

УДК: 57.032:573.22

Моделирование механизмов регуляции поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток: кинетический и стохастический подходы

**Акбердин И.Р.*¹, Иванисенко Н.В.¹, Казанцев Ф.В.¹,
Ощепкова Е.А.¹, Омельянчук Н.А.¹, Матушкин Ю.Г.^{1,2},
Афонников Д.А.^{1,2}**

¹*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, 630090, Россия*

²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090, Россия*

Аннотация. В работе представлены результаты анализа кинетической и стохастической моделей, описывающих динамику функционирования коровой генной сети поддержания плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток, с учетом последних экспериментальных данных о регуляции экспрессии Nanog. Анализ кинетической модели показал, что в динамике изменения концентрации как мРНК, так и белка Nanog потенциально может существовать осциллирующий режим функционирования, что может объяснять наблюдаемую в экспериментах гетерогенность экспрессии Nanog в популяции стволовых клеток. Стохастический подход, в свою очередь, позволил выявить диапазон параметров, при котором в результате стохастических флуктуаций существует два возможных состояния системы: с высоким и низким уровнями экспрессии Oct4, Sox2 и Nanog. При этом возможен спонтанный переход из одного состояния в другое, что также может являться одним из механизмов гетерогенности экспрессии Nanog.

Ключевые слова: плюрипотентное состояние, дифференцировка, экспрессия гена, гетерогенность Nanog, математическое моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

Как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), так и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК, которые по определению должны иметь возможно более полное сходство с ЭСК) могут неограниченно самообновляться и дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма [1]. Понимание регуляторных механизмов самообновления ЭСК, их дифференцировки и, в свою очередь, репрограммирования дифференцированных клеток в ИПСК является фундаментальной основой для создания методов эффективного и точного управления этими процессами. Последнее, несомненно, рассматривается как необходимое условие для применения ЭСК и ИПСК в медицине для изучения на клеточных моделях механизмов болезней и их лечения, для тестирования лекарств, а также в будущем – при выращивании из них клеток, тканей и органов для трансплантации.

Среди транскрипционных факторов, которые контролируют основные молекулярно-генетические механизмы поддержания плюрипотентности ЭСК,

* akberdin@bionet.nsc.ru

выделяют три ключевых, Oct, Sox2 и Nanog, составляющих так называемую «коровую генную сеть» плюрипотентности [2]. В популяции ЭСК наблюдается различной степени гетерогенность в экспрессии генов как плюрипотентности, так и дифференцировки [3, 4]. Гетерогенность связывают с разными причинами, например, с флуктуациями между плюрипотентными состояниями клетки, но в основе своей она может иметь особые свойства внутренней динамики экспрессии генов коровой сети плюрипотентности [5, 6]. Одним из эффективных подходов выявления молекулярных механизмов возникновения стабильности и нестабильности экспрессии генов, взаимно регулирующих друг друга, является метод математического моделирования [7].

Механизмы поддержания плюрипотентности и дифференцировки ЭСК, а также природа гетерогенности в экспрессии ключевых элементов «коровой сети» неоднократно исследовались с помощью этого метода [8–11].

Чикармане с соавторами создали ряд математических моделей, предназначенных для исследования молекулярно-генетических механизмов поддержания плюрипотентности и самообновления ЭСК [11–13]. Во всех моделях авторы использовали «коровую генную сеть» ЭСК, состоящую из трех транскрипционных факторов Oct4–Sox2–Nanog.

Анализ первой модели [12], разработанной на основе подхода Shea–Ackers [14], показал, что «коровая генная сеть» обладает бистабильным механизмом переключения между равновесными состояниями, который обусловлен положительными обратными связями и устойчив к варьированию параметров. Эта модель предполагает кооперативное связывание гетеродимера Oct4–Sox2 и фактора Nanog в промоторной области генов-мишеней. Более того, модель предсказала возможность необратимого бистабильного переключения при увеличении силы связывания Nanog белка с гетеродимером Oct4–Sox2 или при увеличении базальной скорости транскрипции гена Nanog. Другими словами, при этих условиях происходит переключение системы в активное состояние даже при отсутствии внешнего активирующего сигнала. С биологической точки зрения это означает, что ЭСК могут функционировать и поддерживать состояние плюрипотентности без внешних сигналов. Через два года после публикации данной модели это было показано экспериментально: было продемонстрировано, что мЭСК (мышинные ЭСК) обладают собственной программой самообновления, а внутренние стимулы индукции дифференцировки опосредуются через MEK/ERK и Gsk3 сигнальные пути [15]. Именно активность этих путей ингибируется условиями культивирования ЭСК.

В своей второй модели [13] авторы расширили «коровую генную сеть» для описания механизмов дифференцировки стволовых клеток в клетки трофоэктодермы и эндодермы. На основе предположений о том, что активация экспрессии Gata6 определяется транскрипционным фактором Oct4, а репрессия экспрессии Nanog – гетеродимерным комплексом Oct4–Gata6, удалось воспроизвести бистабильное поведение системы, как в предыдущей модели, а также описать механизмы детерминации направленной клеточной дифференцировки. Математическая модель позволила предсказать возможные механизмы репрограммирования дифференцированных клеток в стволовые: активацией экспрессии Nanog или подавлением экспрессии Gata6, который является ключевым фактором дифференцировки в примитивную эндодерму. Анализ предложенной модели показал, что активация экспрессии Nanog – это более предпочтительный и надежный способ репрограммирования дифференцированных клеток, чем подавление экспрессии Gata6. В настоящее время, активация Nanog использована во многих протоколах по созданию индуцированных плюрипотентных клеток (иПСК) [16]. Более того, было показано, что Zfp281 – репрессор транскрипции, который подавляет процесс активации экспрессии Nanog, – также препятствует репрограммированию соматических клеток [17].

В третьей работе этой группы [11] была исследована динамика функционирования модели «коровой геной сети» в условиях культивирования клеток на двух средах, LIF/BMP4 или 2i/3i, с учетом взаимодействий транскрипционных факторов с обобщенным геном дифференцировки G (в роли которого могут выступать *Gata6*, *Sox17*, например) и с сигнальным путем FGF4/GSK. Анализ модели показал, что стохастический переход между двумя динамическими состояниями (состояние плюрипотентности и дифференцированное состояние) может происходить за счет собственных экспрессионных шумов у компонентов исследуемой сети (в частности, в экспрессии *Nanog*). Предложенная модель объясняет механизм экспериментально наблюдаемой спонтанной дифференцировки ЭСК при культивировании на LIF/BMP4 среде и отсутствие этого эффекта при культивировании на 2i/3i среде.

Также недавно было разработано несколько математических моделей, описывающих механизм возникновения гетерогенности экспрессии *Nanog* в популяции культивируемых клеток. В работе [8] было показано, что гетерогенность экспрессии *Nanog* является решающим фактором для ЭСК при определении их динамического состояния: оставаться ли в плюрипотентном состоянии или дифференцироваться. Расчет стохастической модели позволил воспроизвести экспериментальные данные по гетерогенности *Nanog* в мЭСК при учете предположения о негативной регуляции транскрипционным фактором *Oct4* экспрессии *Nanog* и высоких концентрациях *Oct4*. Аналогичный подход был использован в работе [9], где авторами был предложен дополнительный фактор X , который негативно регулировал экспрессию *Nanog* по механизму обратной отрицательной связи. Расчеты математических моделей в двух работах [10, 18] предполагают, что стохастичность в экспрессии *Nanog* оказывает значительное влияние на возникновение феномена гетерогенности, а стохастика в процессе клеточного деления оказывает более слабое воздействие. Было показано, что гетерогенность экспрессии возникает, в основном, за счет стохастических процессов в клетке, и добавление 2i/3i среды для культивирования ЭСК уменьшает флуктуации в экспрессии *Nanog*. Эти модели также предсказывают, что репрограммирование дифференцированных клеток в ЭСК происходит в основном за счет увеличения экспрессии *Oct4*.

Тем не менее, существующие модели, описывающие механизмы регуляции «коровой геной сети» и формирования неоднородности экспрессии *Nanog* в популяции ЭСК, имеют ряд недостатков: содержат биологически не интерпретируемые параметры, не включают явных молекулярных механизмов регуляции экспрессии *Nanog* (в случае моделирования гетерогенности *Nanog*) и не учитывают последних экспериментальных данных, например, таких, как авторепрессия *Nanog* в мЭСК [19].

Изучение молекулярных механизмов возникновения гетерогенности в уровне экспрессии *Nanog* в стволовых клетках имеет важное прикладное значение. Установлено, что ЭСК с низким уровнем экспрессии *Nanog* более склонны к дифференцировке, чем ЭСК с высоким уровнем *Nanog* [20, 21]. Однако состояние с низким уровнем *Nanog* является обратимым, около 35% этих клеток, отселектированных и выращиваемых отдельно, становятся клетками, высоко экспрессирующими *Nanog* уже на 4-й день после отделения. Снижение экспрессии *Nanog* является самым ранним событием при переходе клеток к дифференцировке и делает ЭСК чувствительными к сигналам дифференцировки [22]. Таким образом, молекулярно-генетические процессы регуляции уровня *Nanog* в ЭСК контролируют баланс между процессами самовоспроизведения и дифференцировки ЭСК. Поэтому детальный количественный анализ активности «коровых» генов в этих процессах и выявление их роли в динамике состояний ЭСК необходимы не только для разработки технологий контроля и регуляции этих состояний, но и для развития и оптимизации подходов к репрограммированию дифференцированных клеток.

Целью данной работы является выявление молекулярных механизмов формирования неоднородности экспрессии Nanog в популяции ЭСК на основе анализа кинетической и стохастической моделей, описывающих функционирование «коровой геной сети» поддержания плюрипотентности и дифференцировки с учетом последних экспериментальных данных о регуляции экспрессии Nanog.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кинетическая модель

Структура кинетической модели, описывающей динамику функционирования «коровой геной сети» регуляции поддержания плюрипотентности и дифференцировки ЭСК, включает три транскрипционных фактора, Oct4 (POU5F1), Sox2, Nanog, и гетеродимерный комплекс Oct4–Sox2. Структура модели была взята из работы Чикармане с соавторами [12] и дополнена новыми данными об авторепрессии Nanog [19]. Также нами были учтены процессы транскрипции и трансляции для «коровых» транскрипционных факторов в мЭСК (рис. 1).

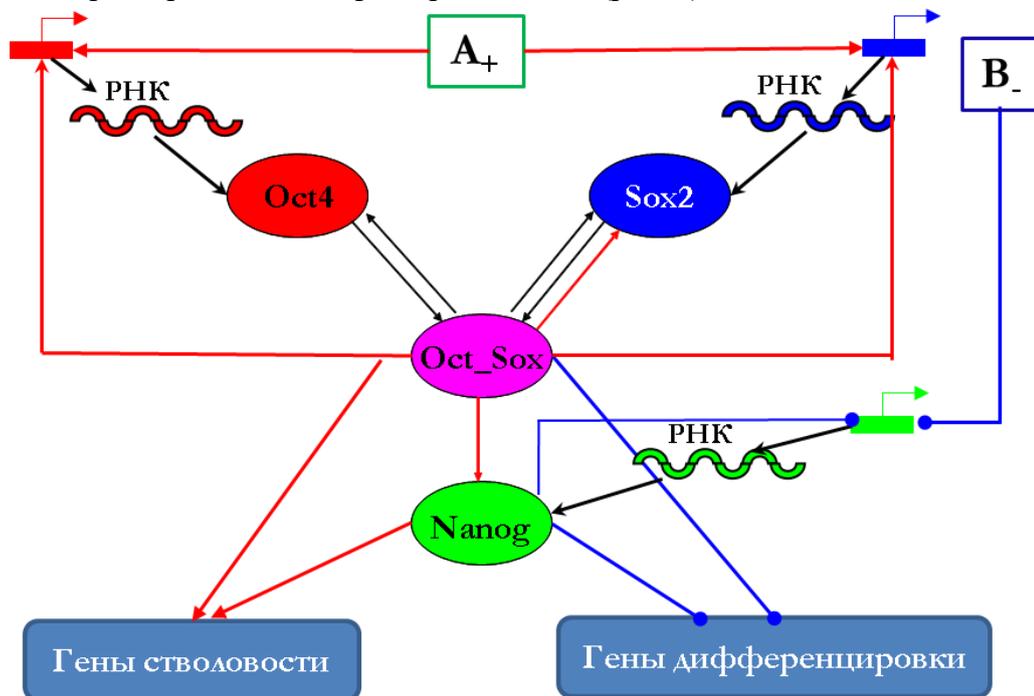


Рис. 1. «Коровая геной сеть» регуляции поддержания плюрипотентности и дифференцировки мЭСК. Прямоугольниками со стрелками обозначены гены соответствующих транскрипционных факторов; стрелки черного цвета соответствуют процессам синтеза (РНК, белка) или ассоциации/диссоциации гетеродимерного комплекса из соответствующих субъединиц; стрелки красного цвета обозначают процессы активации; синего – репрессию. Сигналы A_+ (активирующий самообновление и плюрипотентность) и B_- (ингибирующий дифференцировку) аналогичны сигналам в статье [12].

Модель содержит 12 переменных и 27 параметров. Константы деградации белков и их мРНК были взяты из литературных данных [22–24]. Значения остальных параметров были подобраны при адаптации модели к экспериментальным данным на основе качественного анализа переходов из состояния плюрипотентности в дифференцированное и обратно. Численные эксперименты проводились на высокопроизводительном вычислительном кластере НКС-30Т Сибирского суперкомпьютерного центра СО РАН. Для этих целей в пакете MATLAB были реализованы метод продолжения по параметру и метод численного исследования с варьированием параметров кинетической модели. Интегрированная кинетическая

модель разработана на основе обобщенного химико-кинетического подхода с использованием функций Хилла [25], который позволяет описывать молекулярно-генетические процессы, связывающие компоненты генной сети, системой дифференциальных уравнений. Система дифференциальных уравнений и значения параметров кинетической модели в формате компьютерной среды MATLAB доступны по адресу http://biomodelsgroup.ru/images/files/Kinetic_model_src.zip (краткое описание модели приведено в Приложении).

Главным преимуществом предложенного подхода является возможность биологической интерпретации параметров модели после ее адаптации к экспериментальным данным. Так как факторы, рассматриваемые в нашей модели, могут иметь стохастические флуктуации концентраций, выражаемые в гетерогенности их экспрессии (что наиболее изучено у Nanog), то необходимой становится также разработка стохастического варианта модели.

Стохастическая модель

Стохастический подход к моделированию оказывается удобным для моделирования биохимических процессов в индивидуальных клетках и для моделирования изменений концентраций белков в популяциях клеток [26, 27]. Стохастическое моделирование позволяет также корректно учесть случаи, когда концентрации реагентов составляют десятки и менее молекул на клетку. В данной работе мы применили реализацию Next Step алгоритма Гиллеспи для стохастического моделирования (уравнения и значения параметров стохастической модели доступны в международном формате SBML и формате программного пакета Snoopy по адресу http://biomodelsgroup.ru/images/files/Stochastic_model_src.zip, а также краткое описание модели приведено в Приложении), реализованного в программном пакете Snoopy [28]. Вариант Next Step специально разработан для моделирования связанных химических реакций [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После детального анализа опубликованных моделей контроля плюрипотентности в мЭСК и современных экспериментальных данных по этой тематике «коровая генная сеть» плюрипотентности и дифференцировки мЭСК [12] была модифицирована нами так, что вместо автоактивации Nanog происходит его авторепрессия [19], а не подтвержденные экспериментально обратные положительные связи активации экспрессии Oct4 и Sox2 транскрипционным фактором Nanog (как в статье [12]) были исключены. Кинетический подход позволил нам реконструировать модель, в которой ряд ключевых параметров имеет, в отличие от предложенных ранее моделей [12], вполне определенную биологическую интерпретацию: константа эффективности связывания фактора с промотором гена, пороги активации и ингибирования, скорость конститутивного синтеза мРНК генов «коровой сети», константы деградации мРНК и белка. Более того, для дальнейшего анализа кинетической модели оценки величин указанных параметров были взяты из экспериментальных данных [22–24]. Анализ кинетической модели показал, что в предложенной нами модификации «коровой генной сети» в процессе динамического изменения концентрации как мРНК, так и белка Nanog может возникать осциллирующий режим функционирования (рис. 2).

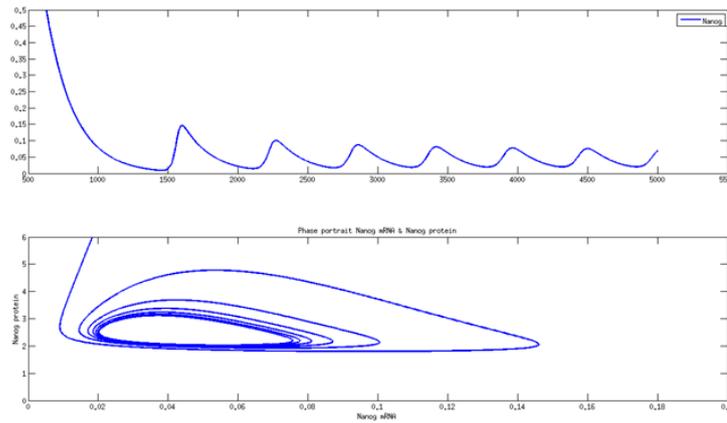


Рис. 2. Динамика изменения концентрации мРНК и белка Nanog . На рисунке сверху указано изменение концентрации белка Nanog в мЭСК. По оси X – время (мин), по оси Y – концентрация (мМ). На рисунке снизу приведен фазовый портрет: по оси X – концентрация мРНК Nanog, по оси Y – концентрация белка NANOG. Наличие замкнутого кольца в фазовом портрете соответствует незатухающим колебаниям концентраций мРНК и белка.

Выявленный феномен является одним из объяснений наблюдаемой гетерогенности экспрессии Nanog в популяции мЭСК, поскольку в один и тот же момент времени в различных ЭСК в культуре может наблюдаться различная концентрация этого фактора. Мы также воспроизвели наблюдаемую ранее в модели Чикармане с соавторами [12] бистабильность при варьировании параметра B_- (рис. 3).

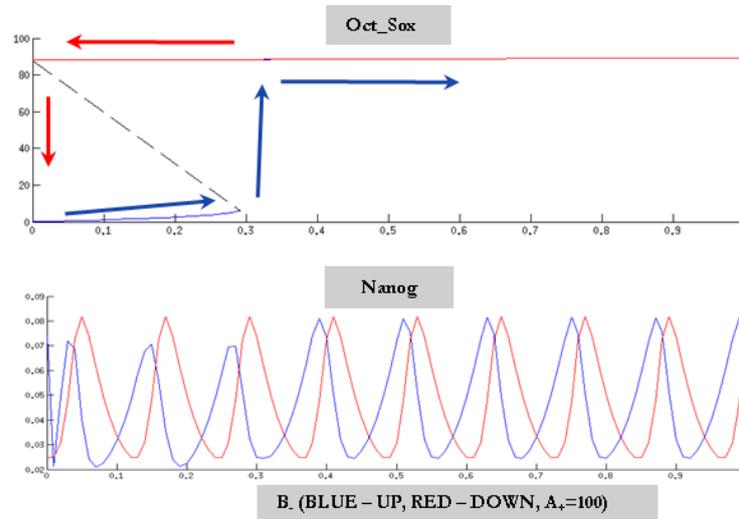


Рис. 3. Поведение стационарного решения концентраций комплекса Oct4–Sox2 и фактора Nanog в зависимости от значения сигнала B_- . По оси X – значение сигнала B_- ; по оси Y – стационарное значение концентрации соответствующего белка при определенном значении сигнала B_- (мМ). Пунктирная линия на верхнем рисунке указывает на область нестабильности стационарного решения. Синие и красные стрелки на верхнем рисунке указывают на гистерезис или на направление изменения параметра B_- : увеличение или уменьшение, соответственно, в зависимости от начальных условий (при этом значении сигнала $A_+=100$ у.е.). Стартовые точки: 1) нулевые значения концентраций комплекса Oct4–Sox2 и фактора Nanog или состояние дифференцировки; 2) состояние плюрипотентности – высокие значения концентрации комплекса Oct4–Sox2 и фактора Nanog).

Стоит отметить, что отсутствие обратных положительных связей между факторами Nanog и Oct4, Nanog и Sox2 не позволило нам получить бистабильного поведения систем при варьировании параметра A_+ . Для воспроизведения этого качественного

феномена требуется расширение новой «жоровой геной сети»: учет других участников в сети регуляции механизмов поддержания плюрипотентности и дифференцировки мЭСК. Одним из возможных участников, наличие которого в модели приведет к возникновению обратных положительных связей между Nanog и Oct4, является фактор Gata6 [11]. Рассмотрение этих дополнительных связей в последней работе Чикармане с соавторами позволило им воспроизвести экспериментальные результаты по эффективности индукции дедифференцировки соматических клеток в ЭСК [30]. С другой стороны, учет дополнительных обратных отрицательных связей в регуляции экспрессии Nanog позволит выявить новые механизмы возникновения гетерогенности. Так, экспрессия Nanog активируется также за счет кооперативного связывания факторов Stat3 и Bry [31]. Экспрессия Bry, в свою очередь, активируется комплексом транскрипционных факторов Smad1 и p300. Но конкурентное связывание Nanog с тем же фактором Smad1 приводит к понижению уровня экспрессии Bry. Таким образом, формируется дополнительная обратная отрицательная связь в регуляции экспрессии Nanog – еще один потенциальный механизм возникновения гетерогенности Nanog в культуре клеток.

Дополнительно, с использованием стохастического моделирования был показан диапазон параметров, при котором существует два возможных состояния системы – с высоким уровнем экспрессии Oct4, Sox2 и Nanog и их низким уровнем экспрессии, соответственно. В результате стохастических флуктуаций в уровне экспрессии Oct4 и Sox2 возможно случайное переключение из одного состояния в другое (рис. 4), что может являться одним из механизмов гетерогенности Nanog.

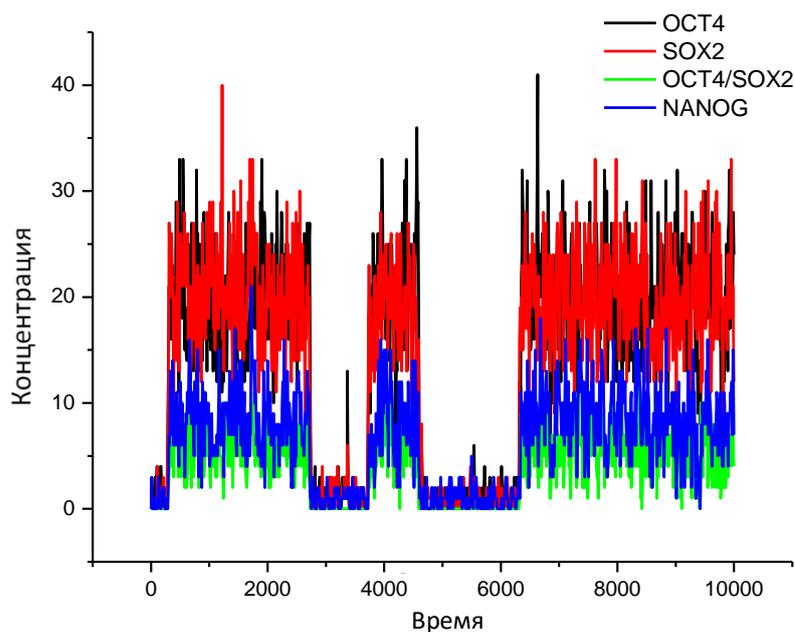


Рис. 4. Динамика поведения концентрации белков OCT4, SOX2, NANOG. Траектория рассчитана для параметров стохастической модели, при которых система может стохастически переключаться между состояниями с повышенной и пониженной экспрессией генов.

Проведенный анализ позволяет понять возможные механизмы возникновения гетерогенности Nanog на клеточном уровне. В дальнейшем мы планируем расширить существующую геновую сеть за счет включения других ключевых факторов, ответственных за поддержание плюрипотентности, самообновление мЭСК и, вероятно, участвующих в регуляции гетерогенности Nanog.

Выявление молекулярно-генетических механизмов регуляции поддержания плюрипотентности и дифференцировки стволовых клеток, верификация экспериментально измеренных параметров, а также разработка соответствующих кинетической и стохастической моделей выполнены в рамках проекта *Skolkovo Center for Stem Cell Research* (Договор с ИОГен РАН №8418-43/2013). Реализация метода продолжения по параметру в пакете MATLAB для анализа кинетической модели на кластере НКС-30Т Сибирского суперкомпьютерного центра СО РАН (<http://bioinformatics.bionet.nsc.ru/>) выполнена Казанцевым Ф.В. в рамках проекта РФФ № 14-24-00123.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Кинетическая модель

Кинетическая модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений (1), каждое из которых описывает динамику изменения концентрации либо мРНК транскрипционного фактора «коровой генной сети» ($[i]_R$, где i здесь и далее – название соответствующего фактора), либо соответствующего белка. Поскольку процессы регуляции транскрипции, синтеза и созревания активной формы транскрипционного фактора пространственно разнесены в клетке, мы ввели два типа белковых молекул для каждого из факторов: в цитоплазме ($[i]_{pc}$) и в ядре ($[i]_{pr_n}$); только для формируемого непосредственно в ядре гетеродимерного комплекса *OctSox* представлен один тип белковой молекулы – $[OctSox]_{pr_n}$. Согласно методу обобщенных функций Хилла [25] параметры кинетической модели (1) имеют следующие значения:

V_{i_R} – константа скорости транскрипции i -го фактора коровой сети;

$V_{i_{pc}}$ – константа скорости трансляции i -го фактора коровой сети;

$V_{OctSox_{for}}$ – константа ассоциации гетеродимерного комплекса из двух транскрипционных факторов: Oct4 и Sox2;

$V_{OctSox_{rev}}$ – константа диссоциации гетеродимерного комплекса *OctSox*;

d_{i_0} – уровень базальной транскрипции i -го фактора коровой сети;

d_{i_j} – константа максимального уровня транскрипции гена j при соответствующем регуляторном воздействии фактора i ;

k_{i_j} – константы эффективности влияния регулятора i на уровень транскрипции гена j коровой сети;

h_{i_j} – константа, характеризующая степень нелинейности влияния регулятора i на уровень транскрипции гена j ;

w_3 – константа эффективности совместного влияния $OctSox_{pr_n}$ и $Nanog_{pr_n}$ на уровень транскрипции $Nanog_R$;

$k_{i_{deg_r}}$ – константа деградации/диссипации соответствующей мРНК или одного из типов белковой молекулы (ядерная или цитоплазматическая) для i -го фактора коровой сети;

$k_{i_{pc_n_trans}}$ – константа транспорта фактора i из цитоплазмы в ядро;

A и B – уровни сигналов «A₊» (активирующий самообновление и плюрипотентность) и «B₋» (ингибирующий дифференцировку) аналогичны данным в статье [12], соответственно.

$$\begin{cases}
 \frac{d[Oct]_R}{dt} = V_{Oct_R} \frac{d_{Oct_0} + d_{A_{Oct}} A + d_{OctSoxOct} \left(\frac{[OctSox]_{pr_n}}{k_{OctSoxOct}} \right)^{h_{OctSoxOct}}}{1 + d_{A_{Oct1}} A + d_{OctSoxOct1} \left(\frac{[OctSox]_{pr_n}}{k_{OctSoxOct}} \right)^{h_{OctSoxOct}}} - k_{Oct_Rdeg} [Oct]_R \\
 \frac{d[Sox]_R}{dt} = V_{Sox_R} \frac{d_{Sox_0} + d_{A_{Sox}} A + d_{OctSoxSox} \left(\frac{[OctSox]_{pr_n}}{k_{OctSoxSox}} \right)^{h_{OctSoxSox}}}{1 + d_{A_{Sox1}} A + d_{OctSoxSox1} \left(\frac{[OctSox]_{pr_n}}{k_{OctSoxSox}} \right)^{h_{OctSoxSox}}} - k_{Sox_Rdeg} [Sox]_R \\
 \frac{d[Nanog]_R}{dt} = V_{Nanog_R} \frac{d_{Nanog_0} + d_{OctSoxNanog} \left(\frac{[OctSox]_{pr_n}}{k_{OctSoxNanog}} \right)^{h_{OctSoxNanog}}}{1 + d_{B_{Nanog}} B + d_{OctSoxNanog1} \left(\frac{[OctSox]_{pr_n}}{k_{OctSoxNanog}} \right)^{h_{OctSoxNanog}} + d_{NanogNanog} \left(\frac{[Nanog]_{pr_n}}{k_{NanogNanog}} \right)^{h_{NanogNanog}} + w_3 \left(\frac{[OctSox]_{pr_n}}{k_{OctSoxNanog}} \right)^{h_{OctSoxNanog}} \left(\frac{[Nanog]_{pr_n}}{k_{NanogNanog}} \right)^{h_{NanogNanog}}} - k_{Nanog_Rdeg} [Nanog]_R \\
 \frac{d[Oct]_{pr_c}}{dt} = V_{Oct_{pr_c}} [Oct]_R - k_{Oct_{pr_c_n_trans}} [Oct]_{pr_c} - k_{Oct_{pr_c}deg} [Oct]_{pr_c} \\
 \frac{d[Oct]_{pr_n}}{dt} = V_{OctSox_{rev}} [OctSox]_{pr_n} + k_{Oct_{pr_c_n_trans}} [Oct]_{pr_c} - V_{OctSox_{for}} [Oct]_{pr_n} [Sox]_{pr_n} - k_{Oct_{pr_n}deg} [Oct]_{pr_n} \\
 \frac{d[Sox]_{pr_c}}{dt} = V_{Sox_{pr_c}} [Sox]_R - k_{Sox_{pr_c_n_trans}} [Sox]_{pr_c} - k_{Sox_{pr_c}deg} [Sox]_{pr_c} \\
 \frac{d[Sox]_{pr_n}}{dt} = V_{OctSox_{rev}} [OctSox]_{pr_n} + k_{Sox_{pr_c_n_trans}} [Sox]_{pr_c} - V_{OctSox_{for}} [Oct]_{pr_n} [Sox]_{pr_n} - k_{Sox_{pr_n}deg} [Sox]_{pr_n} \\
 \frac{d[Nanog]_{pr_c}}{dt} = V_{Nanog_{pr_c}} [Nanog]_R - k_{Nanog_{pr_c_n_trans}} [Nanog]_{pr_c} - k_{Nanog_{pr_c}deg} [Nanog]_{pr_c} \\
 \frac{d[Nanog]_{pr_n}}{dt} = k_{Nanog_{pr_c_n_trans}} [Nanog]_{pr_c} - k_{Nanog_{pr_n}deg} [Nanog]_{pr_n} \\
 \frac{d[OctSox]_{pr_n}}{dt} = V_{OctSox_{for}} [Oct]_{pr_n} [Sox]_{pr_n} - V_{OctSox_{rev}} [OctSox]_{pr_n} - k_{OctSox_{deg}} [OctSox]_{pr_n} \\
 \frac{d[Stem]_R}{dt} = \frac{d_{Stem_0} + d_{OctSoxStem} [OctSox]_{pr_n} + d_{OctSox_NanogStem} [OctSox]_{pr_n} [Nanog]_{pr_n}}{1 + d_{OctSoxStem1} [OctSox]_{pr_n} + d_{OctSox_NanogStem1} [OctSox]_{pr_n} [Nanog]_{pr_n}} - k_{Stem_{deg}} [Stem]_R \\
 \frac{d[Diff]_R}{dt} = \frac{d_{Diff_0}}{1 + d_{OctSox_{diff}} [OctSox]_{pr_n} + d_{OctSox_Nanog_{diff}} [OctSox]_{pr_n} [Nanog]_{pr_n}} - k_{Diff_{deg}} [Diff]_R
 \end{cases} \tag{1}$$

Таблица 1. Численные значения параметров модели (1). Параметры A и B варьировались в указанных диапазонах

Параметр модели	Значение	Параметр модели	Значение	Параметр модели	Значение	Параметр модели	Значение	Параметр модели	Значение
V_{OctR}	1	$d_{A_{Sox1}}$	1.1×10^{-3}	$h_{OctSox_{Nanog}}$	2	$k_{Sox_{prc_n_trans}}$	9.3×10^{-3}	$d_{OctSox_Nanog_{Stem}}$	10^{-2}
d_{Oct0}	10^{-4}	$d_{OctSox_{Sox}}$	10^{-2}	$d_{Nanog_{Nanog}}$	1	$k_{Sox_{prc_{degr}}}$	10^{-5}	$k_{Stem_{degr}}$	5×10^{-2}
$d_{A_{Oct}}$	1	$d_{OctSox_{Sox1}}$	10^{-3}	$k_{Nanog_{Nanog}}$	1	$k_{Sox_{prn_{degr}}}$	8.1×10^{-3}	d_{Diff0}	1
$d_{A_{Oct1}}$	1.1×10^{-3}	$k_{OctSox_{Sox}}$	1	$h_{Nanog_{Nanog}}$	10	$V_{Nanog_{prc}}$	5×10^{-1}	$d_{OctSox_{Diff}}$	10^{-3}
A	[0;100]	$h_{OctSox_{Sox}}$	2	w_3	9.95×10^{-4}	$k_{Nanog_{prc_n_trans}}$	9.3×10^{-3}	$d_{OctSox_Nanog_{Diff}}$	10^{-2}
$d_{OctSox_{Oct}}$	10^{-2}	$k_{Sox_{R_{degr}}}$	10^{-1}	$k_{Nanog_{R_{degr}}}$	5×10^{-3}	$k_{Nanog_{prc_{degr}}}$	10^{-5}	$k_{Diff_{degr}}$	10^{-2}
$d_{OctSox_{Oct1}}$	10^{-3}	V_{Nanog_R}	1	$V_{Oct_{prc}}$	5×10^{-1}	$k_{Nanog_{prn_{degr}}}$	8.1×10^{-3}	$d_{A_{Sox}}$	
$k_{OctSox_{Oct}}$	1	d_{Nanog_0}	1	$k_{Oct_{prc_n_trans}}$	9.3×10^{-3}	$k_{OctSox_{degr}}$	5×10^{-1}	$k_{OctSox_{Nanog}}$	
$h_{OctSox_{Oct}}$	2	$d_{B_{Nanog}}$	10^{-2}	$k_{Oct_{prc_{degr}}}$	10^{-5}	d_{Stem_0}	10^{-4}	$V_{Sox_{prc}}$	5×10^{-1}
$k_{Oct_{R_{degr}}}$	10^{-1}	B	[0;1]	$V_{OctSox_{for}}$	5×10^{-2}	$d_{OctSox_{Stem}}$	10^{-1}		
V_{Sox_R}	1	$d_{OctSox_{Nanog}}$	5×10^{-3}	$V_{OctSox_{rev}}$	10^{-3}	$d_{OctSox_{Stem1}}$	10^{-3}		
d_{Sox_0}	10^{-4}	$d_{OctSox_{Nanog1}}$	10^{-3}	$k_{Oct_{prn_{degr}}}$	8.1×10^{-3}	$d_{OctSox_Nanog_{Stem}}$	10^{-1}		

Стохастическая модель

Скорости реакций из уравнений системы (1) использовались для формулировки основного уравнения стохастической модели. При этом в стохастической модели процессы транскрипции, синтеза и созревания активной формы транскрипционного фактора не рассматриваются. В отличие от кинетической модели, в рамках стохастической модели биохимические процессы моделируются в индивидуальной клетке, что позволяет корректно учесть случаи, когда количество реагентов составляет десятки и менее молекул в определенной клетке. Стохастическая модель описывает процессы регуляции экспрессии Nanog, Oct4 и Sox2, процесс образования и диссоциации гетеродимерного комплекса Oct4Sox2, а также процессы диссипации трех ключевых факторов поддержания плюрипотентности и дифференцировки ЭСК.

Основное уравнение рассчитывали с использованием алгоритма Гиллеспи, реализованного в программном пакете Snoopy [28]. Параметры стохастической модели представлены в таблице 2. В третьем столбце отражено изменение количества молекул соответствующего реагента (Nanog, Oct4 или Sox2) на клетку при стохастическом переходе.

Таблица 2. Функции переходов, используемые в стохастической модели

Скорость реакций стохастического перехода	Значения	Результат стохастической реакции
$V_{Nanog} \frac{d_{Nanog_0} + d_{OctSox_{Nanog}} \left(\frac{[OctSox]}{k_{OctSox_{Nanog}}} \right)^{h_{OctSox_{Nanog}}}}{1 + d_{B_{Nanog}} B + d_{OctSox_{Nanog1}} \left(\frac{[OctSox]}{k_{OctSox_{Nanog}}} \right)^{h_{OctSox_{Nanog}}} + d_{Nanog_{Nanog}} \left(\frac{[Nanog]}{k_{Nanog_{Nanog}}} \right)^{h_{Nanog_{Nanog}}} + w_3 \left(\frac{[OctSox]}{k_{OctSox_{Nanog}}} \right)^{h_{OctSox_{Nanog}}} \left(\frac{[Nanog]}{k_{Nanog_{Nanog}}} \right)^{h_{Nanog_{Nanog}}}}$	$\frac{0.1 + 0.05[OctSox]^2}{1 + 0.05[OctSox]^2 + 0.01[Nanog]^2}$	$Nanog \rightarrow Nanog + 1$
$k_{Nanog_{deg_r}} [Nanog]$	$0.1[Nanog]$	$Nanog \rightarrow Nanog - 1$
$V_{Oct} \frac{d_{Oct_0} + d_{A_{Oct}} A + d_{OctSox_{Oct}} \left(\frac{[OctSox]}{k_{OctSox_{Oct}}} \right)^{h_{OctSox_{Oct}}}}{1 + d_{A_{Oct1}} A + d_{OctSox_{Oct1}} \left(\frac{[OctSox]}{k_{OctSox_{Oct}}} \right)^{h_{OctSox_{Oct}}}}$	$\frac{0.1 + 17[OctSox]^2}{1 + 6.7[OctSox]^2}$	$Oct4 \rightarrow Oct4 + 1$
$k_{Oct_{deg_r}} Oct4$	$0.1[Oct]$	$Oct4 \rightarrow Oct4 - 1$
$V_{Sox} \frac{d_{Sox_0} + d_{A_{Sox}} A + d_{OctSox_{Sox}} \left(\frac{[OctSox]}{k_{OctSox_{Sox}}} \right)^{h_{OctSox_{Sox}}}}{1 + d_{A_{Sox1}} A + d_{OctSox_{Sox1}} \left(\frac{[OctSox]}{k_{OctSox_{Sox}}} \right)^{h_{OctSox_{Sox}}}}$	$\frac{0.1 + 17[OctSox]^2}{1 + 6.7[OctSox]^2}$	$Sox2 \rightarrow Sox2 + 1$
$k_{Sox_{deg_r}} [Sox]$	$0.1[Sox]$	$Sox2 \rightarrow Sox2 - 1$
$V_{OctSox_{for}} [Oct][Sox]$	$0.002[Sox][Oct]$	$Oct4/Sox2 \rightarrow Oct4/Sox2 + 1$ $Oct4 \rightarrow Oct4 - 1, Sox2 \rightarrow Sox2 - 1$
$V_{OctSox_{rev}} [OctSox]$	$0.05[OctSox]$	$Oct4/Sox2 \rightarrow Oct4/Sox2 - 1$ $Oct4 \rightarrow Oct4 + 1, Sox2 \rightarrow Sox2 + 1$
$k_{OctSox_{deg_r}} [OctSox]$	$0.1[OctSox]$	$Oct4/Sox2 \rightarrow Oct4/Sox2 - 1$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медведев С.П., Шевченко А.И., Сухих Г.Т., Закиян С.М. *Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки*. Под ред. Власова В.В. Новосибирск: Изд-во СО РАН., 2014. 368 с.
2. Jaenisch R., Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008. V. 132. № 4. P. 567–582.
3. Graf T., Stadtfeld M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. № 5. P. 480–483.
4. MacArthur B.D., Lemischka I.R. Statistical mechanics of pluripotency. *Cell*. 2013. V. 154. № 3. P. 484–489.
5. Hayashi K., Lopes S.M., Tang F., Surani M.A. Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell*. 2008. V. 3. № 4. P. 391–401.
6. Torres-Padilla M.E., Chambers I. Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. *Development*. 2014. V. 141. № 11. P. 2173–2181.
7. Акбердин И.Р., Казанцев Ф.В., Ермак Т.В., Тимонов В.С., Хлебодарова Т.М., Лихошвай В.А. «Электронная клетка»: проблемы и перспективы. *Математическая биология и биоинформатика*. 2013. Т. 8. № 1. С. 295–315.
8. Kalmar T., Lim C., Hayward P., Muñoz-Descalzo S., Nichols J., Garcia-Ojalvo J., Martinez Arias A. Regulated fluctuations in Nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells. *PLoS Biol*. 2009. V. 7. № 7. Article No. e1000149.
9. Glauche I., Herberg M., Roeder I. Nanog variability and pluripotency regulation of embryonic stem cells-insights from a mathematical model analysis. *PLoS One*. 2010. V. 5. № 6. Article No. e11238.
10. Wu J., Tzanakakis E.S. Distinct allelic patterns of Nanog expression impart embryonic stem cell population heterogeneity. *PLoS Comp. Biol*. 2013. V. 9. № 7. Article No. e1003140.
11. Chickarmane V., Olariu V., Peterson C. Probing the role of stochasticity in a model of the embryonic stem cell-heterogeneous gene expression and reprogramming efficiency. *BMC Syst. Biol*. 2012. V. 6. № 1. P. 98.
12. Chickarmane V., Troein C., Nuber U.A., Sauro H.M., Peterson C. Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch. *PLoS Comp. Biol*. 2006. V. 2. № 9. Article No. e123.
13. Chickarmane V., Peterson C. A computational model for understanding stem cell, trophectoderm and endoderm lineage determination. *PLoS One*. 2008. V. 3. № 10. Article No. e3478.
14. Buchler N.E., Gerland U., Hwa T. On schemes of combinatorial transcription logic. *PNAS*. 2003. V. 100. № 9. P. 5136–5141.
15. Ying Q.L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008. V. 453. № 7194. P. 519–523.
16. Adachi K., Schöler H.R. Directing reprogramming to pluripotency by transcription factors. *Curr. Opin. Gen. & Dev*. 2012. V. 22. № 5. P. 416–422.
17. Fidalgo M., Faiola F., Pereira C.F., Ding J., Saunders A., Gingold J., Schaniel C., Lemischka I.R., Silva J.C., Wang J. Zfp281 mediates Nanog autorepression through recruitment of the NuRD complex and inhibits somatic cell reprogramming. *PNAS*. 2012. V. 109. № 40. P. 16202–16207.
18. Wu J., Tzanakakis E.S. Contribution of stochastic partitioning at human embryonic stem cell division to NANOG heterogeneity. *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. Article No. e50715.

19. Navarro P., Festuccia N., Colby D., Gagliardi A., Mullin N.P., Zhang W., Karwacki-Neisius V., Osorno R., Kelly D., Robertson M., Chambers I. OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *The EMBO J.* 2012. V. 31. № 24. P. 4547–4562.
20. Singh A.M., Hamazaki T., Hankowski K.E., Terada N. A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 10. P. 2534–2542.
21. Karwacki-Neisius V., Göke J., Osorno R., Halbritter F., Ng J.H., Weiße A.Y., Wong F.C.K., Gagliardi A., Mullin N.P., Festuccia N., Colby D., Tomlinson S.R., Ng H.H., Chambers I. Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog. *Cell Stem Cell.* 2013. V. 12. № 5. P. 531–545.
22. Thomson M., Liu S.J., Zou L.N., Smith Z., Meissner A., Ramanathan S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell.* 2011. V. 145. № 6. P. 875–889.
23. Abranches E., Bekman E., Henrique D. Generation and characterization of a novel mouse embryonic stem cell line with a dynamic reporter of Nanog expression. *PLoS One.* 2013. V. 8. № 3. Article No. e59928.
24. Saxe J.P., Tomilin A., Schöler H.R., Plath K., Huang J. Post-translational regulation of Oct4 transcriptional activity. *PLoS One.* 2009. V. 4. № 2. Article No. e4467.
25. Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized hill function method for modeling molecular processes. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007. V. 5. № 02b. P. 521–531.
26. Gillespie D.T. Stochastic simulation of chemical kinetics. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2007. V. 58. P. 35–55.
27. Gillespie D.T. Simulation methods in systems biology. In: *Formal Methods for Computational Systems Biology*. Eds. Bernardo M., Degano P., Zavattaro G. Springer Berlin Heidelberg, 2008. P. 125–167.
28. Rohr C., Marwan W., Heiner M. Snoopy – a unifying Petri net framework to investigate biomolecular networks. *Bioinformatics.* 2010. V. 26. № 7. P. 974–975.
29. Gillespie D.T. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J. Phys. Chem.* 1977. V. 81. № 25. P. 2340–2361.
30. Papapetrou E.P., Tomishima M.J., Chambers S.M., Mica Y., Reed E., Menon J., Tabar V., Mo Q., Studer L., Sadelain M. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *PNAS.* 2009. V. 106. № 31. P. 12759–12764.
31. Suzuki A., Raya Á., Kawakami Y., Morita M., Matsui T., Nakashima K., Gage F.H., Rodríguez-Esteban C., Belmonte J.C.I. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *PNAS.* 2006. V. 103. № 27. P. 10294–10299.

Материал поступил в редакцию 15.10.2014, опубликован 16.12.2014.