно. При синхронном обновлении все компоненты принимают новые значения одновременно [9]. В этом случае поведение модели оказывается детерминированным, поскольку каждое текущее состояние может иметь только одно последующее. В случае асинхронного обновления обновление каждой компоненты происходит индивидуально и новые состояния системы генерируются после каждого обновления [11].

Численное моделирование в рамках логических моделей может привести к точечному аттрактору – стабильному состоянию, когда вычисленное состояние системы полностью совпадает с текущим. С биологической точки зрения точечный аттрактор может описывать, например, дифференцированную клетку. Альтернативно, результатом численного моделирования может оказаться сложный циклический аттрактор, что с биологической точки зрения означает периодическое поведение, как, например, в случае клеточного цикла [14].

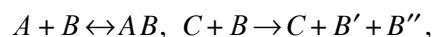
Предложены различные модификации численного моделирования в рамках логического формализма с тем, чтобы упростить вычисления в случае асинхронного обновления состояний или для моделирования больших сигнальных путей [15–17]. Последняя задача является чрезвычайно актуальной с учетом развития современных омиксных технологий и получения огромного объема и количества экспериментальных данных, описывающих глобальную регуляцию сигнальных путей в клетке.

Количественные модели сигнальных путей.

Количественные модели сигнальных путей описывают химические реакции, составляющие путь передачи сигнала, с помощью уравнений химической кинетики. Каждая реакция сбалансирована в отношении числа вступающих в реакцию и образующихся в результате реакции

молекул и описывается в соответствии с законом действия масс [18].

В качестве примера рассмотрим две реакции, из которых одна обратима и описывает связывание и диссоциацию двух молекул A и B , а вторая – расщепление молекулы B протеазой C :



где A и B – вещества, вступающие в первую реакцию, AB – продукт первой реакции, C – фермент, B' и B'' – полипептиды, образующиеся в результате расщепления белка B .

Пусть k_1 и k_{-1} – константы скорости прямой и обратной первой реакции соответственно, k_2 – константа протеолиза. Тогда скорости первой и второй реакции могут быть записаны как

$$v_1 = k_1[A][B] - k_{-1}[AB], \quad v_2 = k_2[C][B].$$

Если концентрации белков A , B и C в начальный момент времени известны, то скорости реакций достаточны для описания того, как концентрации всех белков и продуктов меняются во времени. Эти изменения можно выразить в форме обыкновенных дифференциальных уравнений. Например, исходная концентрация B уменьшится из-за ассоциации с A , а также благодаря протеолизу. Таким образом, уменьшение концентрации B зависит от скоростей первой и второй реакций:

$$dB/dt = -v_1 - v_2.$$

Изменение концентраций других компонент системы может быть описано следующими дифференциальными уравнениями:

$$d[B']/dt = d[B'']/dt = v_2; \quad d[A]/dt = -v_1; \quad d[AB] = v_1; \\ d[C]/dt = 0 \rightarrow [C] = \text{const.}$$

Эти дифференциальные уравнения полностью описывают эволюцию системы и результатом их решения будут кривые изменения концентраций всех ее компонент во времени. Константы скоростей реакций можно найти из литературы, а если они еще не были определены экспериментально, то путем математической подгонки решений уравнений к экспериментальным данным [19].

НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

В последнее время стало очевидно, что вышеописанный формализм не достаточен для описания сигнальных путей [5]. Дело в том, что большинство белков, участвующих в сиг-

налинге, обладают большим количеством сайтов взаимодействия с другими белками и участвуют в образовании многочисленных гетерогенных макромолекулярных белковых комплексов, каждый из которых вступает в многочисленные и происходящие параллельно реакции [20–22]. Даже самая первая реакция пути передачи сигнала может повлечь за собой сотни тысяч разных состояний, называемых микросостояниями пути [20,23]. Поскольку число микросостояний возрастает с каждым этапом, обычно модели сигнальных путей игнорируют это комбинаторное разнообразие и моделируют только часть поддающихся моделированию состояний и реакций [18].

Предложены подходы для решения этой проблемы, основанные на создании правил для автоматической генерации молекул и реагентов. Такой подход реализован в пакетах StochSim [24], BioNetGen [25], и Molilizer [26]. Сеть микросостояний может быть сгенерирована заранее или, при стохастическом моделировании, в ходе моделирования [24–26].

Альтернативный, домен-специфичных подход заключается в упрощении задачи и в механистической аппроксимации микросостояний макро-состояниями. Так, например, детальная информация о кинетике взаимодействия белков семейства Bcl-2 с регуляторными белками, которое контролирует потенциал внешней мембраны митохондрий и, тем самым, последующий выход цитохрома *c* и запуск апоптоза, или о быстром образовании мультисубъединичного комплекса апоптосомы при активации каспазы-9 отсутствует. Было предложено, не вдаваясь в детали взаимодействий, описать каждый из этих сложных процессов математической функцией, характеризующей кинетику всего процесса [27]. Данные *in vitro* указывают на то, что формирование апоптосомы и конверсия прокаспазы-9 в каспазу-9 – очень быстрые процессы [28]. Количественные данные иммуноблотов, оценивающих конверсию прокаспазы-9, хорошо аппроксимируются логистической кривой. Поэтому экспоненциальная функция, выходящая на плато, была выбрана для описания опосредованной апоптосомой активации каспазы-9 [29].

Таким образом, представления о сигнальных путях как о линейных, так и о дискретных пришли в противоречие с новыми данными. Стало очевидным, что компоненты сигнальных путей образуют сеть, в которой отдельные элементы получают информацию от множества других компонент [21,22]. Удивительной особенностью этой сети является использование ограниченного числа механизмов для передачи сигнала. Действительно, например, все пути,

активируемые рецептором тирозинкиназы, содержат сходный набор компонент [30]. Как рецепторы, сопряженные с G-белком, так и рецепторы различных тирозинкиназ активируют каскады киназ и фосфатаз, таких как митоген-активируемые протеинкиназы (МАПК), и активируют экспрессию генов транскрипционных факторов в ядре. Что же тогда обуславливает специфику передачи сигнала? В настоящее время можно с уверенностью утверждать, что ни один из сигнальных путей, активируемых рецептором, не содержит компонент, обуславливающих такую специфику, и что специфичность передачи определяется особенностями поведения компонент сети во времени и пространстве [5]. Классическим примером, демонстрирующим правильность такого утверждения, являются опыты по стимуляции клеток PC12 эпидермальным фактором роста и фактором роста нервов [31,32]. Эпидермальный фактор роста индуцирует кратковременную стимуляцию МАПК, что приводит к делению клеток, в то время как долговременная активация МАПК под действием фактора роста нервов индуцирует дифференцировку клеток. Помимо временных характеристик, на поведение каскада МАПК оказывает влияние их вовлеченность в различные макромолекулярные комплексы, а также пространственная локализация [5].

Характерным мотивом сигнальных путей является цикл, образованный, по меньшей мере, двумя формами сигнального белка, которые конвертируются двумя противоположными по действию ферментами, например киназой и фосфатазой в случае фосфопротеинов или фактором обмена гуаниновых нуклеотидов, и белком, активирующим ГТФазу в случае G-белков. Каскады таких циклов формируют основу большинства сигнальных путей, передающих внешние стимулы от мембраны клетки к ядру [5]. Установлено, что динамика концентрации сигнальных белков в таких каскадах может описываться разными кривыми в диапазоне от гиперболической до сигмоидной с крутым подъемом в зависимости от того, действует ли конвертирующий фермент в условиях насыщения субстратом или нет, происходит ли его ингибирование продуктом реакции, удаляется ли сигнальный белок после конверсии и фосфорилируется один или несколько сайтов в случае фосфопротеинов [33–35].

Показано также, что увеличение числа циклов или регуляция по типу обратной связи изменяют динамическое поведение системы [36]. Положительная регуляция по типу обратной связи может привести к бистабильности или к релаксационным колебаниям [37,38], а отрица-

тельная регуляция такого типа – к адаптации и устойчивости к варьированию параметров в регуляторном контуре [39].

Активация рецепторов на поверхности клеток и их мишеней влечет пространственную реорганизацию многих белков клетки. Показано, что локализация сигнальных белков на внутренних мембранах и в мембранных микродоменах (липидных рафтах) модулирует результат сигналинга [40]. Имеются данные о том, что характер сигналинга зависит от того, где локализуется рецептор и расположенные «вниз по течению» эффекторы – на эндосомах или плазматической мембране [41]. Так, например, динамическое поведение каскада МАПК – его чувствительность к субстрату – зависит от того, где этот каскад локализован – на плазматической мембране, в аппарате Гольджи или на эндосомах [42,43]. Таким образом, в ходе эволюции клетка выработала не только механизмы контроля поведения путей передачи сигнала во времени, но и механизм точной индикации относительной локализации сигнальной молекулы. Специфичные заякоривающие субъединицы направляют каталитические субъединицы киназ и фосфатаз, таких как цАМФ-зависимая протеинкиназа, протеинкиназа С и сериновые/треониновые протеинфосфатазы PP1, PP2A и PP2B, в различные районы клетки. Эти механизмы обеспечивают ориентацию ферментов с широкой специфичностью относительно специфических мишеней и физическое обособление их от нежелательных субстратов. Пространственное обособление киназ и фосфатаз и их субстратов повышает специфичность и точность фосфорилирования и дефосфорилирования [5].

Следует отметить, что большинство математических моделей, созданных к настоящему моменту, описывает динамическое поведение компонент сигнального каскада без учета их внутриклеточной локализации, т.е. на уровне популяций, а не на уровне отдельной клетки. Как следует из вышеизложенного, пространственная локализация компонент сигнального пути во многом определяет их динамику и специфичность всего пути в целом. Таким образом, детальное моделирование сигнальных путей с учетом пространственной информации является актуальнейшей задачей, поскольку только в рамках такого подхода можно правильно описать динамическое поведение сигнального пути и объяснить механизмы, обуславливающие его специфичность и особенности поведения [5].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПУТЕЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА

К настоящему моменту разработан целый набор экспериментальных методов, применяемых для моделирования сигнальных путей как на уровне отдельных клеток, так и на уровне клеточных популяций. Одним из наиболее широко используемых подходов для получения данных на уровне популяций является метод количественного иммуноблоттинга. Данный подход основан на использовании антител к белкам определенного сигнального пути и на количественном анализе интенсивности сигнала, получаемого в результате иммуноблоттинга. Более того, применение рекомбинантных белков в различных концентрациях позволяет получить информацию об абсолютных концентрациях белков изучаемого сигнального пути. Данный анализ также делает возможным количественный мониторинг изменений, происходящих с белком, например, таких как протеолиз, т.е. образование различных продуктов расщепления белка или его модифицированных форм. Тем не менее метод иммуноблоттинга не позволяет количественно описать целый ряд процессов в биологических системах, таких как осцилляции, колебания или нелинейное изменение концентрации на уровне отдельных клеток, поскольку применение антител к изучаемому белку позволяет описать лишь изменение его концентрации, усредненное по количеству используемых в эксперименте клеток.

Для моделирования сигнальных сетей в пространстве и времени также необходимы экспериментальные данные на уровне отдельных клеток [2,44,45]. Целый ряд методов клеточной биологии и биохимии, к сожалению, не дает возможность получить такую информацию, а, наоборот, предоставляет экспериментальные данные только на уровне клеточных популяций [46]. Так, методы иммуноблоттинга или классической проточной цитометрии не позволяют измерить концентрации белков в отдельных клетках в определенный момент времени и тем более получить информацию о перемещении белков внутри клетки между различными компартментами [47]. Поэтому для получения экспериментальных данных на уровне отдельных клеток обычно применяются методы флуоресцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в комбинации с использованием фотоактивируемых флуоресцентных белков [44,48,49]. В течение двух последних десятилетий данная технология получила революционное развитие и позволила получить уникальную информацию о биологических процес-

сах. Флуоресцентные белки, такие как зеленый флуоресцентный белок (англ., green fluorescent protein, GFP), позволяют проследить за белок-белковыми взаимодействиями и сигнальными процессами в клетке в реальном времени [50]. Помимо зеленого флуоресцентного белка, который послужил основой для создания современных технологий мониторинга биологических процессов на уровне отдельных клеток, в настоящее время создан целый ряд разнообразных фотоактивируемых флуоресцентных белков с различным типом светоиндуцируемых спектральных переходов, которые создают огромный потенциал для изучения сигнальных сетей в пространстве и времени [48].

Можно выделить несколько основных направлений получения количественной информации с помощью флуоресцентных белков для математического моделирования. Первое направление – это изучение внутриклеточной локализации белка. В данном случае для получения необходимой информации на количественном и качественном уровне создается гибридный белок, который включает в себя изучаемый белок и фотоактивируемый флуоресцентный белок. Такой конструктор позволяет следить за перемещением белка в клетке между различными внутриклеточными органеллами. Так, например, в качестве метода детекции активации транскрипционного фактора NF- κ B, широкое распространение получило измерение транслокации из цитозольного компартмента в ядро субъединицы p65 [51]. Ядерная транслокация фактора NF- κ B в комбинации с различными флуоресцентными белками позволяет количественно охарактеризовать данный процесс в реальном времени, что создает уникальную возможность использовать такие данные для математического моделирования [51,52]. В изучении программируемой клеточной гибели важную информацию о динамике этого процесса можно получить при изучении его белков-регуляторов, которые вовлечены в транспорт из/в митохондрии и, таким образом, инициируют процесс запуска гибели клеток [53,54,27]. Современные методы флуоресцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии позволяют точно определить время изменения локализации белка, а также количественно оценить данный процесс, что активно используется при математическом моделировании, например, программируемой клеточной гибели [55].

Вторым важным направлением использования флуоресцентных белков является создание конструкторов, которые детектируют активность определенного процесса. Так, в ходе инициации процесса программируемой клеточной гибели,

т.е. апоптоза, происходит активация ферментов каспаз (англ., caspase cystein specific aspartate protease) [56]. Каспазы относятся к семейству цистеиновых протеаз, которые активируются в клетке лишь при запуске апоптоза и при этом расщепляют целый ряд клеточных белков, что собственно и приводит к гибели клеток. Для детекции активности каспаз на уровне отдельных клеток были разработаны специальные субстраты, которые состоят из линкерной аминокислотной последовательности, соединяющей два флуоресцентных белка, например YFP и CFP [44,57]. Данные флуоресцентные белки при нахождении в непосредственной близости генерируют сигнал флуоресцентного резонансного переноса энергии (fluorescence resonance energy transfer – FRET) При этом линкерная последовательность включает в себя субстратную последовательность каспазы, которая может быть расщеплена при индукции апоптоза и активации каспаз в клетке [58]. Расщепление линкера, соединяющего белки YFP и CFP, приводит к исчезновению сигнала FRET [57]. Соответственно, данные процессы происходят лишь в процессе индукции апоптоза и последующей активации каспаз, что делает возможным количественную оценку инициации клеточной гибели на уровне отдельных клеток [55]. Создание проб каспазной активности позволило построить целый ряд математических моделей апоптотического сигнального пути на уровне отдельных клеток [2,27,53,58]. Более того, конструирование сенсоров активности, в основе которых лежит FRET, активно используется не только при изучении программируемой клеточной гибели, но и для ряда других сигнальных путей и их моделирования.

К третьему важному направлению можно отнести изучение деградации белков, клеточных органелл и целых клеток. В данном случае исчезновение флуоресцентного сигнала позволяет сделать вывод о процессах деградации, происходящих в клетке [55]. Так, например, в процессе клеточной гибели, если апоптотическая клетка содержит флуоресцентный белок, то при ее гибели происходит полное исчезновение сигнала флуоресценции, что также может быть использовано для моделирования и получения информации о динамике процесса [45].

Кроме того, следует отметить, что область исследования флуоресцентных белков постоянно развивается и непрерывно происходит создание новых подходов [48]. Помимо перечисленных выше методов количественного измерения поведения белков в пространстве и времени, в будущем методы нового поколения с использованием флуоресцентных белков будут,

безусловно, применены для генерации данных для математического моделирования.

Однако методы с использованием флуоресцентных белков, безусловно, имеют свои ограничения. Так, возможности использования флуоресцентных белков могут быть ограничены при необходимости исследовать поведение большого количества участников сигнального каскада в связи с тем, что спектр флуоресценции многочисленных флуорофоров может перекрываться. Далее, данная методология не позволяет получить такую информацию о биологическом процессе, как, например, расщепление белка на фрагменты или о других посттрансляционных модификациях белка, что, как упоминалось выше, является возможным при применении количественного иммуноблоттинга. Таким образом, идеальным является комбинация двух подходов для анализа биологической системы, сочетающая как анализ на уровне отдельных клеток, так и на уровне клеточных популяций. В связи с этим представляет специальный интерес проточная цитометрия нового поколения (технология компании Amnis), которая позволяет одновременно анализировать клетки как на уровне клеточных популяций, так и на уровне отдельных клеток с помощью сочетания конфокальной микроскопии и проточной цитометрии в одном приборе [59]. Данные, полученные с помощью такой технологии, будут активно использоваться в будущем для создания математических моделей.

Тем не менее следует отметить, что экспериментальные методы, применяемые для получения экспериментальных данных на уровне отдельных клеток, безусловно, дают более полное представление о динамике определенного биологического процесса. Например, как упоминалось выше, ключевым этапом запуска программируемой клеточной гибели – апоптоза – является активация каспаз. При измерении активности каспаз с помощью иммуноблоттинга обычно наблюдается постепенное увеличение расщепления каспаз в зависимости от времени, свидетельствующее об их активации. Таким образом, классическое описание апоптотической клеточной гибели включает в себя линейное увеличение активности каспаз с течением времени, что и было использовано при создании математических моделей клеточной гибели [60]. Однако при измерении активности каспаз с помощью описанных выше FRET-проб, неожиданно выяснилось, что на уровне отдельных клеток данный процесс выглядит совсем иначе [57]. А именно, было показано, что после активации апоптотического пути в течение определенного промежутка времени никакой актив-

ности каспаз не наблюдается. Затем происходит резкое увеличение каспазной активности и почти моментальный выход на плато, характеризующее максимальную активность каспаз в данной клетке. Для того чтобы понять механизм данного явления, были построены математические модели апоптотической клеточной гибели, которые позволили точно описать процессы на уровне отдельных клеток. Эти модели показали, что полная активация каспаз происходит только в момент выхода цитохрома *c* из митохондрий, которому должна предшествовать сборка ряда апоптотических комплексов и активация инициаторных каспаз [27,53,57]. Были сделаны точные предсказания о временных характеристиках этого явления и выявлены основные регуляторные механизмы активации каспаз. Таким образом, только комбинированный подход, включающий экспериментальный анализ и математическое моделирование, позволил выявить природу нелинейной активации каспаз и охарактеризовать ее механизм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему моменту созданы математические модели целого ряда сигнальных каскадов. Эти модели позволили получить новые знания о механизмах передачи сигнала и количественно охарактеризовать регуляцию некоторых сигнальных путей.

Вместе с тем, несмотря на достигнутые успехи, создание предикативных математических моделей сигналинга и их анализ остается сложной и крайне насущной проблемой. Это в первую очередь объясняется гетерогенностью организации сигнальных путей, которая проявляется на многих масштабах: во времени, пространстве, в количестве сигнальных молекул в клетке и характере их взаимодействий с другими молекулами пути. В силу этого, несмотря на большой прогресс в разработке экспериментальных методов, получение детальной пространственно-временной информации о концентрациях молекул в сигнальном пути и о константах их взаимодействия все еще затруднительно. Мы также не обладаем математическим аппаратом для моделирования таких сложных систем. Следующим этапом развития области будет создание моделей, интегрирующих данные о пространственной локализации компонент сигнального пути. Детальное моделирование сигнальных путей с учетом пространственной информации является актуальнейшей задачей, поскольку только в рамках такого подхода можно правильно описать динамическое поведение сигнального пути и объяснить механиз-

мы, обуславливающие его специфичность и особенности поведения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (вторая часть обзора, посвященная описанию экспериментальных методов для моделирования сигнальных путей – грант № 14-44-00011, остальные разделы – грант № 14-14-00302).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Bluthgen and H. Herzog, in *Proc. 2nd Workshop on Computation of Biochemical Pathways and Genetic Networks* (Logos-Verlag, Berlin, 2001), pp. 55–62.
2. S. L. Spencer and P. K. Sorger, *Cell*, **144**, 926 (2011).
3. A. H. Singh, D. M. Wolf, P. Wang, and A. P. Arkon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 7500 (2008).
4. D. Hyduke and B. O. Palsson, *Nature Rev. Genet.* **11**, 297 (2010).
5. B. N. Kholodenko, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 165 (2006).
6. J. Huard, S. Mueller, E. D. Gilles, et al., *FEBS J.* **279**, 3290 (2012).
7. J. Saez-Rodriguez, L. Simeoni, J. A. Lindquist, et al., *PLoS Comput. Biol.* **3** (8), e163 (2007).
8. S. A. Kauffman, *J. Theor. Biol.* **22**, 437 (1969).
9. S. A. Kauffman, *The Origins of Order – Self-Organization and Selection in Evolution* (Oxford University Press, 1993).
10. R. Thomas, *J. Theor. Biol.* **42** (3), 563 (1973).
11. R. Thomas and R. D'Ari, *Biological Feedback* (CRC Press, 1990).
12. R. Thomas, D. Thieffry, and M. Kaufman, *Bull. Math. Biol.* **57**, 247 (1995).
13. A. Mbodj, G. Junion, C. Brun, et al., *Mol. Biosyst.* **9** (9), 2248 (2013).
14. A. Faure, A. Naldi, F. Lopez, et al., *Mol. Biosyst.* **5** (12), 1787 (2009).
15. M. Chaves, R. Albert, and E. D. Sontag, *J. Theor. Biol.* **235**, 431 (2005).
16. A. Naldi, *Lect. Notes Comput. Sci.* **4695**, 233 (2007).
17. A. Garg, A. Di Cara, I. Xenarios, et al., *Bioinformatics* **24**, 1917 (2008).
18. E. Klipp, W. Liebermeister, C. Wierling, et al., *Systems Biology* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2009).
19. A. Kremling, *Systems Biology. Mathematical modeling and model analysis* (Chapman & Hall/CRC, 2014).
20. B. Goldstein, J. R. Faeder, and W. S. Hlavacek, *Nature Rev. Immunol.* **4**, 445 (2004).
21. A. Friedman and N. Perrimon, *Cell* **128**, 225 (2007).
22. A. L. Barabasi and Z. N. Oltvai, *Nature Rev. Genet.* **5**, 101 (2004).
23. N. M. Borisov, N. I. Markevich, J. B. Hoek, and B. N. Kholodenko, *Biophys. J.* **89**, 951 (2005).
24. C. J. Morton-Firth and D. J. Bray, *Theor. Biol.* **192**, 117 (1998).
25. M. L. Blinov, J. R. Faeder, B. Goldstein, and W. S. Hlavacek, *Bioinformatics* **20**, 3289 (2004).
26. L. Lok and R. Brent, *Nature Biotechnol.* **23**, 131 (2005).
27. M. Rehm, H. J. Huber, H. Dussmann, and J. H. Prehn, *EMBO J.* **25**, 4338 (2006).
28. M. M. Hill, C. Adrain, P. J. Duriez, et al., *EMBO J.* **23**, 2134 (2004).
29. M. Rehm and J. H. M. Prehn, *Methods* **61** (2), 165 (2013).
30. J. Schlessinger, *Science* **306**, 1506 (2004).
31. C. J. Marshall, *Cell* **80**, 179 (1995).
32. L. O. Murphy, S. Smith, R. H. Chen, et al., *Nature Cell Biol.* **4**, 556 (2002).
33. A. Goldbeter and D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6840 (1981).
34. C. Salazar and T. Hofer, *J. Mol. Biol.* **327** (1), 31 (2003).
35. N. I. Markevich, J. B. Hoek, and B. N. Kholodenko, *J. Cell. Biol.* **164**, 353 (2004).
36. J. E. Ferrell, Jr., *Trends Biochem. Sci.* **22**, 288 (1997).
37. W. Xiong and J. E. Ferrell, Jr., *Nature* **426**, 460 (2003).
38. A. Goldbeter, *Nature* **420**, 238 (2002).
39. J. Stelling, U. Sauer, Z. Szallasi, F. J. Doyle 3rd, and J. Doyle, *Cell* **118**, 675 (2004).
40. K. Simons and D. Toomre, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31 (2000).
41. A. Sorkin and M. von Zastrow, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 600 (2002).
42. T. G. Bivona, I. Perez De Castro, I. M. Ahearn, et al., *Nature* **424**, 694 (2003).
43. A. Harding, T. Tian, E. Westbury, et al., *Curr. Biol.* **15**, 869 (2005).
44. M. Rehm, H. Dussmann, R. U. Janicke, et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 24506 (2002).
45. N. Fricker, J. Beaudouin, P. Richter, et al., *J. Cell Biol.* **190**, 377 (2010).
46. I. N. Lavrik, *Cell Death. Dis.* **5**, e1259 (2014).
47. I. N. Lavrik, *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 551 (2010).
48. A. S. Mishin, V. V. Belousov, K. M. Solntsev, and K. A. Lukyanov, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **27**, 1 (2015).
49. J. Beaudouin, C. Liesche, S. Aschenbrenner, et al., *Cell Death. Differ.* **20**, 599 (2013).
50. A. M. Bogdanov, A. S. Mishin, I. V. Yampolsky, et al., *Nat. Chem. Biol.* **5**, 459 (2009).
51. L. Neumann, C. Pforr, J. Beaudouin, et al., *Mol. Syst. Biol.* **6**, 352 (2010).
52. R. E. Lee, S. R. Walker, K. Savery, et al., *Mol. Cell* **53**, 867 (2014).
53. J. G. Albeck, J. M. Burke, S. L. Spencer, et al., *PLoS Biol.* **6**, 2831 (2008).
54. H. Dussmann, D. Kogel, M. Rehm, and J. H. Prehn, *J. Biol. Chem.* **278**, 12645 (2003).
55. X. Xia, M. S. Owen, R. E. Lee, and S. Gaudet, *Cell Death. Dis.* **5**, e1261 (2014).
56. I. N. Lavrik, A. Golks, and P. H. Kramer, *J. Clin. Invest.* **115**, 2665 (2005).
57. S. L. Spencer, S. Gaudet, J. G. Albeck, et al., *Nature* **459**, 428 (2009).
58. J. G. Albeck, J. M. Burke, B. B. Aldridge, et al., *Mol. Cell* **30**, 11 (2008).
59. S. Pietkiewicz, J. S. Schmidt, and I. N. Lavrik, *J. Immunol. Meth.* **423**, 99 (2015).
60. M. Bentele, I. Lavrik, M. Ulrich, et al., *J. Cell Biol.* **166**, 839 (2004).

Systems Biology of Signalling Pathways

I.N. Lavrik* ** and M.G. Samsonova***

**Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany*

***Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentyeva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

****Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia*

Signalling networks play a central role in regulation of both single cell and the whole organism functioning. Recently the technologies for systems biology have been developed in a revolutionary way combining both experimental and mathematical methods. Using these technologies it became possible to model signalling pathways at the level of single cell and cell populations. This approach revealed new information on regulatory mechanisms of quite a few biological processes. In this review we discuss mathematical formalism applied to model signalling pathways and experimental methods used in this area.

Key words: signalling pathways, mathematical modeling, systems biology, apoptosis