

Булевская модель цикла деления клетки дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*: динамика в случае нормальных и возмущенных начальных условий

М.И. Давидич*, Е.Б. Постников**

*Институт теоретической физики, Бременский университет, г. Бремен, D-28359,
Германия

**Курский государственный университет, г. Курск, 305000,
ул. Радищева, 33

Аннотация. Описана булевская сеть, моделирующая цикл клеточного деления дрожжей вида *Schizosaccharomyces pombe*. Проанализирована ее динамика по отношению к возмущениям начальных условий и показано, что построенная модель является устойчивой. Проведен анализ начальных условий, приводящих к устойчивым точкам, соответствующим как корректному биологическому пути, так и относящимся к летальным мутациям.

Ключевые слова: булевская сеть, клеточный цикл, *Schizosaccharomyces pombe*.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день центральная задача системной биологии состоит в создании моделей, которые способны прогнозировать динамику сложных молекулярных сетей, контролирующих функции живых организмов [1]. И хотя пока многоклеточные организмы остаются еще слишком сложными для таких исследований, модели одноклеточных организмов, а также молекулярных сетей, реализующих отдельные каскады внутриклеточных реакций, являются в настоящее время объектом активных исследований, см. например, обзоры [2 – 5].

В целом, если известна биохимия отдельных процессов, существуют различные методы для обработки этой информации с последующей ее математической формализацией в виде системы связанных обыкновенных дифференциальных или стохастических уравнений, а также систем дискретных отображений для байесовских или булевских сетей [1].

Последний подход наиболее эффективен при моделировании таких процессов, как клеточный цикл, апоптоз, дифференциация клеток, в которых основную информацию несет последовательность состояний (путей) клетки и влияние активности отдельных компонентов на выбор пути. В этом случае точное время, которое занимают протекающие процессы, не столь важно. Сравнение с биологическими данными представляет основную трудность при построении моделей с непрерывным временем, поскольку такие системы содержат большое число подгоночных биохимических параметров (например, элементарных констант реакции), сложно определяемых экспериментально [6]. Кроме того, последние исследования показывают, что некоторые молекулярные сети сконструированы настолько устойчиво, что время не является критическим фактором [7]. Этот факт сделал возможным построение более простых моделей для молекулярных сетей, успешно использованных для прогнозирования

* davidich@itp.uni-bremen.de

** postnicov@mail.ru

специфических последовательностей экспрессии ряда генов [8 – 10] и циклов различных клеточных процессов [11 – 16].

Одними из таких модельных организмов в подобных исследованиях являются различные виды дрожжей [17], что связано с их относительно полной изученностью с молекулярно-генетической точки зрения. В частности, в 1996 году был расшифрован полностью генетический код *Saccharomyces cerevisiae* и позднее в 2002 — *Schizosaccharomyces pombe*. Один из важных результатов, полученных в последние годы, — построение простой булевой сети, адекватно моделирующей цикл клеточного деления *Saccharomyces cerevisiae*, и всестороннее исследование ее динамической устойчивости [14].

В то время как *Saccharomyces cerevisiae* является более старой и изученной стандартной моделью, исследование *Schizosaccharomyces pombe* набирает все большую силу в последние годы, так как этот организм характеризуется более продолжительной фазой роста, чем *Saccharomyces cerevisiae*, и является более удобной моделью для экспериментальных и математических исследований [18, 19]. В настоящее время достигнут определенный прогресс в описании клеточного цикла этого организма на основе различных вариантов систем обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающих изменение поведения концентраций белков во времени [6, 20]. Однако такой подход требует больших знаний о входящих в систему кинетических константах, непосредственное экспериментальное определение которых сопряжено со значительными трудностями, что влечет за собой их введение на основе подбора, обеспечивающего правдоподобное поведение решения каждого варианта системы. Поэтому создание булевой сети, моделирующей регуляцию ключевых белков и воиспроизводящей правильную последовательность их активации и ингибирования в соответствующих фазах клеточного цикла, представляется весьма актуальной задачей.

В работе [21] была предпринята первая попытка построения такой модели по аналогии с [14], в которой было показано, что данная модель адекватна экспериментальным данным. Данная статья — ее продолжение, включающее более подробное рассмотрение математических свойств этой системы, в отличие от предварительных результатов [21], направленных, прежде всего, на анализ ее биохимических основ и сравнительный анализ с родственной моделью близкого организма *Saccharomyces cerevisiae*.

ПОСТРОЕНИЕ БУЛЕВСКОЙ МОДЕЛИ

В соответствии с общими принципами построения булевой сети, каждому метаболиту ставится в соответствие узел i , значение которого $S_i \in \{0,1\}$. При этом $S_i(t) = 0$ если узел неактивен и $S_i(t) = 1$ в противном случае.

Эволюция состояний узлов осуществляется параллельным обновлением по следующему правилу:

$$S_i(t+1) = \Theta \left[\text{sign} \left(\sum_k T_{ik} S_k(t) + Q_i \right) \right], \quad (1)$$

где использованы функция знака числа

$$\text{sign}(x) = \begin{cases} 1, & x > 0, \\ 0, & x = 0, \\ -1, & x < 0, \end{cases}$$

и функция Хэвисайда

$$\Theta(x) = \begin{cases} 1, & x > 0, \\ 0, & x \leq 0. \end{cases}$$

Матрица T_{ik} и вектор Q_i определяют правила перехода между состояниями. Численные значения их элементов задаются в соответствии с условиями, рассмотренными ниже.

Собственная динамика каждого узла удовлетворяет одному из следующих положений: 1) возбужденный i -й узел может сохранять свое состояние неопределенно долго (в этом случае соответствующий диагональный элемент $T_{ii} = 0.5$) или же 2) самоподавляется в отсутствие внешнего возбуждения на следующем шаге ($T_{ii} = 0$) или 3) на каждом шаге имеет место самовозбуждение узла. Последнее может соответствовать биохимическому процессу производства соответствующего вещества. Частным случаем такой ситуации является наличие постоянного активирующего узла, действующего только на данный и не имеющего ингибирующих входов от остальных узлов рассматриваемой сети. Такой процесс задается величиной $Q_i = 0.5$. Этот выбор обеспечивает подавление узла только при поступлении в него ингибирующего воздействия.

Взаимодействие узлов сети описывается заданием недиагональных элементов T_{ik} , $i \neq j$, и Q_i . В том случае, если узел с номером i активируется (подавляется) узлом с номером k или соответствующее воздействие осуществляется совокупностью входов активных узлов k , объединенных логическим оператором «или», $T_{ij} = 1$, $i \neq j$ ($T_{ij} = -1$, $i \neq j$), $Q_i = 0.5$. Если же возбуждение (подавление) узла осуществляется только при подаче на него нескольких активирующих (ингибирующих) сигналов, объединенных логическим оператором «и», необходимо дополнительное введение элемента вектора $Q_i = -\sum_j T_{ij} + 1$ ($Q_i = \sum_j T_{ij} - 1$) (где индекс j пробегает все значения, соответствующие узлам, действующим на данный).

Известно [5], что основными молекулярными регуляторами клеточного цикла служат ферменты, объединенные под общим именем «циклин-зависимые киназы» (CDK) и управляющие процессом фосфорилирования белков, а также группа белков — циклинов, которые при реакции с CDK образуют фермент-субстратный комплекс, что является необходимым условием активации киназ. Кроме того, завершение клеточного цикла путем разделения удвоенных хромосом осуществляется группой ферментов — комплексом возбуждения анафазы (APC), одновременно подавляющих активность циклинов фазы митоза. Взаимодействие указанных трех групп белков, в основном, и определяет развитие процесса деления клетки, и с их активными/неактивными состояниями следует сопоставить состояния узлов булевой сети, моделирующей данный процесс. Подробная аннотация биохимических свойств главных регуляторов клеточного цикла и принципа их выбора для математической модели *Schizosaccharomyces pombe* может быть найдена в [21]. В данной же работе, основной целью которой является исследование свойств построенной булевой сети, приведем названия и нумерацию узлов сети, табл. 1. Ее графическое представление см. на рис. 1.

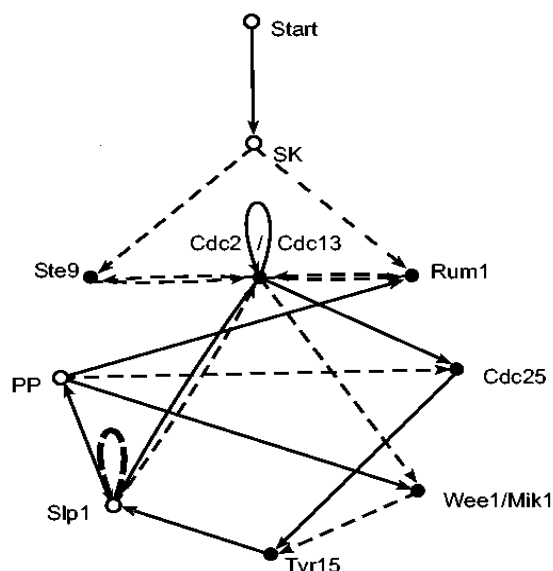


Рис. 1. Булевская сеть, моделирующая деление клетки *Schizosaccharomyces pombe*. Закрашенные точки соответствуют узлам, сохраняющим свое состояние, незакрашенные — узлам, переходящим в неактивное состояние при отсутствии возбуждения. Сплошные линии — активация, штриховые — ингибирование; петли обозначают элементы вектора Q_i с соответствующими свойствами.

Таблица 1.

Номер и название узла	Название белков, их описания и функции.
1 Start	Start работает как сигнал (масса клетки), активирующий запускающие киназы SK
2 SK	SK: комплексы циклинов, необходимых для перехода клетки в фазу активного роста.
3 Cdc2/Cdc13	Cdc2 – циклин-зависимая активирующая киназа (может быть активна только в комплексе с циклином В-типа Cdc13), контролирующая клеточный цикл эукариотов. Необходима для вхождения в фазу роста и митоз.
4 Ste9	Ste9 – убиквитин-содержащий белок. Играет роль в дифференциации.
5 Rum1	Rum1 – циклин-зависимая киназа. Регулирует последовательность процессов при росте массы клетки и митозе, действуя как ингибитор Cdc2.
6 Slp1	Slp1 – убиквитин-содержащий белок. Отвечает за продолжение клеточного цикла после полного восстановления ДНК.
7 Tyr-15	Tyr-15 – мономер полимерной молекулы Cdc2.
8 Mik1/Wee1	Wee1, Mik1 – киназы, контролирующие выход в митоз в качестве отрицательного регулятора G2/М перехода
9 Cdc25	Cdc25 – белок, работающий в качестве индуктора в контроле митоза.
10 PP	PP – неизвестный белок. Предположительно [19] его роль может играть фосфорилированный белок Clp1p, который обеспечивает корректный выход из митоза.

Таблица 2.

Состояния устойчивых точек	36	68	70	74	78	100
Бассейны притяжения (абсолютное значение), w	68	22	7	17	5	393
Бассейны притяжения (относительное значение)	13.3	4.3	1.3	3.4	1.0	76.7

Матрица и вектор, описывающие взаимодействие узлов и их внутреннюю динамику:

$$T_{ik} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0.5 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & 0.5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & 0.5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5 & -1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0.5 & 0.5 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix},$$

$$Q_i^T = (0 \ 0 \ 0.5 \ 0 \ 0 \ -1 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0).$$

Так как каждое состояние сети может быть представлено как десятиразрядное двоичное число, то в визуализации и обсуждении результатов состояния маркируются соответствующим числом в десятичной записи. Например, состоянию нормального начала клеточного цикла ("биологическому начальному состоянию") соответствуют единичные состояния узлов 1 (Start), 4 (Ste9), 5 (Rum1), 8 (Mik1/Wee1), остальные – нулевые. Используя табл. 1, это состояние можно представить в виде двоичного числа 1001100100. В свою очередь, ему можно сопоставить десятичное: $1001100100_2 = 612_{10}$. Аналогичным образом далее представлены в качестве десятичных чисел и остальные состояния системы (совокупности нулей и единиц, задающие состояния узлов в порядке слева направо, как они пронумерованы в табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ

На рис. 2 приведено графическое представление результатов моделирования динамики описанной булевой сети. В качестве начальных условий рассмотрена вся возможная совокупность сочетаний активных и неактивных узлов после активации стартового, т.е. состояния от 513 до 1023. Видно (рис. 2а), что траектории уже за 9 итераций приходят в набор из шести стационарных точек. На рис. 2б изображены абсолютные значения мощности бассейнов притяжения каждой из них (количество начальных состояний, при задании которых система приходит в данное устойчивое

состояние), видно, что наибольшее количество начальных состояний приводит к конечному состоянию 100, которое отличается от биологически корректного исходного условия (612) неактивным узлом Start, включение которого запускает новый клеточный цикл (биологический комментарий к последовательности состояний, соответствующей нормальному процессу, см. в [21]). Конкретные численные значения приведены в табл. 2. На рис. 2с представлена зависимость количества возможных состояний сети в ходе итераций, начиная с максимально возможного набора в 512 состояний. По оси абсцисс используется логарифмическая шкала. Можно заметить, что сжатие множества возможных состояний происходит весьма быстро, в частности, на первых четырех шагах оно с большой точностью удовлетворяет степенному закону $N \propto N^{-2.25}$. Такое поведение говорит о высокой степени глобальной устойчивости сети, отвечающей циклу клеточного деления *Schizosaccharomyces pombe*, которое отмечалось ранее также и для другого вида дрожжей, *Saccharomyces cerevisiae* [14]. Это дало возможность авторам цитируемой статьи высказать предположение, что глобальная устойчивость является неотъемлемым свойством биологических систем, образовавшихся путем естественного отбора, и может служить критерием при поиске механизмов формирования метаболических сетей. Наш результат служит ясным подтверждением такого вывода.

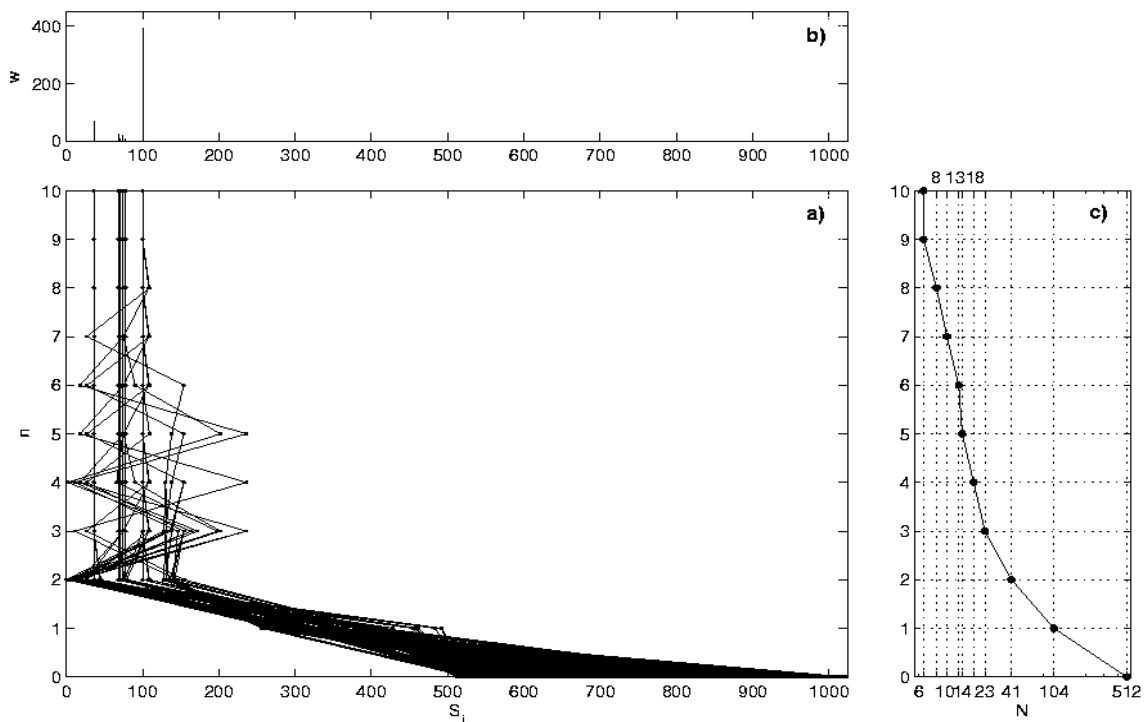


Рис. 2. Эволюция состояний булевой сети *Schizosaccharomyces pombe*: а) траектории состояний при всех возможных начальных условиях; б) распределение конечных состояний; в) количества состояний в ходе эволюции

Рассмотрим подробнее влияние на динамику клеточного цикла малых возмущений начального состояния, то есть всех возможных начальных условий с единичной дистанцией Хамминга от биологического начального состояния (612). Соответствующий граф эволюции приведен на рис. 3. Корректный метаболический путь выделен стрелками большей толщины. Узлы, снабженные петлями, соответствуют устойчивым точкам. Видно, что из девяти траекторий, исходящих из возмущенных начальных состояний, сохраняющих значение стартового узла $S_1(0) = 1$, семь приходят

к аттрактору, являющемуся устойчивой точкой, соответствующей корректному завершению процесса деления клетки. Десятое возмущенное состояние с $S_1(0) = 0$ само по себе соответствует этой точке и может не рассматриваться.

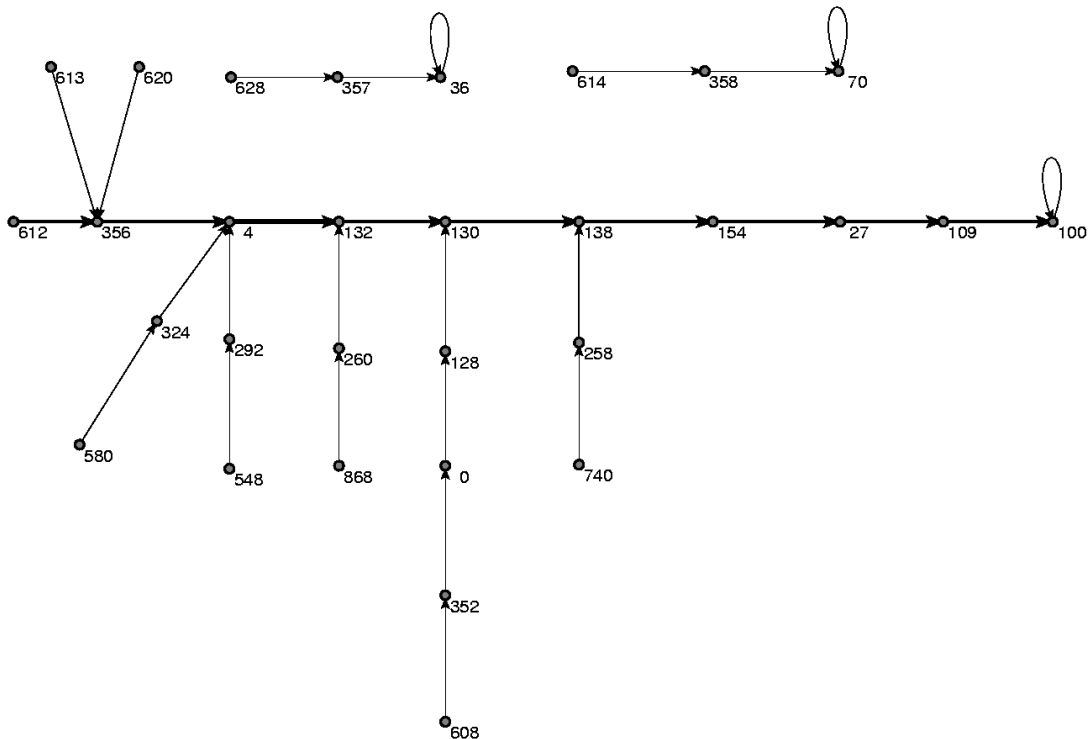


Рис. 3. Эволюция состояний сети для малых возмущений начального условия.

Два возмущенных начальных состояния, приводящих к уходу с корректного метаболического пути, характеризуются соответственно нарушениями нормального уровня возбуждения узлов *Slp1* (состояние 614, что соответствует замене в нормальном начальном состоянии нуля на единицу в его двоичном представлении $1001110100_2 = 614_{10}$) и *Cdc25* (состояние 628 – аналогичная замена 0 на 1 в девятом разряде двоичного представления). Экспериментально показано [22, 23], что эти два узла обеспечивают корректный выход из митоза (состояние 100). Нарушение же их работы приводит к делению клетки с поврежденной структурой ДНК и ее гибели. Таким образом, математическая модель соответствует экспериментальным данным, которые показывают, что при активации данных белков наступает гибель клетки.

Другим важным элементом, активное экспериментальное изучение мутаций которого велось в последние годы, является *Wee1* (в нашей модели в соответствующий узел он объединен с работающим с ним в комплексе *Mik1*). Нормальное функционирование этого белка обеспечивает рост массы клетки на протяжении всех фаз деления клетки до митоза фаз. Известно, что в случае нарушения его функции [20], например, при его деактивации путем повышения температуры среды, клетка переходит к вынужденному митозу. Образовавшиеся дочерние клетки, несмотря на отклонения по массе, в основном сохраняют жизнеспособность (при отсутствии одновременного повреждения других узлов). Такое поведение ясно иллюстрируется графом на рис. 3: путь из возмущенного состояния 608, как раз соответствующего отключению *Wee1* (замена 1 на 0 в восьмом разряде двоичного представления) при сохранении прочих узлов входит в биологическую последовательность состояний непосредственно в начале процесса митоза (вершина 130 – десятичное представление

соответствующего десятиразрядного двоичного), обходя область начальных фаз клеточного деления. Если же возмущать систему таким образом, что начальное состояние имеет десятичное представление числом 740 (узел *rum1* меняет состояние с 0 на 1), то система также ускоренно переходит к митозу (вершина 138 на пути нормального цикла клеточного деления), что также соответствует экспериментальным данным [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, из анализа динамического поведения модели цикла деления клетки *Schizosaccharomyces pombe*, представленной в виде булевой сети, можно сделать следующие выводы.

Построенная математическая модель содержит как эффективную схему расчета, так и наглядное представление эволюции состояний сети. Первое связано с тем, что в работе использована компактная матричная форма задания правила обновления состояний узлов. Такой вид имеет преимущество по сравнению со стандартным описанием эволюции булевой сети в виде совокупности отдельных операторов выбора (примененным, например в [14], см. код использованной программы расчета в [25], а также в [21]) благодаря сокращению времени расчета за счет использования быстрых численных алгоритмов линейной алгебры. Второе базируется на десятичном представлении состояний сети. Такая форма весьма компактна и в то же время дает однозначное представление каждого из узлов, для чего достаточно перевести его в двоичное: нули и единицы двоичной записи соответствуют нулевым (неактивным) и единичным (активным) состояниям узлов сети. Кроме того, она позволяет наглядно представить эволюцию состояний системы, см. например, рис. 2: каждое состояние в десятичном представлении ассоциируется с точкой на числовой прямой, а переходы между ними – с соединяющими их линиями.

С биологической точки зрения, основной результат состоит в том, что модель адекватно воспроизводит основные биологические особенности исследуемого процесса — как путь, соответствующий нормальному протеканию деления клетки, так и его варианты, наблюдающиеся при летальных и нелетальных мутациях, моделируемых малыми возмущениями начальных условий (один из 10 узлов в начальный момент состояния принимает значение, противоположное нормальному, т.е. 1 вместо 0, или наоборот). При этом изменение последовательности состояний при возмущении начальных условий согласуется с экспериментальными биологическими данными. Малые возмущения, выводящие систему в устойчивые точки, не совпадающие с состоянием, соответствующим нормальному завершению процесса, являются изменениями начального состояния, являющимися летальными мутациями.

Глобальная динамика модели является весьма устойчивой, что характеризуется наличием шести точек, соответствующих состояниям, к которым притягиваются траектории, начинающиеся при всех возможных начальных состояниях, причем устойчивая точка, соответствующая биологически корректному завершению процесса, обладает наибольшим бассейном притяжения (т.е. в ней заканчиваются траектории, начинающиеся в подавляющем большинстве всех возможных начальных условий). Это также согласуется с наблюдением об устойчивости сети, задающей клеточный цикл родственного организма *Saccharomyces cerevisiae*.

В заключение авторы хотели бы поблагодарить А.И. Лаврову (Берлинский университет им. Гумбольдта) за обсуждение работы и ценные замечания, касающиеся биологической стороны задачи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klipp E., Herwig R., Kowald A., Wierling C., Lehrach H. *Systems Biology in Practice: Concepts, Implementation and Application*. Wiley-VCH. 2005.
2. Hasty J., McMillen D., Isaacs F., Collins J.J. Computational studies of gene regulatory networks: in numero molecular biology. *Nat. Rev. Genet.* 2001. **2**. 268-279.
3. Riel N.A.W. Dynamic modelling and analysis of biochemical networks: mechanism-based models and model-based experiments. *Briefings in Bioinformatics.* 2006. **7**(4). 364-374.
4. Smolen P., Baxter D.A., Byrne J.H. Mathematical modeling of gene networks. *Neuron.* 2000. **26**. 567-580.
5. Aguda B.D. Modeling the Cell Division Cycle. *Lect. Notes Math.* 2006. **1872**.1-22.
6. Tyson J.J., Chen K.C., Novak B. Network dynamics and cell physiology. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001. **2**. 908-916.
7. Braunewell S., Bornholdt S. Superstability of the yeast cell-cycle dynamics: Ensuring causality in the presence of biochemical stochasticity. *J. Theor. Biol.* 2006. **245**(4). 638-643.
8. Albert R., Othmer H.G. The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the *Drosophila* segment polarity genes. *J. Theor. Biol.* 2003. **223**(1). 1-18.
9. Espinosa-Soto C., Padilla-Longoria P., Alvarez-Buylla E.R. A gene regulatory network model for cell-fate determination during arabidopsis thaliana flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell.* 2004. **16**. 2923-2939.
10. Sanchez L., Thieffry D. A logical analysis of the drosophila gap-gene system. *J. Theor. Biol.* 2001. **211**. 115-141.
11. Genoud T., Metraux J.P. Crosstalk in plant cell signaling: Structure and function of the genetic network. *Trends Plant Sci.* 1999. **4**. 503-507.
12. Mendoza L., Thieffry D., Alvarez-Buylla E.R. Genetic control of flower morphogenesis in arabidopsis thaliana: a logical analysis. *Bioinformatics.* 1999. **15**. 593-606.
13. Thum K.E., Shasha D.E., Lejay L.V., Coruzzi G.M. Light- and carbonsignaling pathways. Modeling circuits of interactions. *Plant Physiol.* 2003. **132**. 440-452.
14. Li F., Long T., Lu Y., Quyang Q., Tang C. The yeast cell-cycle network is robustly designed. *PNAS.* 2004. **101**(14). 4781-4786.
15. Faure A, Naldi A, Chaouiya C, Thieffry D. Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics.* 2006. **22**(14). 124-131.
16. Gunsalus K.C., Ge H., Schetter A.J., Goldberg D.S., Han J.-D.J. et al Predictive models of molecular machines involved in *Caenorhabditis elegans* early embryogenesis. *Nature.* 2005. **436**(11). 861-865.
17. Forsburg S.L. The best yeast? *Trends in Genetics.* 1999. **15**(9). 340-344.
18. Novak B., Tyson J.J. Modeling the control of DNA replication in fission yeast. *PNAS.* 1997. **94**. 9147-9152.
19. Novak B., Pataki Z., Ciliberto A., Tyson J.J. Mathematical model of the cell division cycle of fission yeast. *Chaos.* 2001. **11**(1). 277-286.
20. Tyson J.J., Csikasz-Nagy A., Novak B. The dynamics of the cell-cycle regulation. *BioEssays.* 2002. **24**. 1095-1109.
21. Davidich M.I., Bornholt S. Boolean network model predicts cell cycle sequence of fission yeast. <http://www.arxiv.org/abs/0704.2200> (Submitted to *PLoS ONE*).
22. Furnari B., Rhind N., Russell P. Cdc25 Mitotic Inducer Targeted by Chk1 DNA Damage Checkpoint Kinase. *Science.* 1997. **227**(5331). 1495 - 1497.

23. Kim S.H., Lin D.P., Matsumoto S., Kitazono A., Matsumoto T. Fission Yeast Slp1: An Effector of the Mad2-Dependent Spindle Checkpoint. *Science*. 1998. **279**(5353). 1045 - 1047.
24. Moreno S., Nurse P. Regulation of progression through the G₁ phase of the cell cycle by the *rum1*⁺ gene. *Nature*. 1994. **367**. 236 - 242.
25. Chunhui C. Network Dynamics of Budding Yeast Cell Cycle. *Diss. B.Sc.*, Hong Kong Baptist University. 2005.

Материал поступил в редакцию 8.12.2007, опубликован 14.12.2007.