



ГЕННЫЕ СЕТИ

***Е.А.Ананько, Ф.А.Колпаков, О.А.Подколотная, Е.В.Игнатьева,
Т.Н.Горячкова, И.Л.Степаненко, Н.А.Колчанов***

Лаборатория теоретической генетики

Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 10
тел.: (3832) 33–28–60, факс: (3832) 33–12–78
email: eananko@bionet.nsc.ru

Концепция генных сетей

Все происходящие в организме процессы (биохимические, физиологические и др.) осуществляются за счет координированной экспрессии различных групп генов [1]. Каждая такая группа составляет основу конкретной генной сети, отвечающей за выполнение определенной функции клетки, органа, организма. Под генной сетью при этом понимается совокупность координированно экспрессирующихся генов, их белковых продуктов и взаимосвязей между ними. Важным моментом в функционировании генной сети является ее связь с внешней средой, в том числе и с другими генными сетями. Поэтому в любой генной сети имеются компоненты, обеспечивающие либо восприятие и передачу внешних сигналов, либо способность продуцировать такие сигналы [2–4].

В генной сети можно выделить несколько обязательных типов компонентов, таких как: 1) группы координированно экспрессирующихся генов (ядро сети); 2) белки, кодируемые этими генами (выполняющие как определенные структурные, транспортные, биохимические, так и регуляторные функции); 3) отрицательные и положительные обратные связи, стабилизирующие параметры генной сети на определенном уровне или, напротив, отклоняющие их от исходного значения; 4) низкомолекулярные соединения (метаболиты и др.) и различные внешние сигналы, обеспечивающие переключение состояний генной сети [2].

Особенностью протекания биохимических реакций в организме является их разделение во времени и пространстве. Если рассматривать генную сеть на уровне отдельной клетки, можно выделить несколько компартментов (например, межклеточное пространство, клеточная мембрана, цитоплазма, ядро), в каждом из которых идут свои процессы.

Для полного описания генных сетей необходим анализ протекающих в них процессов на уровне целого организма. В этом случае возможно описание генных сетей, отдельные части которых распределены по различным крупным компартментам организма, таким, как органы и ткани. Во взаимодействии удаленных компартментов организма ключевую роль играют молекулярные сигналы нейроэндокринной системы.

Во многих случаях можно определить направленность процессов в пределах определенного фрагмента генной сети, выделить входной поток – путь передачи сигнала с рецепторов клетки к гену и выходной поток – процессы, происходящие в клетке после ответа генов на внешний сигнал.

Характерной особенностью организации генных сетей является их способность к саморегуляции за счет замкнутых регуляторных контуров с отрицательными и положительными обратными связями [1]. Молекулярной основой существования таких регуляторных контуров является наличие сайтов-мишеней в ДНК, РНК и белках, с которыми могут взаимодействовать различные молекулярные компоненты

генной сети и внешние регуляторные факторы. Благодаря этим двум типам регуляторных контуров возможно поддержание определенного функционального состояния генной сети или ее переход в другой режим функционирования, в том числе и под влиянием факторов внешней среды.

Для накопления информации о генных сетях, их описания и моделирования разрабатывается база данных GeneNet [2–4], которая доступна через сеть Интернет по адресу: <http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/systems/mgl/genenet/>.

Формализованное описание элементарных структур и событий в генных сетях

Авторами разработан гибкий универсальный компьютерный язык, который позволяет описывать любые генные сети, функционирующие в организмах про- и эукариот [2]. Примеры, приведенные на рисунке 1, показывают, что с помощью этого языка можно описывать такие элементарные события, как мультимеризацию белковых субъединиц, приводящую к формированию активного белкового комплекса; обратный процесс – диссоциацию мультимерного комплекса на субъединицы; экспрессию белка; изменение ферментной активности белка за счет его взаимодействия с лигандом; положительный эффект транскрипционного фактора, активирующего транскрипцию гена; негативный эффект транскрипционного фактора, подавляющего транскрипционную активность гена, и многие другие.

Все компоненты генной сети разделены на два основных типа: объекты и связи (взаимодействия) между ними. Объектами могут являться органы, ткани, клетки, клеточные компартменты, белки и белковые комплексы, гены, РНК, небелковые регуляторные вещества и продукты метаболизма. Гибкий формат GeneNet [2] позволяет по мере необходимости добавлять новые классы объектов.

Все взаимодействия между объектами подразделяются на два основных класса: реакции и регуляторные воздействия (рис. 1).

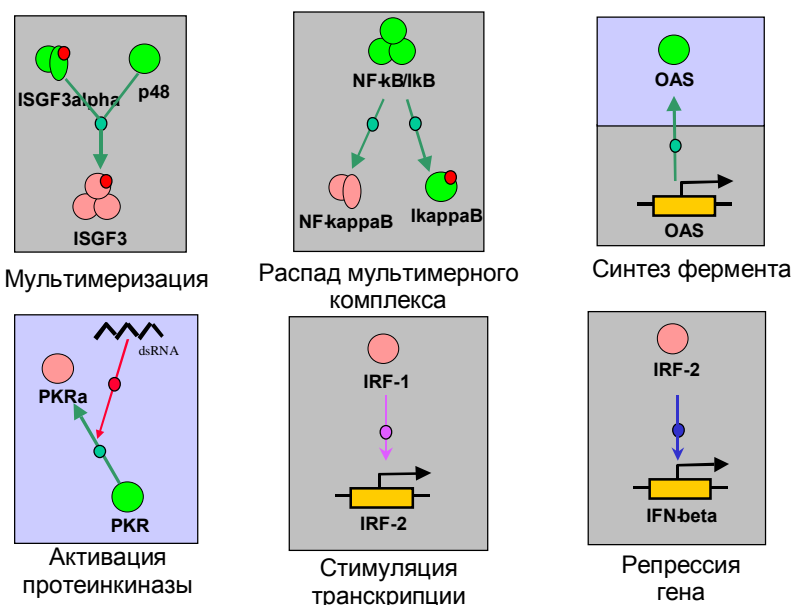


Рис. 1. Примеры элементарных процессов в генных сетях.

● – активные белки, ● — неактивные белки, – гены, взаимодействия между объектами: – реакции, – положительные регуляторные воздействия, – отрицательное регуляторное воздействие.

Реакции – это достаточно разнородный класс событий, в результате которых происходит образование нового объекта, например, мультимеризация или распад мультимерных комплексов, модификация белка (фосфорилирование или ацетилирование), транспорт веществ.

Регуляторные воздействия в зависимости от типа влияния делятся на 4 под-класса: включение, выключение, усиление или ингибирование процесса. Стандартность базовых элементов дает возможность описать практически любое событие в генной сети.

Система GeneNet позволяет учитывать, что компоненты генной сети могут быть разнесены по различным органам, тканям, клеткам и клеточным компартментам. Кроме того, GeneNet позволяет описывать различные уровни организации генной сети: молекулярный, клеточный и организменный.

Разработан специальный интерфейс для ввода информации в GeneNet. С помощью этой программы биологи могут вводить данные в базу GeneNet, оперируя естественными понятиями молекулярной биологии, связанными с экспрессией генов и их регуляцией. При этом интерфейс ввода осуществляет автоматическую трансляцию введенной информации в стандартный формат GeneNet (рис. 2). Пример описания молекулярного события (каталитической реакции превращения прогестерона в дезоксикортикостерон под действием цитохрома P450c21) в стандартном формате GeneNet представлен на рисунке 2.

```
ID <protein>Bt:P450c21^endoplasmic reticulum ->> <sub-  
stance>Progesterone^endoplasmic reticulum -> <sub-  
stance>Deoxycorticosterone^endoplasmic reticulum  
DT 09.7.1999.; Ignatieva E.V.; created.  
AT switch on  
EF direct  
//
```

Рис. 2. Описание в формате GeneNet каталитической реакции превращения дезоксикортикостерона в кортикостерон под действием цитохрома P450c21.

Большим достоинством созданной технологии является возможность автоматической визуализации генных сетей [2]. Формализованные данные обрабатываются с помощью специальной программы (GeneNet viewer) и представляются пользователю в виде графической схемы. Каждый компонент генной сети имеет свое изображение, отражающее его особенности. Например, форма изображения белка отражает степень его мультимеризации, цвет – функциональное состояние.

Классификация генных сетей и анализ характерных примеров

Анализ информации из базы данных GeneNet, а также из имеющихся литературных данных позволяет выделить несколько основных типов генных сетей.

1. Генные сети, обеспечивающие осуществление циклических процессов, например, клеточного цикла, цикла сокращения сердечной мышцы и т.д.
2. Генные сети, обеспечивающие процессы роста и дифференцировки клеток, морфогенеза тканей и органов, роста и развития организмов.
3. Генные сети, обеспечивающие гомеостаз биохимических и физиологических параметров организма.
4. Генные сети, обеспечивающие реакции организмов на изменение состояния внешней среды, например, стрессовый ответ.

Генная сеть клеточного цикла

Генная сеть, регулирующая клеточный цикл, представляет собой циклограмму – последовательность событий, результатом которых является возвращение генной сети в исходное состояние.

В функционирование генной сети клеточного цикла вовлечено большое количество генов и их белковых продуктов. Основную роль здесь играют транскрипционные факторы семейства E2F [5–7]. На начальных этапах функционирования циклической сети преобладают регуляторные воздействия преимущественно положительного типа (рис. 3). Это обеспечивает интеграцию пролиферативных сигналов, запускающих деление клетки и репликацию ДНК (G1 и G1/S фазы клеточного цикла) [8]. На последующих этапах запускаются отрицательные регуляторы, блокирующие действие пролиферативных сигналов и приводящие к завершению программы клеточного цикла [9, 10, 7]. Подробно генная сеть, регулирующая клеточный цикл, описана в статье О.В.Кель [11].

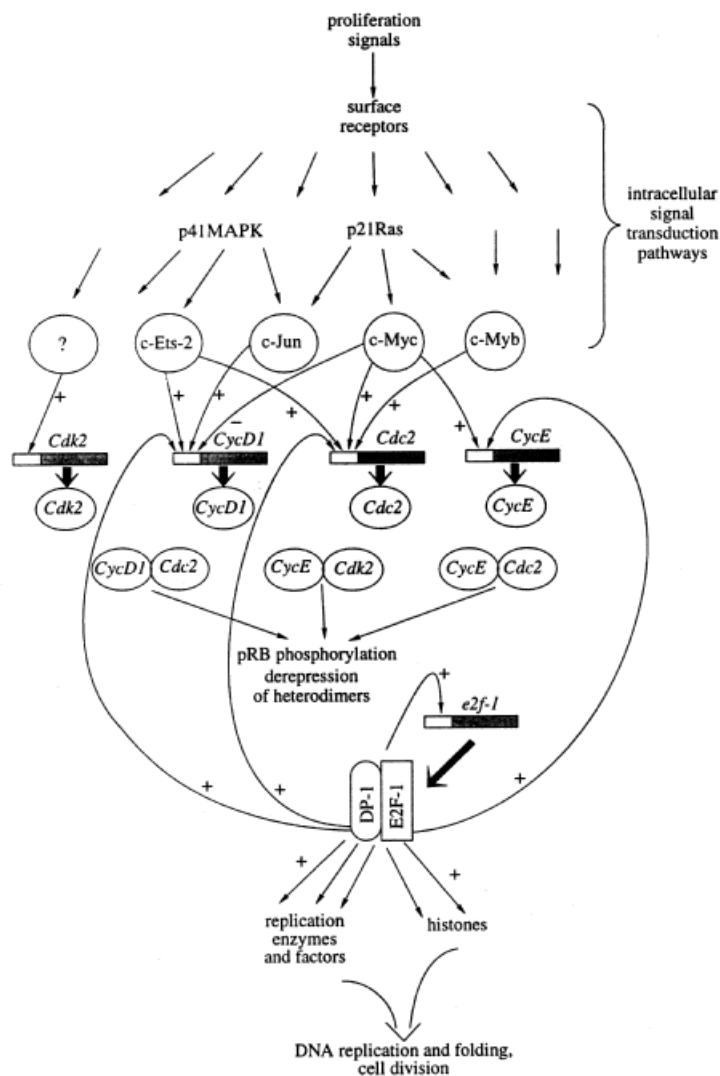


Рис. 3. Интеграция пролиферативных сигналов, запускающих деление клетки и репликацию ДНК. [Цит. по: [11]].

Генная сеть дифференцировки эритроцитов

Характерной особенностью генных сетей, контролирующих дифференцировку клеток, морфогенез тканей и органов, рост и развитие организмов, является наличие регуляторных контуров с положительными обратными связями. Известно, что функция регуляторного контура с положительной обратной связью состоит в максимально эффективном отклонении контролируемого параметра X от его текущего значения (рис. 4). Положительные обратные связи играют ключевую роль в регуляции процессов морфогенеза, роста и развития организмов, по своему смыслу представляющих быстрый уход от начального состояния.

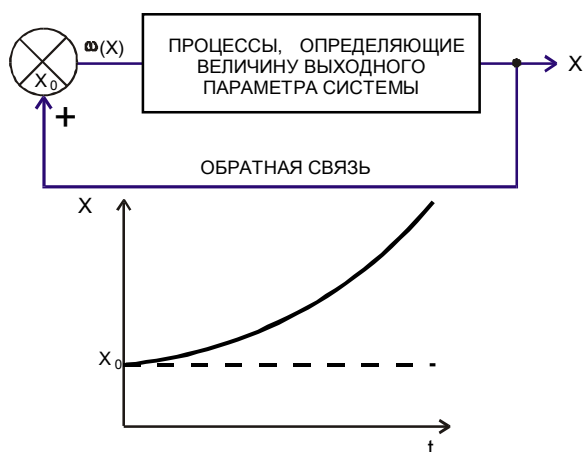


Рис. 4. Принципиальная схема регуляторного контура с положительной обратной связью.

Рассмотрим в качестве примера генную сеть терминальной дифференцировки и созревания эритроцитов. На стадии проэритробластов основным внешним фактором, предотвращающим апоптоз, обеспечивающим пролиферацию и терминальную дифференцировку клеток, является эритропоэтин. После его связывания с мембранным рецептором происходит гомодимеризация рецептора [12, 13] и включается путь передачи сигнала эритропоэтина в клетку, осуществляемый системой клеточных протеинкиназ. Этот путь еще не исследован полностью, однако известно, что в результате происходит фосфорилирование, перемещение в ядро и ацетилирование ряда транскрипционных факторов [14–18], которые, в свою очередь, активируют транскрипцию ряда генов, в том числе и гена, кодирующего транскрипционный фактор GATA-1 [19].

Отметим прежде всего наличие сайтов связывания фактора GATA-1 в промоторе собственного гена. Благодаря этому происходит быстрое автоусиление транскрипции гена GATA-1 по механизму положительной обратной связи [20, 21]. Подобная положительная обратная связь является очень эффективной и быстродействующей, так как в ее функционирование не вовлечены другие гены-посредники. Поэтому она называется **короткой** положительной обратной связью.

Существует еще одна, **длинная**, положительная обратная связь, обеспечивающая усиление транскрипции гена, кодирующего фактор GATA-1. Ее основа – присутствие в промоторной области гена, кодирующего рецептор эритропоэтина (EPOR), сайта связывания фактора GATA-1, который активирует транскрипцию этого гена [22]. В результате увеличивается количество молекул эритропоэтинового рецептора на клеточной мембране, повышается интенсивность прохождения сигнала от эритропоэтина через его рецептор к гену, кодирующему фактор GATA-1, и, как следствие, замыкается еще один контур положительной обратной связи, обеспечивающий дополнительное автоусиление транскрипции гена GATA-1.

Транскрипционный фактор GATA-1 является ключевым в процессе созревания и дифференцировки эритроцитов (рис. 5). Сайты его связывания обнаружены в регуляторных районах практически всех эритроид-специфичных генов, в том числе генов, кодирующих α - и β -субъединицы гемоглобина, а также генов, кодирующих ферменты биосинтеза гема. Сайты связывания GATA-1 обнаружены также в регуляторных районах генов эритроид-специфичных транскрипционных факторов, таких, как HOXB2, TAL1, EKLF, RBTN2. Благодаря наличию сайтов связывания фактора GATA-1 в регуляторных областях этих генов, под действием GATA-1 осуществляется стимуляция их транскрипции [23–26]. Эти факторы в свою очередь обеспечивают дополнительную стимуляцию эритроид-специфичных генов. Таким образом, происходит включение каскада регуляторных явлений, обеспечивающих транскрипцию генов, которые определяют терминальную дифференцировку и созревание эритроидной клетки.

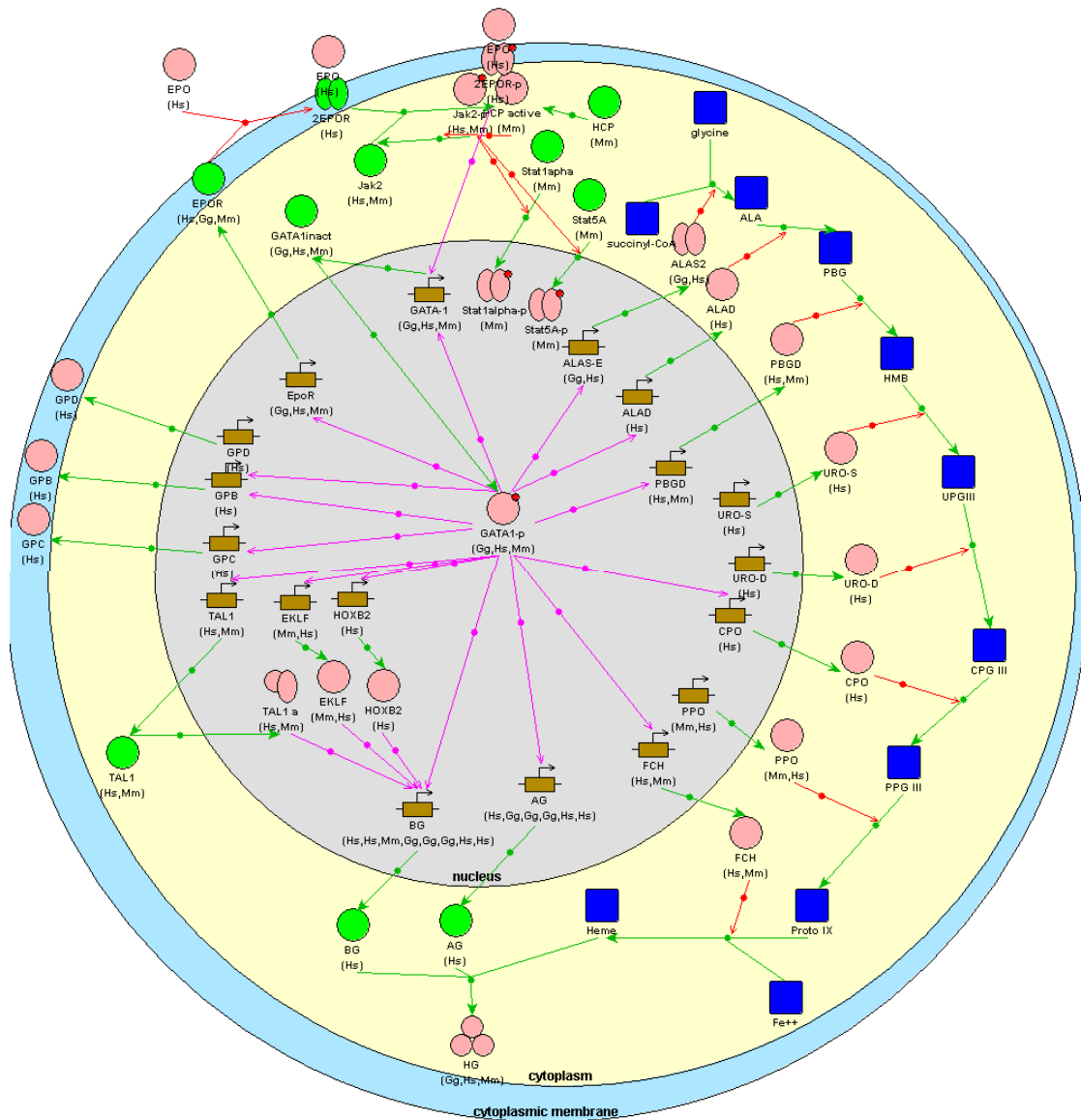


Рис. 5. Генная сеть, регулирующая дифференцировку эритроцитов.

● - активные белки, ● - неактивные белки, ■ - низкомолекулярные соединения,
 □ - гены, → - реакции, → - положительные регуляторные воздействия.

- Отметим наиболее важные особенности этой генной сети:
- 1) активация генной сети внешним стимулом (эритропозтином), запускающим процесс дифференцировки;
 - 2) наличие центрального регулятора генной сети – транскрипционного фактора GATA-1;
 - 3) наличие двух контуров с положительной обратной связью, обеспечивающих аутоусиление транскрипции гена, кодирующего фактор GATA-1;
 - 4) каскадный способ активации транскрипции эритроид-специфических генов.

Генная сеть, регулирующая прорастание семян

В начальном состоянии функционирование генной сети, регулирующей прорастание семени растения, заблокировано фитогормоном АВА (абсцизовая кислота). На этой стадии ферменты, расщепляющие запасные вещества (амилазы ААМV, ВМУ1 и протеазы ЕВР1, ЕВР2), находятся в неактивном состоянии, а их гены не экспрессируются (рис. 6) [27]. Поступление воды из окружающей среды приводит к снижению уровня АВА до критических концентраций и активации указанных выше ферментов (рис. 6,а). Таким образом, снятие ингибирующего эффекта АВА запускает необратимый процесс прорастания семени [28, 29]. Активные ферменты расщепляют запасные питательные вещества, обеспечивая питание зародыша (embryo nutritions). Клетки зародыша (embryo) при этом синтезируют гиббереллины [27, 28], которые, в свою очередь, активируют гены, кодирующие ферменты расщепления запасных веществ (рис. 6,б). Это приводит к увеличению концентрации активных ферментов и усилению питания зародыша.

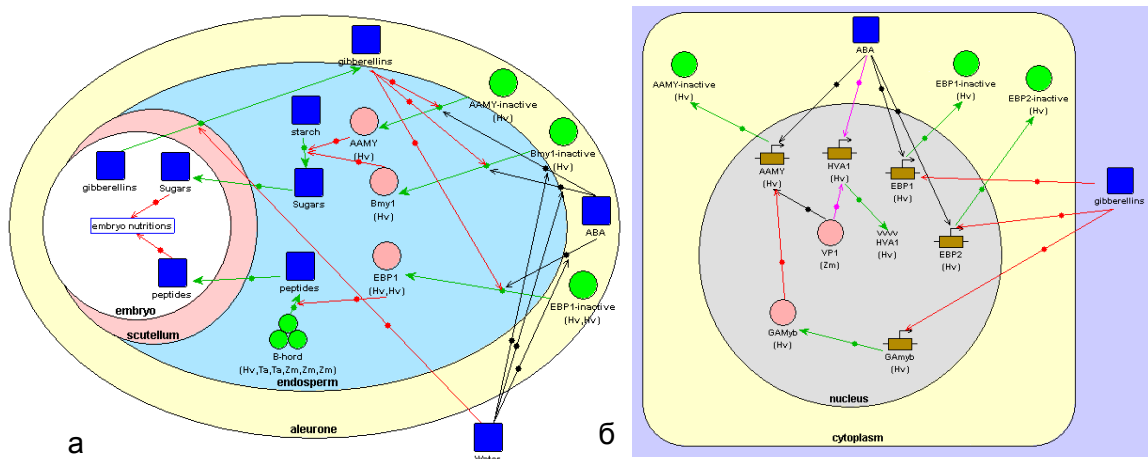


Рис. 6. Генная сеть, регулирующая прорастание семени.

а – уровень организма (желтый – алейроновая оболочка, голубой – эндосперм, розовый – скуттелум, белый - зародыш); б – уровень отдельной клетки алейроновой оболочки.

● ○ ферменты и транскрипционные факторы (зеленые – неактивные, розовые – активные), ■ – низкомолекулярные соединения, □ – гены, .

→ – реакции,

→ – положительные регуляторные воздействия,

→ – ингибирующие воздействия.

Следует отметить, что как и в случае эритропоза, активация сети начинается с действия внешнего стимула (воды). Быстрое и необратимое развитие процесса достигается за счет наличия регуляторного контура с положительной обратной связью (синтез гиббереллинов растущими клетками зародыша приводит к активации

генов ферментов и усилению питания зародыша), а также за счет кассетной активации генов.

Генная сеть липидного метаболизма

Наличие отрицательных обратных связей – характерная особенность генных сетей, обеспечивающих гомеостатирование молекулярных и физиологических параметров организмов. Известно, что регуляторный контур с отрицательной обратной связью предназначен для поддержания величины контролируемого параметра организма X вблизи оптимального для данных условий среды уровня X_0 (рис. 7).

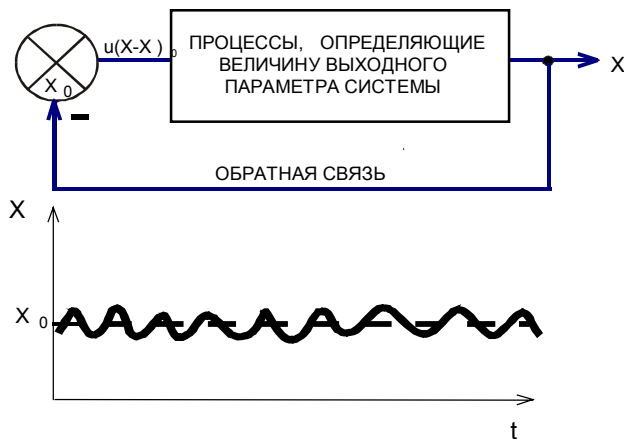


Рис. 7. Принципиальная схема регуляторного контура с отрицательной обратной связью.

Одним из примеров хорошо изученной сложно организованной системы, обеспечивающей гомеостаз физиологических параметров организма, является генная сеть липидного метаболизма. Одним из важнейших молекулярных компонентов этой сети является холестерин.

Внутриклеточное содержание холестерина регулируется двумя механизмами. Первый из них контролирует продукцию холестерина по механизму отрицательной обратной связи.

К системе, контролирующей уровень холестерина в клетке (рис. 8), относятся гены ферментов мевалонатного пути синтеза холестерина: GMG-CoA-S, GMG-CoA-R, FDPS, SS [30–33]. Усиление экспрессии этих генов приводит к повышению концентрации холестерина в клетке. Ключевыми регуляторными элементами этой системы являются транскрипционные факторы подсемейства SREBP (sterol regulatory element-binding proteins). Показано, что транскрипционные факторы SREBP образуются в клетке из неактивного предшественника (preSREBP) под действием стерол-регулируемой протеазы (SRP) [34, 35].

SREBP активирует транскрипцию генов, кодирующих ферменты мевалонатного пути, что приводит к повышению концентрации холестерина в клетке (рис. 8). Повышенное содержание холестерина подавляет активность стерол-регулируемой протеазы, что снижает переход preSREBP в активную форму [34, 35]. При этом транскрипционная активность генов мевалонатного пути падает, процесс образования холестерина замедляется, и его уровень в клетке нормализуется.

Второй механизм контроля уровня холестерина в клетке связан с регуляцией его транспорта через клеточную мембрану из межклеточного пространства. Этот транспорт осуществляется при участии рецептора липопротеина низкой плотности (LDLR). При сниженной концентрации холестерина повышается концентрация активного SREBP и происходит активация транскрипции гена, кодирующего LDLR [31, 36]. При повышенном внутриклеточном уровне холестерина снижается активность стерол-регулируемых протеаз и, соответственно, концентрация активного SREBP. В

свою очередь, это влечет за собой уменьшение транскрипционной активности гена LDLR и снижение транспорта холестерина внутрь клетки (рис. 8).

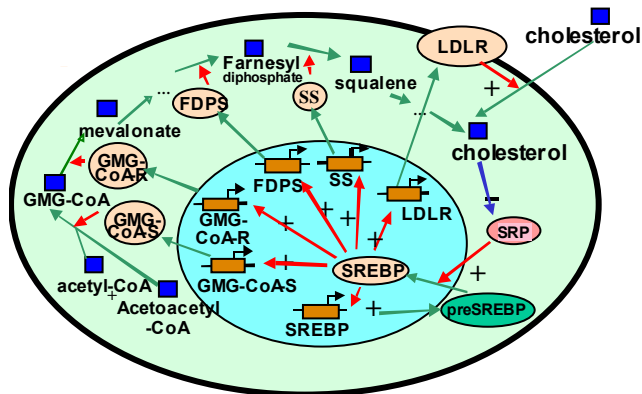


Рис. 8. Подсистема контроля содержания холестерина в клетке. ● - белки, □ - гены. SREBP – транскрипционные факторы, взаимодействующие со стерол-регулируемым элементом регуляторных районов генов, preSRE – предшественники SREBP, SS – скваленсинтетаза, FDPS – фарнезилпирофосфат-синтетаза, GMG-CoA-R – 3-гидрокси-3-метилглутарил-коферментА-редуктаза, GMG-CoA-S – 3-гидрокси-3-метилглутарил-коферментА-синтетаза, LDLR – рецептор липопротеинов низкой плотности, SRP – стерол-регулируемая протеаза.

Концентрация любого молекулярного компонента в клетке как в открытой системе определяется скоростями его продукции, разрушения и транспорта через клеточную мембрану. Именно поэтому в системе липидного метаболизма клетки один из регуляторных контуров с отрицательной обратной связью контролирует скорость продукции холестерина, а другой – его транспорт через клеточную мембрану. Следует также заметить, что в этой системе, как и во многих других генных сетях, используется принцип координированной каскадной активации генов центральным регуляторным белком (SREBP). Это обеспечивает быстрый ответ всей генной сети на изменение внутриклеточного содержания холестерина.

Генная сеть, регулирующая азотфиксацию у бобовых

В генной сети, регулирующей азотфиксацию, наблюдается координированная экспрессия генов, принадлежащих двум различным организмам. Взаимодействие между азотфиксирующими бактериями *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Azorhizobium* и корнями бобовых растений приводит к образованию нового органа у растения – клубенька, в котором и происходит азотфиксация.

Флавоноиды, секретируемые корнями растений, индуцируют транскрипцию *nodD* гена бактерий (рис. 9). NodD белок является активатором транскрипции других бактериальных *nod*-генов, участвующих в образовании сигнальной молекулы – липоолигосахарида Nod-фактора [37, 38]. Этот фактор стимулирует дифференцировку эпидермальных клеток растений и индуцирует экспрессию ранних генов нодулинов [39–41] и генов клеточного цикла растений [42, 43], что приводит к образованию сложной структуры – клубенька [44, 45]. Бактерии попадают в цитоплазму примордиальных клеток клубенька в результате эндоцитоза. После этого примордиум клубенька дифференцируется в зрелый клубенок [46]. В его клетках начинается экспрессия поздних генов нодулинов растений [47, 48]. Продукты экспрессии этих генов совместно с продуктами бактериальных генов *nif* и *fix* включают азотфиксацию. Избыток аммония, конечного продукта азотфиксации, ингибирует активность *nod* генов бактерий, что приводит к уменьшению фиксации азота (рис. 9).

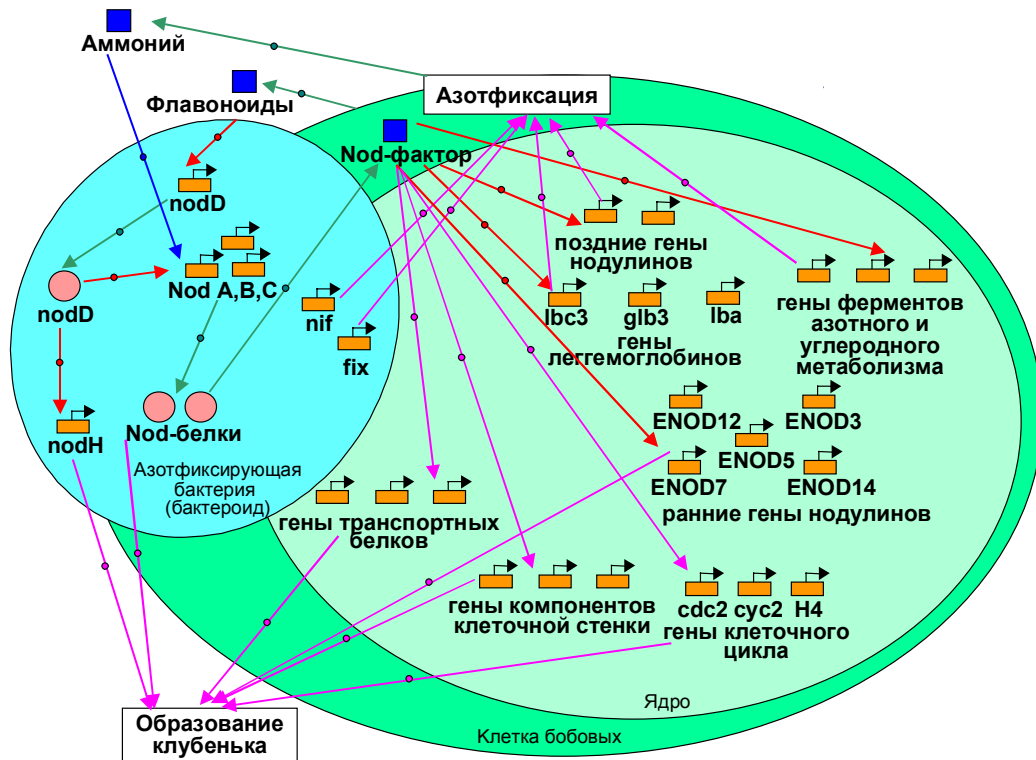


Рис. 9. Фрагмент генной сети, регулирующей азотфиксацию.

- 📄 - гены, ⬤ - белки, 🟩 - низкомолекулярные вещества,
- ➡ (pink) - положительные регуляторные воздействия,
- ➡ (blue) - отрицательные регуляторные воздействия,
- ➡ (green) - реакции.

Данная генная сеть интересна тем, что она является симбиотической (гибридной) и контролирует одновременно два процесса. Во-первых, управляя функцией генов, принадлежащих двум различным организмам, бактерии и растению-хозяину, она контролирует процесс своего собственного формирования (дифференцировку и пролиферацию клеток растений, проникновение бактерий в растительную клетку). Во-вторых, сформировавшаяся таким образом генная сеть по механизму отрицательной обратной связи управляет процессом азотфиксации.

Генная сеть противовирусного ответа

В качестве примера генной сети, обеспечивающей ответ организма на изменение внешней среды, можно рассмотреть генную сеть противовирусного ответа.

Важную роль в обеспечении противовирусного ответа играют интерфероны – цитокины с широким спектром биологических активностей. Участие интерферонов в регуляции противовирусного ответа осуществляется путем стимуляции транскрипции IFN-индуцируемых генов, кодирующих различные белки (рис. 10).

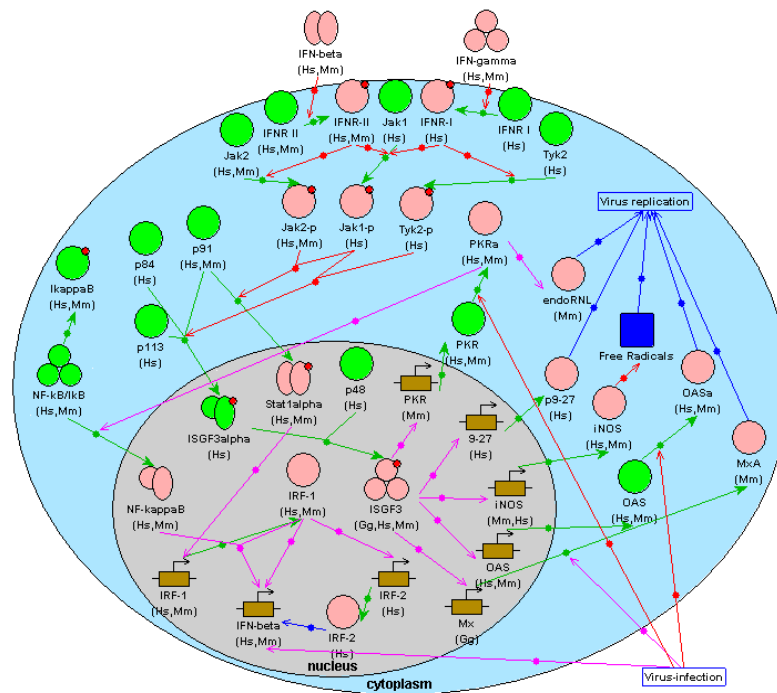


Рис. 10. Генная сеть, регулирующая противовирусный ответ.
 ● ● – белки (зеленые – неактивные, розовые – активные),
 ■ – низкомолекулярные соединения, □ – гены,
 → – реакции,
 → – положительные регуляторные эффекты,
 → – ингибирующие эффекты.

При попадании вируса в клетку происходит активация гена интерферона-β (IFN-beta). После связывания интерферона с рецепторами на поверхности клетки происходит активация латентных цитоплазматических факторов семейства STAT (p84, p91, p113), которые проникают в ядро, мультимеризуются и образуют транскрипционный фактор ISGF3 [49, 50]. Этот фактор активирует промоторы целого ряда интерферон-индуцируемых генов раннего ответа (PKR, 9-27, iNOS, OAS, Mx), действие которых направлено на подавление репликации вируса (рис. 10). Параллельно образуется гомодимер Stat1-α, активирующий ген транскрипционного фактора IRF-1 [51, 52]. Этот фактор, синтезируясь в клетке, приводит к дополнительной активации гена интерферона [53, 54]. Кроме того, он активирует ген другого транскрипционного фактора IRF-2 [55]. При подавлении вирусной инфекции IRF-2, накапливаясь в клетке, связывается с промотором гена интерферона, что приводит к ингибированию гена [56] и выключению системы.

Характерной особенностью этой генной сети, типичной для генных сетей, обеспечивающих ответ организма на изменение внешней среды, является двух-этапный механизм действия. На первом этапе происходит быстрая активация системы за счет действия регуляторного контура с положительной обратной связью. На втором этапе происходит подавление ответа за счет включения отрицательных регуляторных механизмов.

Генная сеть теплового шока

Ответ на тепловой шок очень консервативен в клетках всех организмов от бактерий до человека. Повышение температуры, как и другие виды стресса, такие как

гипоксия, соли тяжелых металлов и т.д., вызывает индукцию генов, кодирующих белки теплового шока (HSP), и подавление синтеза других белков. Белки теплового шока как молекулярные шапероны защищают другие белки от разрушения и клетку от гибели.

Ключевым регулятором системы генов теплового шока является транскрипционный фактор HSF-1 (рис. 11). В нормальных условиях HSF-1 присутствует в цитоплазме в неактивной форме. Его инактивация осуществляется в том числе и за счет связывания с регуляторными белками HSP70 и HSP90.

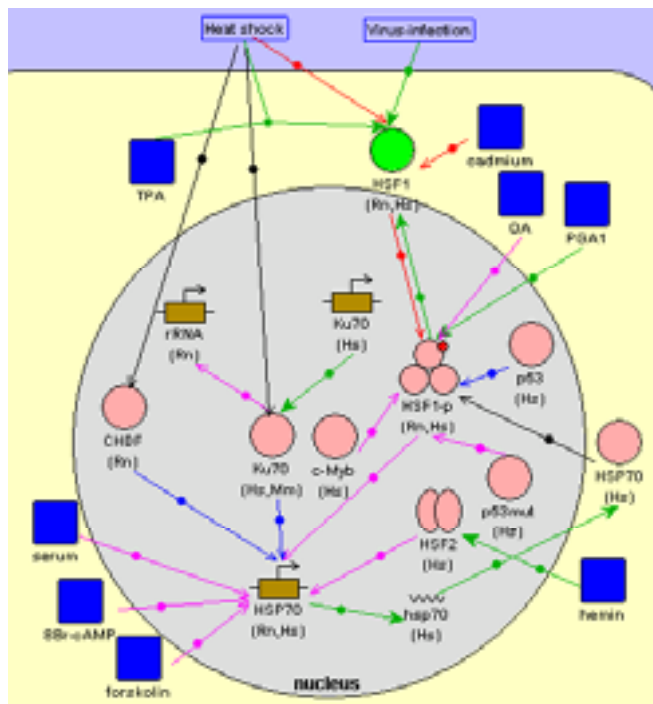


Рис. 11. Фрагмент генной сети, регулирующей ответ организма на тепловой шок.

При тепловом шоке белки клетки частично денатурируются. Молекулярные шапероны HSP70 и HSP90 связываются с гидрофобными участками таких поврежденных белков [57]. При этом HSF-1 освобождается, тримеризуется, фосфорилируется, проникает в ядро и активирует транскрипцию генов теплового шока, в том числе и гена *hsp70*, заменяя в регуляторных районах этих генов фактор-репрессор CHBF [58, 59]. Избыток в цитоплазме клетки не связанного с белками HSP70 приводит к его связыванию в ядре с HSF-1 (рис. 11), инактивации этого транскрипционного фактора и его обратному транспорту в цитоплазму [57]. Таким образом, происходит выключение ответа на воздействие стрессового фактора.

Кроме того, при тепловом шоке подавляется синтез транскрипционного фактора Ku70, который входит в состав активаторного комплекса полимеразы I. Это приводит, например, к подавлению транскрипции 45S гена рибосомальной РНК и прекращению синтеза рибосомальных белков [60].

Отсутствие в рассмотренной генной сети регуляторного контура с положительной обратной связью объясняется, видимо, тем, что в цитоплазме уже присутствует регуляторный фактор, который при стрессовом ответе просто переходит в активное состояние. При этом молекулярными сигналами, активирующими генную сеть теплового шока, являются денатурированные белки. Не исключено, однако, что при дальнейшем изучении этой генной сети будет найден регуляторный контур с положительной обратной связью.

Можно заметить, что в двух рассмотренных генных сетях, регулирующих ответ организма на внешнее воздействие (генная сеть противовирусного ответа и генная сеть теплового шока), используются общие принципы регуляции:

- 1) быстрое развитие ответа на стимул за счет преобладания положительных регуляторных воздействий и каскадной активации генов;
- 2) включение на поздних этапах отрицательных регуляторных воздействий, обеспечивающих возвращение генной сети в исходное состояние.

Заключение

Как известно, исходная парадигма генетики, сформировавшаяся в начале века, основывалась на том, что один ген определяет один фенотипический признак. Она сыграла свою фундаментальную роль, позволив доказать существование фенотипических признаков, имеющих очень простые (с генетической точки зрения) механизмы контроля.

Позднее возникла новая парадигма, согласно которой отдельный признак может контролироваться группой взаимодействующих генов. Уточнение и развитие этой парадигмы приводит в настоящее время к представлению о том, что отдельный фенотипический признак является продуктом функционирования определенной генной сети. Была также создана концепция молекулярно-генетических управляющих систем [61, 62], в которых выделены информационные компоненты клетки (совокупность кодирующих макромолекул) и исполняющие компоненты (молекулярные ферментативные комплексы, обеспечивающие выполнение различных биохимических процессов).

Именно сложнейшие механизмы регуляции экспрессии генов эукариот обеспечивают получение необходимых количеств генных продуктов в определенных клетках, тканях и органах в определенные моменты жизни. Экспрессия любого гена регулируется в рамках генных сетей при тесном взаимодействии всех элементов сети. При этом следует учитывать иерархический принцип функционирования многоклеточного организма. Низшим уровнем является уровень клетки. Объединения клеток образуют ткани и органы. Высшим уровнем является организм в целом.

Генные сети, управляющие жизнедеятельностью организма, также организованы по иерархическому принципу. На рисунке 12 схематически представлена иерархия локальных генных сетей, обеспечивающих выполнение различных функций в организмах. Самый низкий уровень этой иерархии соответствует генным сетям базального метаболизма клетки. Их функция зависит от стадии клеточного цикла и может быть подавлена или активирована в зависимости от регуляторных воздействий, поступающих от генных сетей вышележащих уровней. Эти воздействия могут изменять интенсивность и направленность как метаболических процессов, так и процессов клеточного деления. Наиболее высокие уровни организации соответствуют генным сетям рецепции сигналов окружающей среды и генным сетям, обеспечивающим ментальные функции.

При всей условности представленной классификации, она подчеркивает существование групп генных сетей, выполняющих качественно сходные функции, их взаимодействие и соподчинение. В этой глобальной и иерархически организованной генной сети управляющие сигналы идут не только от более высоких уровней к более низким, но и в обратном направлении. При этом сигналы могут иметь как положительный (активирующий), так и отрицательный (подавляющий) характер и реализовываться через разнообразные регуляторные контуры с положительными и отрицательными обратными связями.



Рис. 12. Иерархическая интеграция локальных генных сетей в глобальную генную сеть организма.

Изучение организации генных сетей, описанных в базе данных GeneNet, позволяет выделить следующие принципы их организации:

- 1) наличие в каждой локальной генной сети «центральных» генов, обеспечивающих координацию функций остальных генов этой сети;
- 2) наличие в каждой генной сети регуляторных контуров типа положительной и отрицательной обратных связей, обеспечивающих ее авторегуляцию;
- 3) существование большого разнообразия молекулярных механизмов, обеспечивающих функционирование обратных связей, в том числе за счет изменения интенсивности процессов транскрипции, сплайсинга, трансляции, фосфорилирования и т.д.;
- 4) иерархическая организация локальных генных сетей и их интеграция в глобальную генную сеть организма.

В целях более полного описания генных сетей и механизмов их функционирования в настоящее время ведется развитие системы GeneNet по следующим направлениям:

- 1) разрабатываются способы динамического представления генной сети;
- 2) совершенствуется концепция иерархического описания генных сетей на уровне различных компартментов организма.

В настоящее время в мире существует несколько баз данных, описывающих различные аспекты организации генных сетей про- и эукариот. CSNDB (Cell Signaling Networks Database) [63] содержит информацию о путях передачи сигналов в клетках человека. BRITE (Biomolecular Reaction pathways for Information Transfer and Expression) [<http://www.genome.ad.jp/brite/brite.html>] - база данных по взаимодействию генов, контролирующего клеточный цикл у человека и дрожжей, ранние этапы развития у дрозофилы. GeNet (Gene Networks database) [<http://www.iephb.ru/~spirov/genet00.html>] содержит информацию о генных сетях дрозофилы, морского ежа и нематоды.

Опыт разработки подобных баз данных указывает на необходимость создания такой универсальной компьютерной технологии, которая позволяет описывать любые элементарные структуры, события и процессы, значимые для функционирования генных сетей. При этом существенными требованиями являются: 1) возможность описания в рамках единого подхода как механизмов регуляции экспрессии ге-

нов, так и различных метаболических процессов; 2) возможность описания генных сетей как про-, так и эукариот, а также их совместного функционирования; 3) наличие понятной и удобной в работе системы для описания генных сетей и ввода информации в базу; 4) возможность автоматической визуализации структуры генных сетей на основе накопленных данных. Нерешенность этих задач тормозит развитие подходов к изучению генных сетей, поскольку любые исследования подобного рода должны основываться на анализе большой совокупности разнородных экспериментальных данных. Предложенная нами компьютерная технология GeneNet [2, 3] является, по-видимому, одной из первых попыток успешного решения задачи, которая открывает путь к быстрому накоплению в компьютерных базах данных экспериментальной информации о структурно-функциональной организации генных сетей и возможности для систематизации и анализа этой информации.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Т.И.Меркуловой за полезные советы и плодотворное обсуждение затронутых в статье проблем. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 97-04-49740, 98-04-49479, 98-07-90126, 98-07-91078, 99-07-90203), Всероссийской программой «Геном человека» и Комитетом по науке и технике РФ.

Список литературы

1. Колчанов Н.А. Регуляция транскрипции генов эукариот: базы данных и компьютерный анализ // *Mol. Biol.* 1997. Т. 31. С. 581–583.
2. Kolpakov F.A., Ananko E.A., Kolesov G.B., Kolchanov N.A. GeneNet: a database for gene networks and its automated visualization // *Bioinformatics.* 1998. V. 14. P. 529–537.
3. Kolpakov F.A., Ananko E.A. Interactive data input into the GeneNet database // *Bioinformatics.* 1999. V. 15. P. 713–714.
4. Ananko E.A., Kolpakov F.A., Kolesov G.B., Kolchanov N.A. Gene networks: a database and its automated visualization through the Internet in the GeneNet computing system // *Proc. I Intern. conf. on bioinformatics of genome regulation and structure.* 1998. Novosibirsk, Russia. P. 82–85.
5. Farnham P.J., Slansky J.E., Kollmar R. The role of E2F in the mammalian cell cycle // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1155. P. 125–131.
6. DeGregori J., Kowalik T., Nevins J.R. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 4215–4224.
7. O'Connor D.J., Lam E.W.-F., Griffin S. et al. Physical and functional interactions between p53 and cell cycle co-operating transcription factors, E2F1 and DP1 // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 6184–6192.
8. Johnson D.G., Ohtani K., Nevins J.R. Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression // *Genes Dev.* 1994. V. 8. P. 1514–1525.
9. Di Leonardo A., Linke S.P., Clarkin K., Wahl G.M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts // *Genes Dev.* 1994. V. 8. P. 2540–2551.
10. Agarwal M.L., Agarwal A., Taylor W.R., Stark G.R. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 8493–8497.
11. Кель О.В., Кель А.Э. Межгенные взаимодействия в регуляции клеточного цикла: ключевая роль транскрипционных факторов семейства E2F // *Мол. биология.* 1997. Т. 31, № 4. С. 656–670.

12. *Matthews D.J., Topping R.S., Cass R.T., Giebel L.B.* A sequential dimerization mechanism for erythropoietin receptor activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 9471–9476.
13. *Elliott S., Lorenzini T., Yanagihara D. et al.* Activation of the erythropoietin (EPO) receptor by bivalent anti-EPO receptor antibodies // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 24691–24697.
14. *Penta K., Sawyer S.T.* Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation, nuclear translocation, and DNA binding of STAT1 and STAT5 in erythroid cells // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 31282–31287.
15. *Briegel K., Bartunek P., Stengl G. et al.* Regulation and function of transcription factor GATA-1 during red blood cell differentiation // *Development.* 1996. V. 122. P. 3839–3850.
16. *Boyes J., Byfield P., Nakatani Y., Ogryzko V.* Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation // *Nature.* 1998. V. 396. P. 594–598.
17. *Zhang W., Bieker J.J.* Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 9855–9860.
18. *Prasad K.S., Jordan J.E., Koury M.J. et al.* Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 11603–11611.
19. *Dalyot N., Fibach E., Ronchi A. et al.* Erythropoietin triggers a burst of GATA-1 in normal human erythroid cells differentiating in tissue culture // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 4031–4037.
20. *Hannon R., Evans T., Felsenfeld G., Gould H.* Structure and promoter activity of the gene for the erythroid transcription factor GATA-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 3004–3008.
21. *Tsai S.-F., Strauss E., Orkin S.H.* Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter // *Genes Dev.* 1991. V. 5. P. 919–931.
22. *Chin K., Oda N., Shen K., Noguchi C.T.* Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 3041–3049.
23. *Crossley M., Tsang A.P., Bieker J.J., Orkin S.H.* Regulation of the erythroid Kruppel-like factor (EKLF) gene promoter by the erythroid transcription factor GATA-1 // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 15440–15444.
24. *Lecoinde N., Bernard O., Naert K. et al.* GATA-and SP1-binding sites are required for the full activity of the tissue-specific promoter of the tal-1 gene // *Oncogene.* 1994. V. 9. P. 2623–2632.
25. *Royer-Pokora B., Rogers M., Zhu T.H. et al.* The TTG-2/RBTN2 T cell oncogene encodes two alternative transcripts from two promoters: the distal promoter is removed by most 11p13 translocations in acute T cell leukaemia's (T-ALL) // *Oncogene.* 1995. V. 10. P. 1353–1360.
26. *Vieille-Grosjean I., Huber P.* Transcription factor GATA-1 regulates human HOXB2 gene expression in erythroid cells // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 4544–4550.
27. *Mikkonen A., Porali I., Cercos M., Ho T.D.* A major cysteine proteinase, EPB, in germinating barley seeds: structure of two intronless genes and regulation of expression // *Plant Mol. Biol.* 1996. V. 31. P. 239–254.
28. *Gubler F., Kalla R., Roberts J.K., Jacobsen J.V.* Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter // *Plant Cell.* 1995. V. 7. P. 1879–1891.
29. *Rogers J.C., Rogers S.W.* Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid cis-acting hormone response complexes // *Plant Cell.* 1992. V. 4. P. 1443–1451.
30. *Jackson S.M., Ericsson J., Osborne T.F., Edwards P.A.* MF-Y has a novel role in sterol-dependent transcription of two cholesterol genes // *J. of Biol. Chemistry.* 1995. V. 270. P. 21445–21448.

31. *Lloyd D.B., Thompson J.F.* Transcriptional modulators affect in vivo protein binding to the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoters // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 25812–25818.
32. *Ericsson J., Jacson S.M., Lee B.C., Edwards P.A.* Sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 945–950.
33. *Guan G., Jiang G., Koch R.L., Shechter I.* Molecular cloning and functional analysis of the promoter of the human squalene synthase gene // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 21958–21965.
34. *Wang X., Sato R., Brown M. et al.* SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis // *Cell.* 1994. V. 77. P. 53–62.
35. *Wang X., Pai J.-T., Wiedefeld E.A. et al.* Purification of an interleukin-1 beta converting enzyme-related cysteine protease that cleaves sterol regulatory element-binding proteins between the leucine zipper and transmembrane domains // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 18044–18050.
36. *Briggs M.R., Yokoyama C., Wang X. et al.* Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 14490–14496.
37. *Fisher R.F., Long S.R.* Interactions of NodD at the nod Box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 233. P. 336–348.
38. *Gottfert M.* Regulation and function of rhizobial nodulation genes // *FEMS Microbiol. Rev.* 1993. V. 10. P. 39–63.
39. *Cook D., Dreyer D., Bonnet D. et al.* Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti* // *Plant Cell.* 1995. V. 7. P. 43–55.
40. *Vijn I., Christiansen H., Lauridsen P. et al.* A 200 bp region of the pea ENOD12 promoter is sufficient for nodule specific and nod factor induced expression // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 28. P. 1103–1110.
41. *Horvath B., Heidstra R., Lados M. et al.* Lipo oligosaccharides of *Rhizobium* induce infection related early nodulin gene expression in pea root hairs // *Plant J.* 1993. V. 4. P. 727–733.
42. *Yang W.C., de Blank C., Meskiene I. et al.* *Rhizobium* nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation // *Plant Cell.* 1994. V. 6. P. 1415–1426.
43. *Savoure A., Magyar Z., Pierre M. et al.* Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 1093–1102.
44. *Minami E., Kouchi H., Cohn J.R. et al.* Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules // *Plant J.* 1996. V. 10. P. 23–32.
45. *Cheon C.I., Lee N.G., Siddique A.B. et al.* Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 4125–4135.
46. *Nap J.P., Bisseling T.* Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule // *Science.* 1990. V. 250. P. 948–954.
47. *Kardailsky I., Yang W.C., Zalensky A. et al.* The pea late nodulin gene PsNOD6 is homologous to the early nodulin genes PsENOD3/14 and is expressed after the leghaemoglobin genes // *Plant Mol. Biol.* 1993. V. 23. P. 1029–1037.
48. *Kouchi H., Hata S.* GmN56, a novel nodule-specific cDNA from soybean root nodules encodes a protein homologous to isopropylmalate synthase and homocitrate synthase // *Mol. Plant. Microbe Interact.* 1995. V. 8. P. 172–176.

49. *Fu X.-Y., Schindler C., Improta T. et al.* The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 7840–7843.
50. *Qureshi S.A., Salditt-Georgieff M., Darnell J.E., Jr.* Tyrosine-phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated-gene factor 3 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 3829–3833.
51. *Pine R., Canova A., Schindler C.* Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1 promoter to mediate induction by IFN alpha and IFN gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 158–167.
52. *David M., Petricoin E.F., Igarashi K. et al.* Prolactin activates the interferon-regulated p91 transcription factor and the Jak2 kinase by tyrosine phosphorylation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 7174–7178.
53. *Thanos D., Maniatis T.* Identification of the rel family members required for virus induction of the human beta interferon gene // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 152–164.
54. *Garoufalis E., Kwan I., Lin R. et al.* Viral induction of the human beta interferon promoter: modulation of transcription by NF-kappa B/rel proteins and interferon regulatory factors // *J. Virol.* 1994. V. 68. P. 4707–4715.
55. *Harada H., Takahashi E.-I., Itoh S. et al.* Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system // *Mol. Cell. Biol.* 1994. V. 14. P. 1500–1509.
56. *Harada H., Fujita T., Miyamoto M. et al.* Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes // *Cell.* 1989. V. 58. P. 729–739.
57. *Morimoto R.* Regulation of heat shock transcription response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 3788–3796.
58. *Kim D., Ouyang H., Li G.C.* Heat shock protein hsp70 accelerates the recovery of heat-shocked mammalian cells through its modulation of heat shock transcription factor HSF1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 2126–2130.
59. *Li G.C., Yang S.H., Kim D. et al.* Suppression of heat-induced hsp70 expression by the 70-kDa subunit of the human Ku autoantigen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 4512–4516.
60. *Ghoshal K., Jacob S.T.* Heat shock selectively inhibits ribosomal RNA gene transcription and down-regulates E1BF/Ku in lymphosarcoma cells // *Biochem. J.* 1996. V. 317. P. 689–695.
61. *Ратнер В.А.* Концепция молекулярно-генетических систем управления. Новосибирск, НГУ, 1993. 117 с.
62. *Ратнер В.А., Жарких А.А., Колчанов Н.А. и др.* Проблемы теории молекулярной эволюции. М.: Наука, 1985. 263 с.
63. *Igarashi T., Kaminuma T.* Development of a cell signaling Network Database // *Proc. Symp. Biocomput.* 1997. P. 187–197.