

## ИНТЕГРАЦИЯ ГЕННЫХ СЕТЕЙ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ОРГАНИЗМА

**Н.А. Колчанов, О.А. Подколотная, Е.В. Игнатьева, В.В. Суслов,  
Т.М. Хлебодарова, А.Л. Проскура, Е.С. Воронич, Е.А. Дубовенко**

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, e-mail: kol@bionet.nsc.ru

### Введение

В последние 15 лет биология стала источником беспрецедентно огромных объемов экспериментальных данных, что обусловлено возникновением высокоэффективных экспериментальных технологий, обеспечивающих возможность скоростного массового секвенирования геномов, методов функциональной геномики, позволяющих исследовать динамику экспрессии больших групп генов с использованием технологии экспрессионных ДНК-чипов; методов протеомики, позволяющих анализировать белковый состав клеток, тканей и организмов, определять их первичную и пространственную структуру, оценивать динамику клеточной протеомы (изменение концентраций белков в клетках), реконструировать сети белок-белковых взаимодействий, методов метабомики, в частности, высокоразрешающего масс-спектрометрического исследования клеточных метаболитов, определения их концентраций, распределения метаболических потоков в клетках и т. п., одновременного исследования динамики тысяч метаболитов в отдельной клетке.

Осмысливание и использование этих экспериментальных данных принципиально невозможно без системного подхода и привлечения современных информационно-компьютерных технологий и эффективных математических методов анализа данных и моделирования биологических систем и процессов. В ответ на эту острую потребность возникла новая наука – постгеномная биоин-

форматика, или системная компьютерная биология. Одним из центральных объектов системной биологии являются генные сети – группы координированно функционирующих генов, обеспечивающих формирование фенотипических признаков организмов (молекулярных, биохимических, физиологических, морфологических, поведенческих и т. д.) [1, 2]. Обязательными компонентами любой генной сети являются: гены, кодируемые ими РНК, белки, метаболиты, пути передачи сигналов, метаболические пути, регуляторные контуры с положительными и отрицательными обратными связями.

Реконструкция генных сетей на основе интеграции обширных гетерогенных экспериментальных данных, получаемых методами структурной и функциональной геномики, транскриптомики, протеомики, метабомики и других технологий современной биологии, – одна из важнейших задач системной компьютерной биологии. Для решения этой задачи нами была разработана компьютерная технология, позволяющая осуществлять реконструкцию генных сетей человека, животных, растений, микроорганизмов на основе аннотации экспериментальных данных. Методы реконструкции генных сетей описаны нами в предыдущих статьях [2, 3]. Созданная на их основе компьютерная база данных GenNet (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenetworks.shtml>) в настоящее время содержит описание 37 генных сетей, контролирующих выполнение различных функций организмов.

Следует подчеркнуть, что любая генная

сеть, выполняющая конкретную функцию, в ходе своей работы обязательно взаимодействует с определенным множеством связанных с ней генных сетей, принимая от них метаболические или регуляторные сигналы, преобразуя их и, в свою очередь, передавая их на вход других генных сетей организма. Поэтому ясно, что глубокое понимание особенностей организации и механизмов функционирования любой генной сети возможно в конечном счете только в контексте рассмотрения ее взаимосвязей с другими генными сетями. В связи с этим исключительную важность приобретает исследование закономерностей интеграции и взаимодействия генных сетей, контролирующих отдельные физиологические функции в пределах глобальной генной сети организма. В данной статье на примере ряда генных сетей, представленных в базе данных GeneNet, рассматриваются некоторые особенности организации и принципы интеграции генных сетей, контролирующих такие физиологические функции, как регуляция уровня глюкозы в организме, синтез стероидных гормонов и регуляция циркадного ритма. Проведенный анализ показывает, что функционирование организма как целого, гомеостатирование важнейших его параметров, реакция на изменение показателей внутренней либо внешней среды, рост и дифференцировка в ходе онтогенеза обеспечиваются за счет интеграции отдельных генных сетей. Интеграция генных сетей определяется всей совокупностью процессов, протекающих в организме. В качестве интеграторов выступают нейрогуморальные и метаболические сигналы, а также генные сети-интеграторы.

#### **Генные сети, участвующие в регуляции уровня глюкозы: взаимодействие и механизмы интеграции**

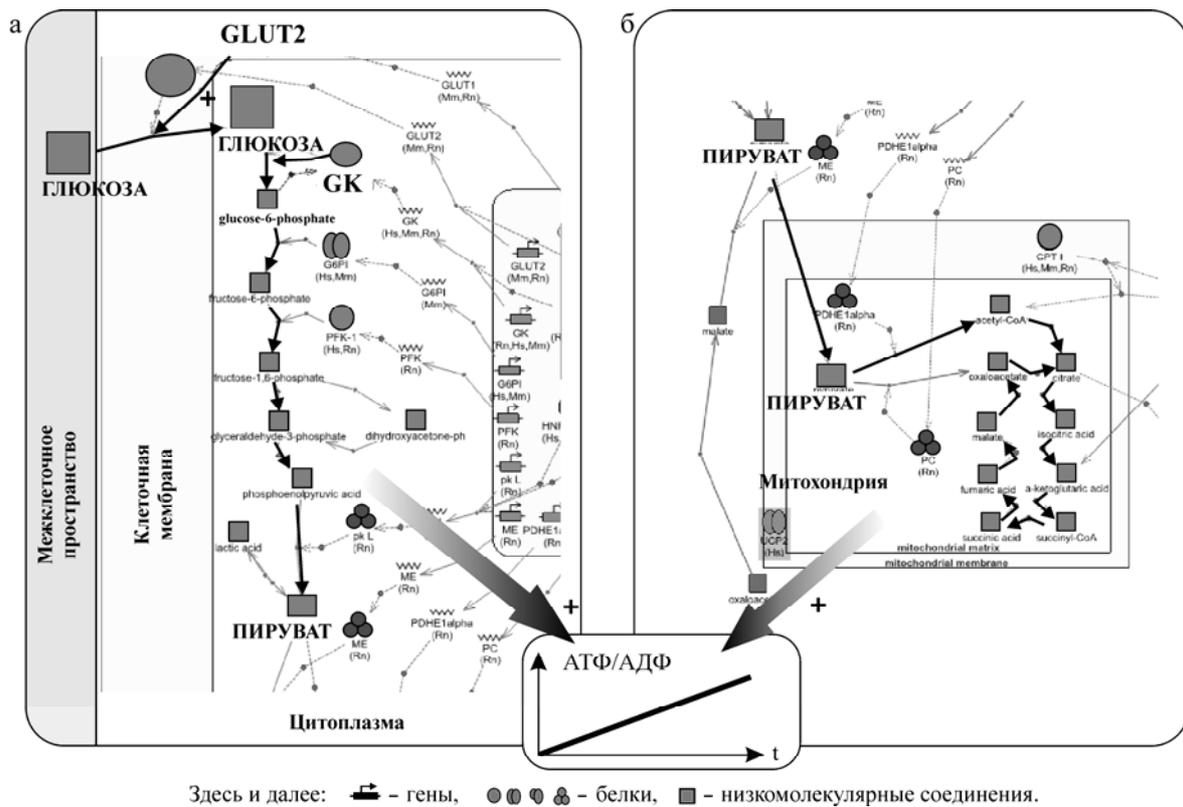
Уровень глюкозы в крови, наряду с другими ее показателями, является гомеостатируемым параметром, поскольку его изменение выше или ниже определенных пределов опасно для организма. Уровень глюкозы в крови регулируется, главным образом, соотношением инсулина и глюкагона, гормонов, продуцируемых эндокринными клетками поджелудочной железы. При этом инсулин

снижает уровень глюкозы в крови за счет активации транспорта глюкозы в мышечные, жировые и лимфоидные клетки, а также усиления утилизации глюкозы во многих тканях за счет стимуляции гликолиза. Глюкагон оказывает гипергликемическое действие, активируя распад гликогена и снижая интенсивность его синтеза.

**Генная сеть регуляции продукции инсулина  $\beta$ -клеткой поджелудочной железы.** Глюкоза – главный индуктор продукции и секреции инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы. Генная сеть, регулирующая продукцию инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой, включает следующие процессы: 1) транспорт глюкозы в клетку; 2) метаболизм глюкозы; 3) процессы секреции инсулина; 4) путь сигнальной трансдукции от рецептора инсулина. Реконструированная нами генная сеть продукции и секреции инсулина  $\beta$ -клетками содержит 27 генов, 74 белка и 27 метаболитов. Ее реконструкция осуществлена на основе аннотации экспериментальных данных, представленных в 103 публикациях. Рисунки 1–3 дают описание ряда фрагментов этой генной сети.

При повышении уровня глюкозы в крови происходит усиление транспорта глюкозы внутрь  $\beta$ -клетки и сопряженного с ним фосфорилирования с образованием глюкозо-6-фосфата (рис. 1а). Эти процессы осуществляются при участии мембранного белка GLUT2 (глюкозного транспортера 2), и GK (глюкокиназы) [4, 5]. Образование глюкозо-6-фосфата является первым этапом гликолитического пути превращения глюкозы, в ходе которого в клетке нарабатывается АТФ. Одним из конечных продуктов гликолитического пути превращения глюкозы является пируват, который транспортируется в митохондрии, где из него образуются ацетил-КоА и оксалоацетат, которые в дальнейшем метаболизируются в цикле лимонной кислоты (цикл Кребса). (рис. 1б). Метаболизм в цикле лимонной кислоты также сопряжен с синтезом АТФ.

Рост отношения содержания АТФ/АДФ в клетке блокирует калиевые каналы (рис. 2), в результате чего транспорт ионов калия во внеклеточное пространство снижается и происходит деполяризация мембраны [6]. Вслед за деполяризацией мембраны происходит



**Рис. 1.** База данных GeneNet: поступление глюкозы в  $\beta$ -клетку поджелудочной железы и ее метаболизм. а – фрагмент генной сети транспорта глюкозы в клетку и ее превращение в пируват в ходе гликолиза; б – фрагмент генной сети, контролирующей цикл лимонной кислоты.

активация кальциевых каналов, опосредующих транспорт ионов кальция в клетку [6]. Увеличение внутриклеточного содержания ионов кальция активирует секрецию инсулина, накопленного в секреторных гранулах [7].

Увеличение секреции инсулина  $\beta$ -клетками вызывает их дальнейшую активацию, поскольку инсулин выступает как аутокринный регулятор функционирования  $\beta$ -клеток [8]. Он взаимодействует со своим рецептором на мембране клетки (рис. 3), в результате чего активируется путь сигнальной трансдукции с участием киназ PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) и p38/SAPK (stress-activated protein kinase 2) [8, 9]. Вслед за активацией PI3K и p38/SAPK киназ происходит фосфорилирование транскрипционного фактора Pdx1 и его транслокация в ядро [10]. Имеются данные, что фосфорилирование Pdx1 осуществляется при участии ERK1/2 киназ [11].

Активированный Pdx-1 активирует экспрессию целой кассеты генов. Во-первых,

Pdx-1 через очень короткую петлю с положительной обратной связью активирует работу кодируемого им гена, тем самым обеспечивается амплификация исходного сигнала, поступившего на мембрану. Во-вторых, Pdx-1 усиливает транскрипцию гена инсулина, что обеспечивает поддержание его высокого уровня в секреторных гранулах и дальнейшее усиление продукции инсулина  $\beta$ -клеткой. И наконец, Pdx-1 активирует транскрипцию генов, кодирующих глюкозный транспортер 2 (*GLUT2*) и глюкокиназу (*GK*). Тем самым активируются поглощение глюкозы клеткой и первый этап ее гликолитического расщепления.

Таким образом, в  $\beta$ -клетках существуют два регуляторных контура, обеспечивающих усиление секреции инсулина в ответ на повышение уровня глюкозы в крови. Первый контур включает стимуляцию секреции инсулина, синтезированного в клетке ранее, и обеспечивает быстрый ответ. Второй контур

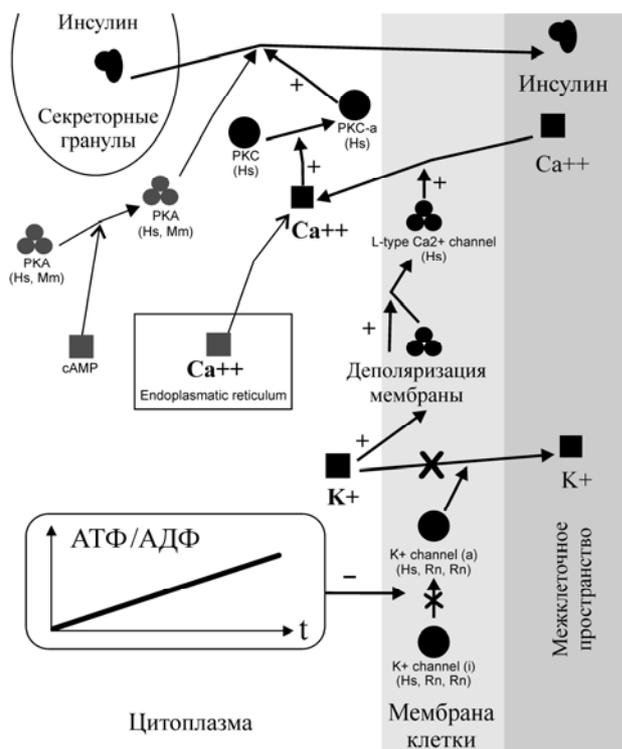


Рис. 2. База данных GeneNet: фрагмент генной сети регуляции секреции инсулина из  $\beta$ -клеток поджелудочной железы.

функционирует более медленно, поскольку он реализуется через активацию экспрессии генов (инсулина, *GLUT2*, *GK* и *Pdx-1*). Активация экспрессии этих генов обеспечивает адекватный ответ клетки при длительной нагрузке глюкозой.

Так формируется положительная обратная связь внутри  $\beta$ -клеток – чем дольше повышен уровень глюкозы в крови, тем интенсивнее экспрессируются гены, обеспечивающие секрецию инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой. Можно предполагать, что существуют и отрицательные обратные связи в клетке, которые подавляют работу этой системы при избытке инсулина. Но главный регуляторный контур, обеспечивающий адекватный уровень продукции инсулина, замыкается на уровне организма. Производимый  $\beta$ -клетками инсулин активирует поглощение глюкозы тканями и органами (главным образом жировой и мышечной тканью), за счет чего происходит снижение уровня глюкозы в крови (см. рис. 5) Таким образом, реализуется механизм отрицатель-

ной обратной связи, работающей на истощение субстрата (глюкозы). Инсулин обеспечивает закачку глюкозы в ткани и органы, концентрация его снижается и стимулирующее воздействие на  $\beta$ -клетку ослабевает.

**Генная сеть адипоцита: регулируемая утилизация глюкозы и генерация сигналов, координирующих функционирование генных сетей других процессов.** Адипоциты (клетки жировой ткани) активно участвуют во многих физиологических процессах, связанных с энергетическим метаболизмом, включая и углеводный обмен. Основной функцией адипоцита является запасание энергии в форме жиров (триацилглицеролов). Триацилглицеролы синтезируются из глицерола и насыщенных или ненасыщенных жирных кислот, например, пальмитата. Реконструированная нами генная сеть адипоцита содержит 29 генов, 48 белков и 30 метаболитов. Данные собраны на основе аннотации экспериментальных данных из 116 публикаций.

Ядро генной сети адипоцита (рис. 4) включает биосинтез жирных кислот, контролируемый следующими ферментами: ACC (acetyl-CoA-carboxylase), FAS (fatty acid synthase), ACS (acetyl-CoA synthetase), SCD1 (stearoyl-CoA desaturase 1). Чрезвычайно важным для функционирования адипоцита является процесс поглощения и утилизации глюкозы как источника энергии (рис. 4). Транспорт глюкозы в клетку происходит при участии мембранного переносчика GLUT4 (глюкозного транспортера 4). Далее глюкоза расщепляется в процессе гликолиза с образованием пирувата, который затем транспортируется в митохондрию. В митохондрии из пирувата образуется ацетил-КоА и оксалоацетат, вступающие в цикл Кребса. Цитрат, один из метаболитов, образующихся в реакциях цикла Кребса, транспортируется из митохондрии в цитоплазму. В цитоплазме цитрат снова превращается в ацетил-КоА в результате реакции, катализируемой ферментом ACL (ATP citrate-lyase). Таким образом, одним из продуктов метаболизма глюкозы в адипоцитах является ацетил-КоА, исходное соединение, из которого синтезируются жирные кислоты.

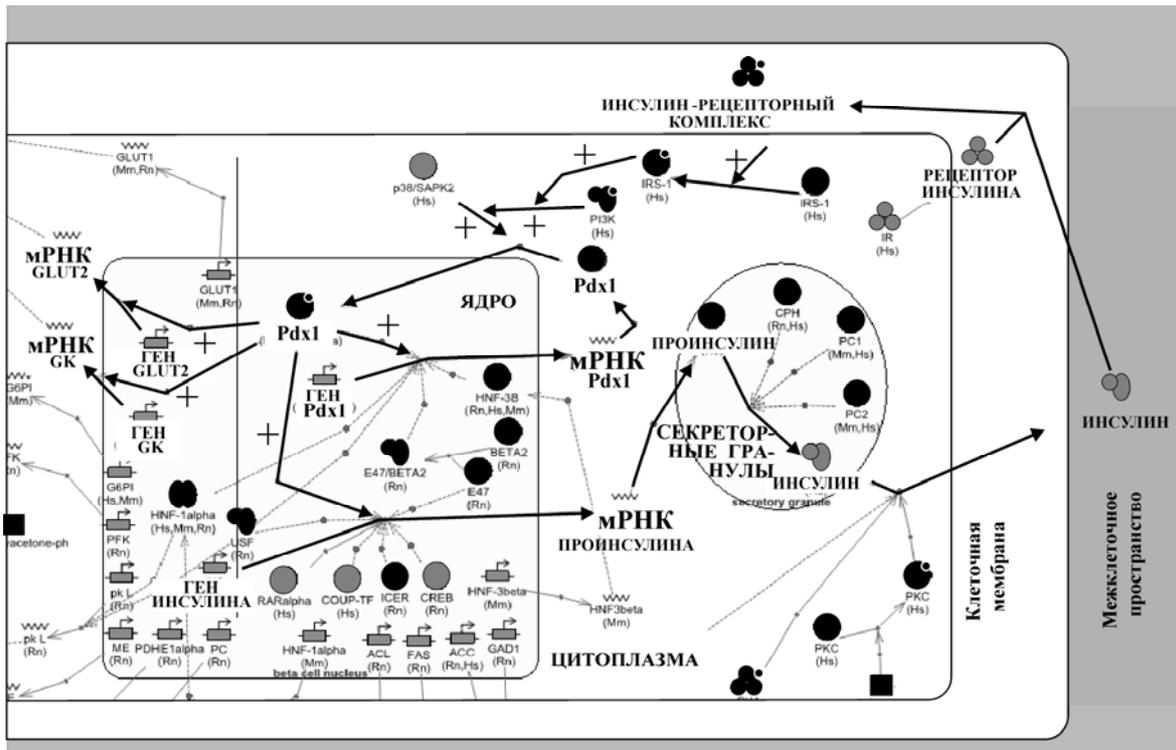


Рис. 3. База данных GeneNet: фрагмент генной сети регуляции продукции инсулина β-клеткой поджелудочной железы, отражающий путь сигнальной трансдукции от рецептора инсулина, и регуляция экспрессии гена инсулина β-клетками поджелудочной железы.

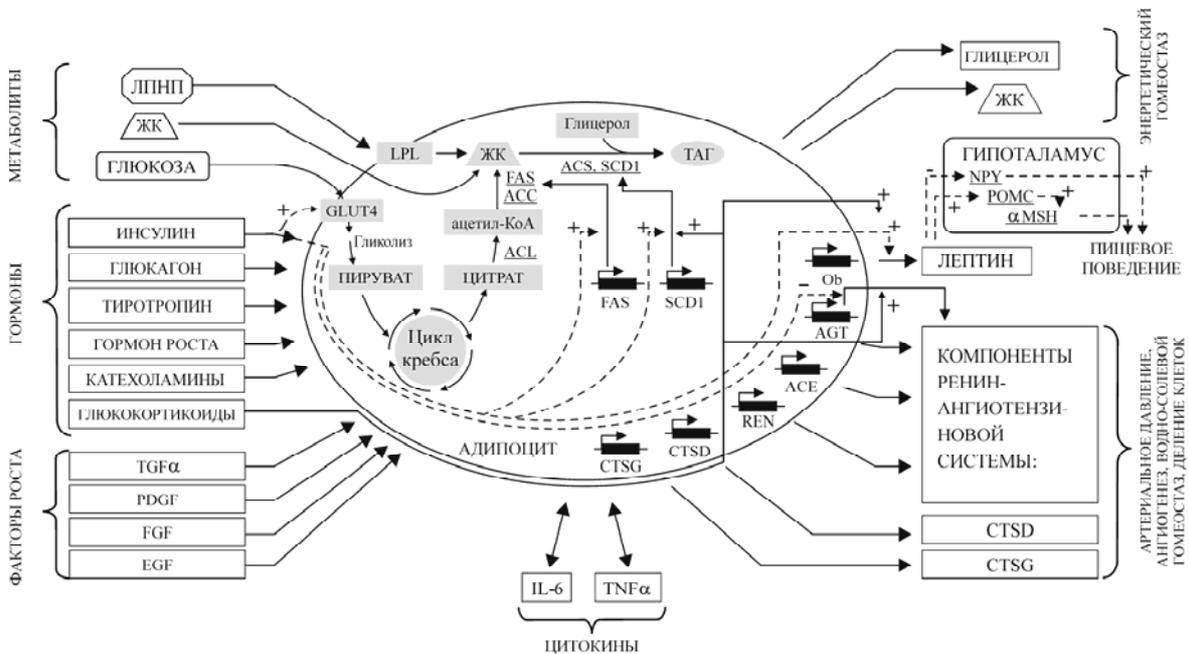


Рис. 4. Схематическое представление функций генной сети адипоцита, его регуляции внешними факторами и генерации сигналов, координирующих функционирование генных сетей других процессов. ЖК – жирные кислоты, ТАГ – триацилглицеролы (жиры), ЛПНП – липопротеины низкой плотности, LPL – мембранный белок липопротеинлипаза, GLUT4 – мембранный белок-глюкозный транспортер 4.

Следовательно, активный транспорт глюкозы в адипоциты будет способствовать накоплению в них триацилглицеролов (жиров).

Еще одной важной функцией адипоцитов является секреция целого ряда сигнальных молекул (рис. 4), таких, как цитокины (TNF $\alpha$ , IL-6), а также гормоны либо их предшественники [12]. Эндокринная функция адипоцитов реализуется через продукцию лептина и компонентов ренин-ангиотензиновой системы. Гормон лептин активно секретируется адипоцитами при избытке пищи и регулирует пищевое поведение [13]. В случае избытка пищи лептин нарабатывается в больших количествах (рис. 4). Он взаимодействует с рецепторами в аркуатных ядрах гипоталамуса, вслед за чем происходит подавление продукции нейропептида Y (NP-Y), стимулирующего поиск пищи, а также стимуляция продукции проопиомеланокортина (POMC), производное которого –  $\alpha$ MSH ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone) подавляет пищевое поведение. Таким образом, в ответ на усиление продукции лептина жировыми клетками пищевое поведение угнетается [13]. В условиях, когда потребление пищи низко (рис. 4), масса жировых клеток снижается, и продукция лептина подавляется. В этом случае происходит активация пищевого поведения, поскольку, во-первых, начинается активная продукция NP-Y, а во вторых, снимается подавляющее влияние, которое опосредуется через  $\alpha$ MSH и его рецептор.

В адипоцитах синтезируются также все компоненты ренин-ангиотензиновой системы (RAS): ангиотензиноген (AGT), ренин (Ren), ангиотензинпревращающий фактор (ACE) (рис. 4). Наряду с этими белками, адипоцит экспрессирует катепсины G и D (CTSD, CTSG), которые являются компонентами неренин-ангиотензиновой системы (NRAS) и осуществляют альтернативный путь образования ангиотензина II (Ang II), не требующий присутствия ренина [14].

Ангиотензин II является аутокринным регулятором функции адипоцитов. В частности, взаимодействуя с рецептором 1 типа на поверхности незрелых адипоцитов (преадипоцитов), ангиотензин II усиливает экспрессию циклина D1 [15]. Циклин D1 является регуляторной субъединицей G1 циклинкиназы, и усиление его экспрессии способствует проли-

ферации преадипоцитов. Интенсивность секреции ангиотензиногена (предшественник ангиотензина II) увеличивается в ходе дифференцировки преадипоцитов в зрелые адипоциты [16], а в терминально дифференцированных клетках экспрессия и секреция ангиотензиногена усиливаются при повышении уровня глюкокортикоидов [17] и жирных кислот [18]. Значение рассматриваемой аутокринной регуляции состоит в том, что зрелые адипоциты, секретируя ангиотензиноген, активируют в незрелых преадипоцитах экспрессию циклина D1, что стимулирует пролиферацию этих клеток и препятствует их терминальной дифференцировке. Благодаря этому механизму поддерживается пул незрелых адипоцитов [19].

В адипоцитах экспрессируются рецепторы цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-6), факторов роста (EGF, PDGF, FGF, TGF $\beta$ ), рецепторы таких гормонов, как тиротропина (TSH), ангиотензина II, глюкагона, инсулина, лептина, гормона роста,  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторы (рис. 4) [20]. Благодаря этому интенсивность синтеза триацилглицеролов и секреции лептина адипоцитами регулируется как метаболическими сигналами (поступлением глюкозы, либо жирных кислот), так и гуморальными влияниями. Например, глюкокортикоиды стимулируют экспрессию гена стеароил-КоА-десатуразы 1 (*SCD1*), которая участвует в синтезе ненасыщенных жирных кислот (рис. 4), гена *Ob*, кодирующего гормон лептин, регулятор пищевого поведения, гена ангиотензиногена (*AGT*), предшественника ангиотензина II. Инсулин стимулирует экспрессию генов *FAS*, осуществляющей биосинтез насыщенных жирных кислот, а также вышеупомянутых генов *SCD1*, *Ob*. Кроме того, инсулин подавляет экспрессию вышеупомянутого гена *AGT* (рис. 4). Помимо влияния на экспрессию генов в адипоците, инсулин также активизирует транслокацию глюкозного транспортера GLUT4 из цитоплазмы на клеточную мембрану [21], вследствие чего активизируется поступление глюкозы. Таким образом происходит тонкая подстройка всех функций адипоцита в зависимости от метаболического, иммунного и эндокринного статуса организма (рис. 4). Генная сеть адипоцита активно регулируется внешними сигналами, с другой стороны, и сами адипоциты секретируют большое количество сигнальных ве-

шеств, влияющих на функционирование генных сетей в других клетках организма.

**Горизонтальная и вертикальная интеграция генных сетей, регулирующих уровень глюкозы.** Рассмотрение генных сетей  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и адипоцитов показало, что они тесно интегрированы как друг с другом, так и с другими подсистемами организма (рис. 5). Базальный уровень глюкозы в крови зависит от следующих факторов: 1) потребления с пищей; 2) активируемого инсулином транспорта глюкозы в ткани и органы; 3) активируемых глюкагоном глюконеогенеза и распада гликогена в печени [22, 23]. Гормоны глюкагон и инсулин, продуцируемые  $\alpha$ - и  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, оказывают паракринные влияния: глюкагон стимулирует секрецию инсулина  $\beta$ -клетками, а инсулин, напротив, тормозит продукцию глюкагона  $\alpha$ -клетками [22].

Существует также верхний уровень регуляции, который реализуется при участии центральной нервной системы. Этот уровень регуляции обеспечивает подстройку к факторам внешней среды (социальные взаимоотношения, температура, освещенность, состав атмосферы и загрязненность и т. д.). Через цен-

тральную нервную систему возможна регуляция как пищевого поведения, так и гормонального статуса организма. Управляющее влияние центральной нервной системы на продукцию целого ряда гормонов периферическими эндокринными железами опосредуется через нейроэндокринные структуры – гипоталамус и гипофиз [24, 25]. Гормоны в свою очередь оказывают влияние как на пищевое поведение, так и на обмен веществ, за счет чего могут измениться внутренние параметры организма (температура, осмолярность и вязкость крови и т. д.). Например, повышенный уровень тиреоидных гормонов ( $T_3$  и  $T_4$ ) стимулирует катехоламинзависимый липолиз в адипоцитах [26]. Этот эффект проявляется в увеличении количества  $\beta$ -адренорецепторов и снижении активности фосфодиэстеразы [26]. Кроме того, тиреоидные гормоны повышают уровень мРНК UCP2 (uncoupling protein) как в жировой ткани, так и в скелетных мышцах человека [27].

Белок UCP имеет также название термогенин, поскольку его функция состоит в разобщении окисления и фосфорилирования в митохондриях, из-за чего энергия выделяется в форме тепла. Изменение метаболизма в



Рис. 5. Механизмы регуляции уровня глюкозы в крови.

мышечной и жировой ткани под действием тиреоидных гормонов, безусловно, отразится и на потреблении ими глюкозы. Поскольку эти две ткани составляют значительную долю массы тела, это изменение повлияет и на базальный уровень глюкозы в крови.

Можно заключить, что рассмотренные в настоящей работе фрагменты генных сетей  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и адипоцита входят в качестве подсистем в сложную интегрированную генную сеть организма, в которой уровень глюкозы в крови является одним из внутренних контролируемых параметров. Интеграция в этой сложной системе обеспечивается как горизонтальными взаимодействиями (паракринные взаимодействия  $\alpha$ - и  $\beta$ -клеток островков Лангерганса, регуляция поступления глюкозы в адипоциты инсулином), так и вертикальными взаимодействиями, обеспечивающими нервную и нейроэндокринную регуляцию метаболизма в периферических тканях. Дальнейшее последовательное описание фрагментов генных сетей, участвующих в регуляцию глюкозы в крови, позволит глубже понять механизм этого процесса и расширить круг генов-кандидатов, исследование которых важно для диагностики и отработки стратегий коррекции нарушений этой системы.

**Вертикальная интеграция генных сетей регуляции синтеза стероидных гормонов: гены всех иерархических уровней контролируются транскрипционным фактором SF1**

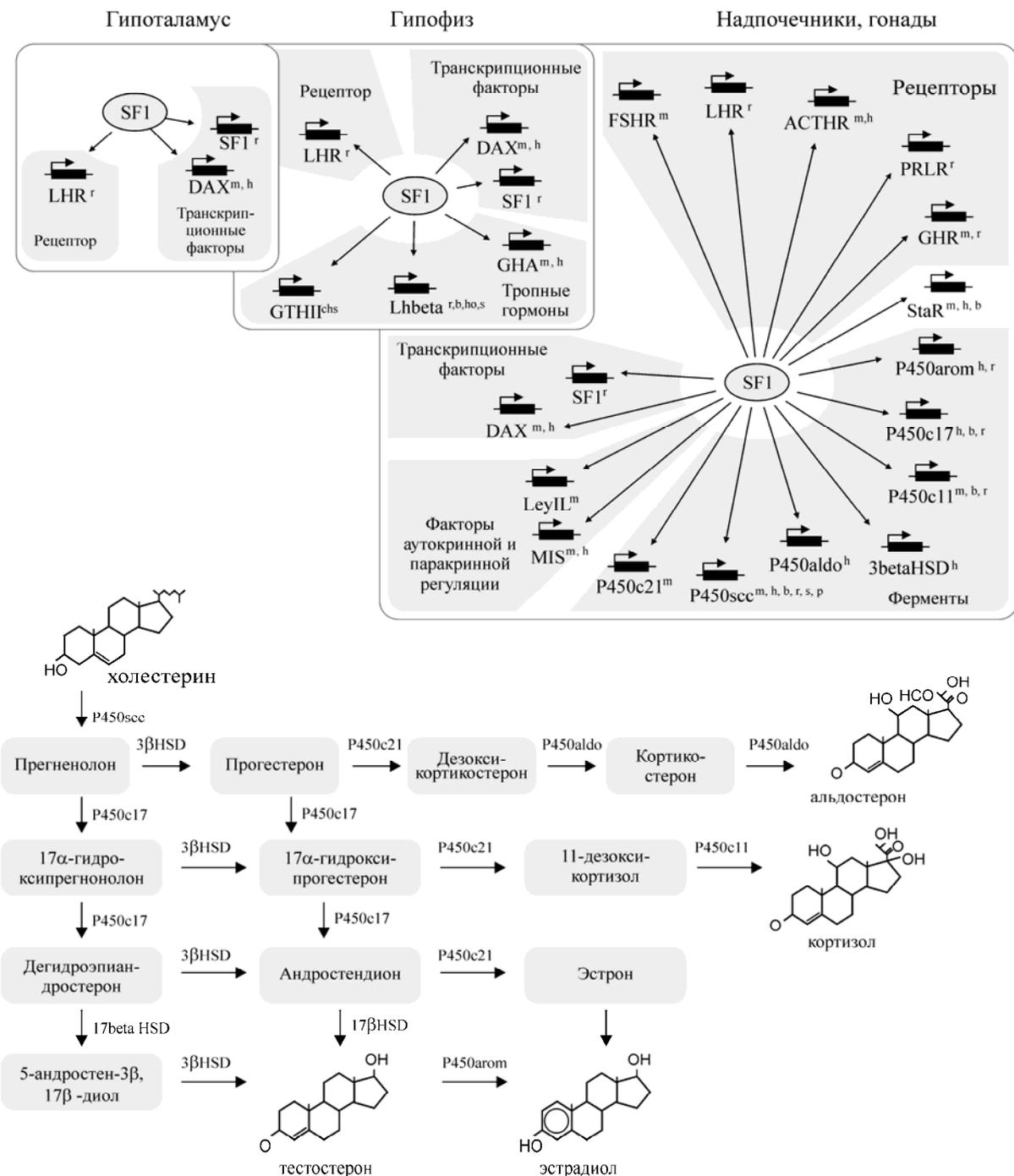
Стероидные гормоны регулируют важнейшие процессы жизнедеятельности животного организма, такие, как репродуктивная функция (прогестины, эстрогены, андрогены), стрессорный ответ (глюкокортикоиды) и поддержание водно-солевого гомеостаза (минералокортикоиды). Накоплено огромное количество данных о влиянии стероидных гормонов на метаболические процессы. Так, выше упоминались эффекты глюкокортикоидов на экспрессию генов в адипоцитах. Известно также, что глюкокортикоиды активируют гликолиз и глюконеогенез в печени, усиливают действие глюкагона и катехоламинов, снижают чувствительность периферических тканей к инсулину [25]. Тестостерон стимулирует

рост мышечной ткани, а эстрогены – синтез аполипопротеинов, участвующих в транспорте липидов [25].

Синтез стероидных гормонов у млекопитающих осуществляется преимущественно в эндокринных железах, надпочечниках и гонадах (яичниках, семенниках). Стероидные гормоны (альдостерон, кортизол, кортикостерон, тестостерон, эстрадиол) синтезируются из предшественника холестерина при участии ферментов стероидогенеза (рис. 6). Интенсивность биосинтеза стероидных гормонов в надпочечниках и гонадах регулируется гормонами гипофиза (адренкортико-тропным гормоном (АКТГ), лютеинизирующим и фолликулстимулирующим гормонами (LH и FSH). Гипофиз в свою очередь реагирует на сигналы гипоталамуса (кортикотропин-рилизинг фактор и гонадотропин-рилизинг гормон). Таким образом, генная сеть регуляции синтеза стероидных гормонов имеет три уровня иерархии (гипоталамус, гипофиз, периферические эндокринные железы). В этой генной сети условно выделяются две подсистемы: гипоталамо-гипофизарно-адреналовая и гипоталамо-гипофизарно-гонадная.

В обеих подсистемах контроля стероидогенеза для нормального функционирования клеточных структур всех трех иерархических уровней необходим один и тот же транскрипционный фактор SF1 (steroidogenic factor 1). В надпочечниках и гонадах SF1 регулирует транскрипцию генов, кодирующих ферменты пути биосинтеза стероидных гормонов, генов факторов аутокринной и паракринной регуляции, а также генов рецепторов гормонов гипофиза. В гипофизе SF1 регулирует экспрессию тропных гормонов. Известно, что в гипоталамусе SF1 регулирует экспрессию рецептора лютеинизирующего гормона (LHR), обеспечивающего отрицательную обратную связь со стороны гипофиза.

Интересно, что на всех трех уровнях иерархии SF1 регулирует свой собственный ген и ген транскрипционного фактора DAX (рис. 6). Функция SF1 не ограничивается контролем экспрессии генов у взрослых животных. SF1 необходим для нормального развития гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы в эмбриогенезе. У мышей с нарушенной экспрессией гена SF1



**Рис. 6.** Транскрипционный фактор SF1 координирует функционирование генных сетей различных иерархических уровней регуляции стероидогенеза (реконструировано по [28]).

Слева внизу представлены пути биосинтеза стероидных гормонов. Подчеркнутые названия обозначают ферменты. В обозначениях генов: h – человек, m – мышь, r – крыса, b – корова, chs – лосось, ho – лошадь, s – овца, p – свинья.

(нокаутных по *SF1*) не развиваются гонады и надпочечники, снижен уровень экспрессии генов гонадотропинов, имеются дефекты развития вентромедиального ядра гипотала-

муса. Через несколько часов после рождения мыши погибают [29, 30].

Таким образом, в генной сети стероидогенеза транскрипционный фактор SF1 выполня-



Рис. 7. Иерархическая система взаимодействия осцилляторов циркадной системы отметки времени (реконструировано по [31]).

ет двойную роль: с одной стороны, SF1 управляет формированием генной сети в онтогенезе и, с другой стороны, у взрослых животных SF1 является ключевым фактором, регулирующим экспрессию генов на всех трех иерархических уровнях регуляции стероидогенеза.

#### Генная сеть регуляции циркадного ритма – модулятор активности генных сетей организма

Большая часть физиологических функций млекопитающих подвержена суточным колебаниям, которые поддерживаются эндогенной системой отметки времени. Циркадная система отметок времени состоит из иерархически организованных генных сетей-осцилляторов. Внешний синхронизирующий сигнал – свет – через сенсор – рецепторы сетчатки глаза по ретиногипоталамическому тракту поступает в супрахиазматическое ядро (СХЯ) гипоталамуса (рис. 7).

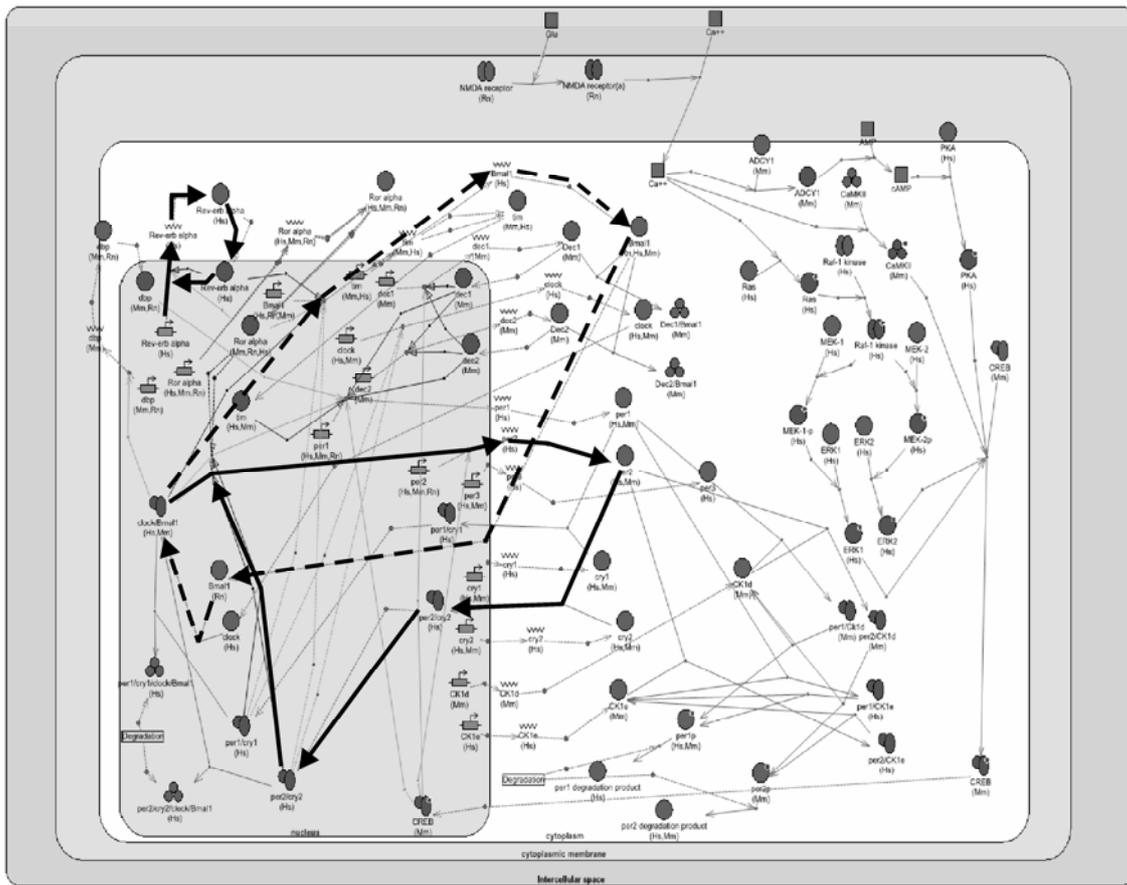
В нейронах СХЯ функционирует генная сеть водителя циркадного ритма, через периферическую нервную и эндокринную системы задающая ритм генным сетям периферических осцилляторов, расположенных в соответствующих органах [31]. Амплитуда и период колебаний генерируемого сигнала задаются не столько интенсивностью внешнего сигнала, сколько архитектурой и свойствами генной сети-осциллятора. Несмотря на существование большого числа регуляторных контуров, выявленных в ходе анализа генной сети води-

теля циркадного ритма (рис. 8), в самом простом случае устойчивое функционирование осциллятора может обеспечиваться взаимодействием всего двух контуров с обратными связями (корового и стабилизирующего).

Для воспроизведения и поддержания циркадной осцилляции необходим минимальный набор из семи групп генов: *Clock* (ген *Clock*), *Bmal*, (гены *Bmal1*, *Bmal2*), *Per* (гены *Per1*, *Per2*, *Per3*), *Cry* (гены *Cry1*, *Cr2*), *CKI* (гены *CKIε*, *CKIδ*) и гены *Rev-erba* и *Rora*.

Для функционирования коровой петли центрального осциллятора наиболее значимы негативный компонент – транскрипционный комплекс-димер *Per/Cry* и позитивный компонент *Clock/Bmal*. Уровень экспрессии генов негативного компонента, а также *Bmal* колеблется в течение суток, экспрессия *Clock* – постоянна. Во второй половине светлого времени суток происходит накопление комплекса *Per/Cry* в ядре клетки. Данный комплекс способен подавлять активность транскрипционного фактора *Clock/Bmal*, следствием чего является снижение уровня экспрессии генов, регулируемых этим фактором, и прежде всего генов, кодирующих белки *Per* и *Cry*. [32–34]. Кроме того, комплекс *Per/Cry* способен активировать транскрипцию гена *Bmal1* [35] (рис. 9).

В результате к середине темного времени суток в ядре клетки наблюдаются очень низкий уровень комплексов *Per/Cry* и высокий уровень транскрипционного фактора *Clock/Bmal1*. В таких условиях наблюдаются мак-



**Рис. 8.** База данных GeneNet: общий вид генной сети регуляции циркадного ритма в супрахиазматическом ядре млекопитающих. Приведены примеры контуров с отрицательными обратными связями, подавляющими транскрипцию генов *Rev-erba*, *Bmal1* и *Per2*.

симальная активация транскрипции генов *Per* и *Cry* и подавление транскрипции гена *Bmal1* [32–35]. В этот период суток с участием казеинкиназ SKIε, SKIδ белки *Cry* и *Per* накапливаются и удерживаются в цитоплазме [36–38]. Таким образом обеспечивается функционирование коровой петли осциллятора, определяющей амплитуду и период циркадных осцилляций [39].

Стабилизирующая петля осциллятора образована взаимодействием генов *Bmal*, *Rev-erba* и *Rora* (рис. 9). Уровень экспрессии гена *Rev-erba* может активироваться транскрипционным фактором Clock/Bmal через E-боксы, находящийся в его промоторе [40]. В свою очередь транскрипционный фактор *Rev-erba* связывается с Rev-erb/Ror элементом в промоторе гена *Bmal*, подавляя его транскрипцию

[40, 41]. С тем же Rev-erb/Ror элементом в промоторе гена *Bmal* может также связываться и транскрипционный фактор *Rora*, который в отличие от *Rev-erba*, активирует транскрипцию гена *Bmal* [42]. Транскрипционный фактор Clock/Bmal может регулировать транскрипцию гена *Rora* через E-боксы, находящийся в его промоторе [42]. Так реализуются положительная и отрицательная обратные связи, регулирующие экспрессию гена *Bmal* (рис. 9). Функционирование этого регуляторного контура дополняется тем, что транскрипция гена *Rev-erba* подавляется транскрипционным фактором *Rev-erb* и активируется фактором *Rora* [43, 44]. Данный регуляторный контур обеспечивает устойчивость и более точную настройку ритма экспрессии гена *Bmal*.

Подобного рода осцилляторы работают как

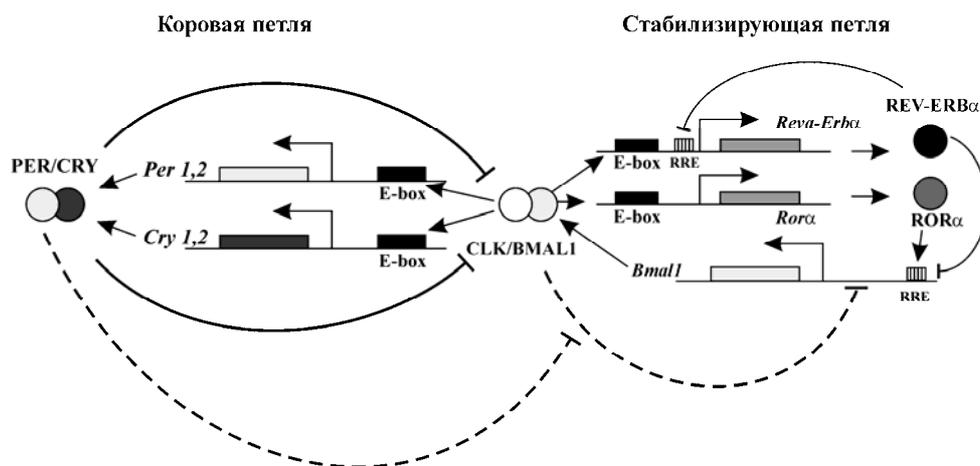


Рис. 9. Простейшая схема осциллятора, функционирующего в супрахиазматическом ядре (см. комментарии в тексте). (Реконструировано по [39]).

в супрахиазматическом ядре гипоталамуса, так и в периферических тканях [41, 45–48]. Циркадные колебания экспрессии гена *Bmal1* обеспечивают колебания транскрипционной активности транскрипционного фактора *Clock/Bmal1*, что в свою очередь может определять колебания экспрессии генов, регулируемых этим фактором. В работе К. Oishi [47] выявлено более 100 генов с очень широким спектром функций, экспрессия которых в печени изменяется ритмически на протяжении суток и зависит от уровня экспрессии *Clock/Bmal1*. В промоторных областях большинства из этих генов выявлены потенциальные сайты связывания для транскрипционного фактора *Clock/Bmal1*.

Вероятно, и для других транскрипционных факторов, образующих циркадный осциллятор, таких, как *Rev-erb $\alpha$* , *Ror $\alpha$* , *DBP*, *DEC1*, *DEC2* (рис. 8) существуют гены-мишени вне осциллятора, функционирующие в других генных сетях, в том числе и в тканеспецифичных. Мутации генов, образующих осциллятор, приводят к нарушению его функционирования и соответственно к нарушению циркадного ритма. Так, у мышей при мутации гена *Clock* обнаруживают нарушение амплитуды ритма экспрессии транскрипционных факторов осциллятора [49]. Описано наследственное нарушение фаз сна, температуры тела, связанное с мутациями гена *Per2* человека [50].

Наборы циклирующих генов существенно варьируют в различных тканях и включают,

помимо транскрипционных факторов, ферменты, транспортеры, гены, кодирующие прогормоны, белки, обеспечивающие передачу сигналов, прохождение клеточного цикла и другие функциональные группы генов, проявляющих в значительной степени тканеспецифическую экспрессию. Так, в печени выявлен свой специфический набор генов, экспрессия которых подвержена циркадным колебаниям, включающий компоненты генной сети регуляции синтеза и метаболизма холестерина, гликолиза и глюконеогенеза и др. [51].

Циркадный контроль тканеспецифичных функций и метаболических путей осуществляется путем воздействия генной сети-осциллятора на ключевые и лимитирующие звенья генных и метаболических сетей этих функций [51]. Например, в жировой ткани мыши обнаружены циркадные колебания экспрессии генов *PAI-1*, *PPAR $\gamma$ 2*, *Ob* (лептина), а в печени – *Cyp7a*, *Glut2*, *lipin1*, *Gcgr* (рецептор глюкогона), *Hmgcr* и др. [47, 51, 52] Таким образом, генная сеть-осциллятор циркадного ритма клетки вовлекает в осцилляцию ключевые компоненты других генных сетей клетки, выступая в качестве интегратора. Одновременно генная сеть-осциллятор СХЯ выступает как интегратор, организует ритмику генных и метаболических сетей нейрогуморальных механизмов. Этот центральный осциллятор задает через периферическую нервную и эндокринную системы свой ритм периферическим генным сетям-осцилляторам, которые в той или иной мере подстраиваются под него, в том

числе формируют тканеспецифическое запаздывание ритма.

Так как циркадным ритмам подвержены практически все физиологические функции и процессы, очевидно, что внешние воздействия или изменение внутренней среды организма могут также влиять на работу циркадных осцилляторов. Показано, что периферические циркадные осцилляторы легче, чем центральный подвергаются перенастройке или захватыванию такими внешними воздействиями, как двигательная активность или прием пищи. Сигналами, способствующими захватыванию циркадного осциллятора, могут выступать как гормональные, так и метаболические стимулы. В частности, увеличение содержания в среде глюкозы (в физиологических концентрациях) в культуре ткани фибробластов или клеток белого жира приводит к перенастройке работы ядра осциллятора [52]. В культуре гладкомышечных сосудистых клеток воздействие биологически активных веществ, например ангиотензина II, также может перенастраивать регуляторы суточного ритма [53].

Таким образом, генная сеть регуляции циркадного ритма представляет собой пример генной сети-интегратора. Относительно небольшое ядро сети, осциллятор, координирует ритмическую экспрессию генов, обеспечивающих разнообразные функции клеток и тканей. Единство структуры молекулярного осциллятора обнаруживается на всех иерархических уровнях организма, но на высшем уровне иерархии – в СХЯ – эта генная сеть-осциллятор воспринимает свет и через нейрогуморальные механизмы доносит внешнюю астрономическую циклику всем остальным осцилляторам нижних иерархических уровней, функция которых, кроме того, регулируется и внутренним состоянием, и потребностями организма, конкретной тканью или органом.

### Заключение

Локальные генные сети, контролируемые отдельные процессы, объединяются в глобальную сеть организма, которую можно представить как *сеть сетей*. Интеграция локальных сетей требует координации потоков вещества, энергии и информации между отдельными генными сетями. Анализ ген-

ных сетей, представленных в данной работе, выявил некоторые принципы их интеграции.

Интеграция локальных сетей в подсистему организма, контролирующую отдельную его функцию, может осуществляться как по горизонтальному, так и по вертикальному принципу. Выше в качестве примера горизонтальных взаимодействий между генными сетями были описаны эффекты гормонов (инсулина, глюкокортикоидов и др.) и метаболических сигналов на функционирование адипоцита. Примерами вертикально интегрированных генных сетей являются охарактеризованные нами выше системы, объединяющие генные сети гипоталамуса-гипофиза-надпочечников, а также гипоталамуса-гипофиза-гонад (синтез кортикостероидов и половых гормонов соответственно). Как отмечалось выше, генная сеть циркадного ритма, будучи распределенной по множеству тканей организма, представляет собой множество вертикально интегрированных генных сетей-осцилляторов. С другой стороны, поскольку вся генная сеть циркадного ритма имеет выходы на многие клеточные процессы, она как таковая представляет собой верхний управляющий элемент в системе вертикальной интеграции.

Можно отметить два типа интеграторов генных сетей. В одном случае функцию интегратора может выполнять генная сеть. Примером интегрирующей генной сети является генная сеть, контролирующая циркадный ритм. Сети-интеграторы организованы так, что они способны функционировать относительно автономно, внешние стимулы не определяют амплитуду ответа сети и типы интегрируемых сетей. Так, генная сеть регуляции циркадного ритма задает ритм функционирования огромного количества генных сетей от регуляции метаболических процессов до клеточного цикла. При этом внешние стимулы, такие, как потребление пищи, могут перезапускать циркадный ритм, т. е. начало отсчетки времени, но не оказывают влияния на период циркадных колебаний центрального осциллятора. Таким образом, одна из функций сетей-интеграторов – восприятие внешнего сигнала, обработка и передача другим (управляемым) сетям. Следует заметить, что мутации некоторых генов, входящих в сеть-интегратор, могут нару-

шить не только протекание регулируемого ею процесса, но и интеграцию подчиненных ей генных сетей и, следовательно, привести к масштабным нарушениям функционирования организма.

В другом случае интеграция генных сетей может осуществляться через метаболиты или нейрогуморальные сигналы. Отличительной особенностью этого способа интеграции является огромное разнообразие связанных генных сетей. К примеру, глюкокортикоиды, гормоны коры надпочечников, влияют на функционирование большинства органов и тканей организма.

Рассмотренные нами примеры демонстрируют, как метаболический сигнал может преобразоваться в гормональный и наоборот. Например,  $\beta$ -клетки поджелудочной железы в ответ на повышение уровня глюкозы усиливают продукцию инсулина, а адипоциты в условиях избытка пищи секретируют лептин.

Существует и еще одна возможность – гормональный сигнал одного типа может промодулировать сигнал другого типа. Иллюстрацией этой ситуации является регуляция экспрессии ангиотензиногена в адипоцитах глюкокортикоидами и инсулином. Отмеченные особенности неслучайны, поскольку нейроэндокринная система играет ключевую роль в интеграции генных сетей.

Сила воздействия внешнего сигнала в данном случае может определять амплитуду ответа и наборы интегрируемых сетей. Таким образом, интеграция генных сетей является динамическим процессом, отражающим ответ организма и его систем на внешние стимулы.

Интеграция генных сетей, распределенных в различных компартментах организма, осуществляется по иерархическому принципу. Основными особенностями иерархически интегрированных генных сетей являются (а) возможность индивидуальной настройки каждой подсети и (б) возможность адаптивной перестройки взаимоотношений между подсетями независимо на каждом иерархическом уровне, но в зависимости от заданной на высшем иерархическом уровне потребности, что, вероятно, и позволяет сложной иерархической сетевой системе гибко, быстро и адекватно реагировать на

изменение условий окружающей среды.

Ясно, что изучение и глубокое понимание процессов интеграции отдельных генных сетей, обеспечивающих координацию процессов роста и созревания в ходе онтогенеза, гомеостатирование важнейших параметров организма, а также реакцию организма на изменение параметров внутренней либо внешней среды, возможно только в рамках системной компьютерной биологии. При этом требуется: 1) развитие молекулярно-биологических баз данных, содержащих информацию о геномах, генах, РНК, белках, метаболитах и генных сетях; 2) интеграция этих ресурсов, обеспечивающая целостность данных и знаний об объектах исследования; 3) компьютерное математическое моделирование сложных биологических процессов. Весь комплекс этих подходов разрабатывается в лаборатории теоретической генетики ИЦиГ СО РАН [54–59].

### Благодарности

Авторы выражают благодарность И.В. Лоховой за библиографическую поддержку работы, Е.А. Ананько за курирование базы данных GeneNet, а также А.В. Осадчуку за плодотворное обсуждение.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 02-07-90359, 03-07-96833, 03-04-48506-а, 03-07-90181-в, 03-01-00328), Министерством промышленности науки и технологий (проект 43.073.1.1.1501), СО РАН (проект № 10.4, № 119). Заключен госконтракт с Федеральным агентством по науке и инновациям «Идентификация перспективных мишеней действия новых лекарственных препаратов на основе реконструкции генных сетей» приоритетного направления «Живые системы».

### Литература

1. Колчанов Н.А., Ананько Е.А., Колпаков Ф.А., Подколodная О.А., Игнатъева Е.В., Горячковская Т.Н., Степаненко И.Л. Генные сети // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34, № 4. С. 533–544.
2. Stepanenko I.L., Podkolodnaya O.A., Kolchanov N.A. Gene networks: principles of organization and mechanisms of operation and integration // Proc. of the Third Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and

- Structure (BGRS'2002). 2002. V. 2. P. 109–113.
3. Ananko E.A., Podkolodny N.L., Stepanenko I.L., Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A., Kolchanov N.A. GeneNet: a database on structure and functional organisation of gene networks // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30, № 1. P. 398–401.
  4. Chen L., Alam T., Johnson J.H., Hughes S., Newgard C.B., Unger R.H. Regulation of beta-cell glucose transporter gene expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87, № 11. P. 4088–4092.
  5. Matschinsky F., Liang Y., Kesavan P., Wang L., Froguel P., Velho G., Cohen D., Permutt M.A., Tanizawa Y., Jetton T.L. Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene // *J. Clin. Invest.* 1993. V. 92, № 5. P. 2092–2098.
  6. Brun T., Roche E., Assimacopoulos-Jeannet F., Corkey B.E., Kim K.H., Prentki M. Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling // *Diabetes.* 1996. V. 45, № 2. P. 190–198.
  7. Davidson H.W., Peshavaria M., Hutton J.C. Proteolytic conversion of proinsulin into insulin. Identification of a  $Ca^{2+}$ -dependent acidic endopeptidase in isolated insulin-secretory granules // *Biochem J.* 1987. V. 246, № 2. P. 279–286.
  8. Leibiger I.B., Leibiger B., Moede T., Berggren P.O. Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways // *Mol. Cell.* 1998. V. 1, № 6. P. 933–938.
  9. Wu H., MacFarlane W.M., Tadayyon M., Arch J.R., James R.F., Docherty K. Insulin stimulates pancreatic-duodenal homeobox factor-1 (PDX1) DNA-binding activity and insulin promoter activity in pancreatic beta cells // *Biochem. J.* 1999. V. 344, Pt. 3. P. 813–818.
  10. Elrick L.J., Docherty K. Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of pancreatic duodenal homeobox-1 // *Diabetes.* 2001. V. 50, N 10. P. 2244–2252.
  11. Khoo S., Griffen S.C., Xia Y., Baer R.J., German M.S., Cobb M.H. Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278, N 35. P. 32969–32677.
  12. Morrison R.F., Farmer S.R. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation // *J. Nutr.* 2000. V. 130(12). 3116S–3121S.
  13. Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D. Jr., Seeley R.J., Baskin D.G. Central nervous system control of food intake // *Nature.* 2000. V. 404, N 6778. P. 661–671.
  14. Schling P., Schafer T. Human adipose tissue cells keep tight control on the angiotensin II levels in their vicinity // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277, N 50. P. 48066–48075.
  15. Crandall D.L., Armellino D.C., Busler D.E., McHendry-Rinde B., Kral J.G. Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation // *Endocrinology.* 1999. 140. V. 1. P. 154–158.
  16. Engeli S., Negrel R., Sharma A.M. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system // *Hypertension.* 2000. V. 35, N 6. P. 1270–1277.
  17. Aubert J., Darimont C., Safonova I., Ailhaud G., Negrel R. Regulation by glucocorticoids of angiotensinogen gene expression and secretion in adipose cells // *Biochem J.* 1997. V. 328. P. 701–706.
  18. Safonova I., Aubert J., Negrel R., Ailhaud G. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells // *Biochem J.* 1997. V. 322. P. 235–239.
  19. Janke J., Engeli S., Gorzelnik K., Luft F.C., Sharma A.M. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors // *Diabetes.* 2002. V. 51, N 6. P. 1699–1707.
  20. Fruhbeck G., Gomez-Ambrosi J., Muruzabal F.J., Burrell M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001. V. 280, N 6. P. E827–E847.
  21. Calderhead D.M., Kitagawa K., Tanner L.I., Holman G.D., Lienhard G.E. Insulin regulation of the two glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265, N 23. P. 13800–13808.
  22. Drews G. *Endocrine pancreas // Comprehensive human physiology / Ed. R. Greger, U. Windhorst. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. P. 1345–1368.*
  23. Jungermann K., Barth C.A. *Energy metabolism and nutrition // Comprehensive human physiology / Ed. R. Greger, U. Windhorst. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. P. 1425–1457.*
  24. Weinbauer G.F., Nieschlag E. *Hormonal regulation of reproductive organs // Comprehensive human physiology / Ed. R. Greger, U. Windhorst. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. P. 2231–2252.*
  25. Hierholzer K., Buhler H. *Metabolism of cortical steroid hormones and their general mode of action // Comprehensive human physiology / Ed. R. Greger, U. Windhorst. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. P. 403–429.*
  26. Viguerie N., Millet L., Avizou S., Vidal H., Larrouy D., Langin D. Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. V. 87, N 2. P. 630–634.

27. Barbe P., Larrouy D., Boulanger C., Chevillotte E., Viguerie N., Thalamas C., Oliva Trastoy M., Roques M., Vidal H., Langin D. Triiodothyronine-mediated up-regulation of UCP2 and UCP3 mRNA expression in human skeletal muscle without coordinated induction of mitochondrial respiratory chain genes // *FASEB J.* 2001. V. 15, N 1. P. 13–15.
28. Бусыгина Т.В., Игнагьева Е.В., Осадчук А.В. Регуляция транскрипции генов, контролирующей биосинтез стероидных гормонов: описание в базе данных ES-TRRD // *Усп. соврем. биологии.* 2003. Т. 123, № 4. С. 364–382.
29. Shinoda K., Lei H., Yoshii H. *et al.* Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice // *Dev. Dyn.* 1995. V. 204, N 1. P. 22–29.
30. Sadovsky Y., Crawford P.A., Woodson K.G., Polish J.A., Clements M.A., Tourtellotte L.M., Simburger K., Milbrandt J. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92, N 24. P. 10939–10943.
31. Le Minh N., Damiola F., Tronche F., Schutz G., Schibler U. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators // *EMBO J.* 2001. V. 20, N 24. P. 7128–7136.
32. Hida A., Koike N., Hirose M., Hattori M., Sakaki Y., Tei H. The human and mouse *Period1* genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of *mPer1* transcription // *Genomics.* 2000. V. 65, N 3. P. 224–233.
33. Gekakis N., Staknis D., Nguyen H.B., Davis F.C., Wilsbacher L.D., King D.P., Takahashi J.S., Weitz C.J. Role of the *CLOCK* protein in the mammalian circadian mechanism // *Science.* 1998. V. 280, N 5369. P. 1564–1569.
34. Kume K., Zylka M.J., Sriram S., Shearman L.P., Weaver D.R., Jin X., Maywood E.S., Hastings M.H., Reppert S.M. *mCRY1* and *mCRY2* are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop // *Cell.* 1999. V. 98, N 2. P. 193–205.
35. Yu W., Nomura M., Ikeda M. Interactivating feedback loops within the mammalian clock: *BMAL1* is negatively autoregulated and upregulated by *CRY1*, *CRY2*, and *PER2* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 290, N 3. P. 933–941.
36. Akashi M., Tsuchiya Y., Yoshino T., Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (*CKIepsilon*) and *CKIdelta* in cultured cells // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22, N 6. P. 1693–1703.
37. Vielhaber E., Eide E., Rivers A., Gao Z.H., Virshup D.M. Nuclear entry of the circadian regulator *mPER1* is controlled by mammalian casein kinase I epsilon // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20, N 13. P. 4888–4899.
38. Eide E.J., Vielhaber E.L., Hinz W.A., Virshup D.M. The circadian regulatory proteins *BMAL1* and cryptochromes are substrates of casein kinase I epsilon // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277, N 19. P. 17248–17254.
39. Emery P., Reppert S.M. A rhythmic *Ror* // *Neuron.* 2004. V. 43, N 4. P. 443–446.
40. Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. The orphan nuclear receptor *REV-ERBalpha* controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator // *Cell.* 2002. V. 110, N 2. P. 251–260.
41. Ueda H.R., Chen W., Adachi A., Wakamatsu H., Hayashi S., Takasugi T., Nagano M., Nakahama K., Suzuki Y., Sugano S., Iino M., Shigeyoshi Y., Hashimoto S. A transcription factor response element for gene expression during circadian night // *Nature.* 2002. V. 418, N 6897. P. 534–539.
42. Sato T.K., Panda S., Miraglia L.J., Reyes T.M., Rudic R.D., McNamara P., Naik K.A., FitzGerald G.A., Kay S.A., Hogenesch J.B. A functional genomics strategy reveals *Rora* as a component of the mammalian circadian clock // *Neuron.* 2004. V. 43, N 4. P. 527–537.
43. Adelmant G., Begue A., Stehelin D., Laudet V. A functional *Rev-erb alpha* responsive element located in the human *Rev-erb alpha* promoter mediates a repressing activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93, N 8. P. 3553–3558.
44. Raspe E., Mautino G., Duval C., Fontaine C., Duez H., Barbier O., Monte D., Fruchart J., Fruchart J.C., Staels B. Transcriptional regulation of human *Rev-erbalpha* gene expression by the orphan nuclear receptor retinoic acid-related orphan receptor alpha // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277, N 51. P. 49275–49281.
45. Boivin D.B., James F.O., Wu A., Cho-Park P.F., Xiong H., Sun Z.S. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells // *Blood.* 2003, V. 102, N 12. P. 4143–4145.
46. Young M.E., Razeghi P., Taegtmeier H. Clock genes in the heart: characterization and attenuation with hypertrophy // *Circ. Res.* 2001. V. 88, N 11. P. 1142–1150.
47. Oishi K., Miyazaki K., Kadota K., Kikuno R., Nagase T., Atsumi G., Ohkura N., Azama T., Mesaki M., Yukimasa S., Kobayashi H., Iitaka C., Umehara T., Horikoshi M., Kudo T., Shimizu Y.,

- Yano M., Monden M., Machida K., Matsuda J., Horie S., Todo T., Ishida N. Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278, N 42. P. 41519–41527.
48. Yamazaki S., Numano R., Abe M., Hida A., Takahashi R., Ueda M., Block G.D., Sakaki Y., Menaker M., Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats // *Science*. 2000. V. 288, N 5466. P. 682–685.
49. Oishi K., Fukui H., Ishida N. Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 268, N 1. P. 164–171.
50. Jones C.R., Campbell S.S., Zone S.E., Cooper F., DeSano A., Murphy P.J., Jones B., Czajkowski L., Ptacek L.J. Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans // *Nat. Med.* 1999. V. 5, N 9. P. 1062–1065.
51. Panda S., Antoch M.P., Miller B.H., Su A.I., Schook A.B., Straume M., Schultz P.G., Kay S.A., Takahashi J.S., Hogenesch J.B. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock // *Cell*. 2002. V. 109, N 3. P. 307–320.
52. Hirota T., Okano T., Kokame K., Shirotani-Ikejima H., Miyata T., Fukada Y. Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 44244–44251.
53. Nonaka H., Emoto N., Ikeda K., Fukuya H., Rohman M.S., Raharjo S.B., Yagita K., Okamura H., Yokoyama M. Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells // *Circulation*. 2001. V. 104. P. 1746–1748.
54. Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Ратушный А.В., Ананько Е.А., Игнатъева Е.В., Подколodная О.А. Обобщенный химико-кинетический метод моделирования генных сетей // *Молекуляр. биология*. 2001. Т. 35, № 6. С. 1072–1079.
55. Ananko E.A., Podkolodny N.L., Stepanenko I.L., Podkolodnaya O.A., Rasskazov D.A., Miginsky D.S., Likhoshvai V.A., Ratushny A.V., Podkolodnaya N.N., Kolchanov N.A. GeneNet in 2005 // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33 P. D425–D427.
56. Ignatieva E.V., Ananko E.A., Podkolodnaya O.A., Stepanenko I.L., Khlebodarova T.M., Merkulova T.I., Pozdnyakov M.A., Proskura A.L., Grigorovich D.A., Podkolodny N.L., Naumochkin A.N., Romashchenko A.G., Kolchanov N.A. Transcription regulatory regions database (trrd): description of transcription regulation and the main capabilities of the database // *Bioinformatics of genome regulation and structure* / Ed. N. Kolchanov, R. Hofstaedt. Boston; Dordrecht; London: Kluwer Acad. Publ., 2004. P. 81–92.
57. Колчанов Н.А., Подколodная О.А., Ананько Е.А., Афонников Д.А., Вишнеvский О.В., Воробьев Д.В., Игнатъева Е.В., Левицкий В.Г., Лихошвай В.А., Омельячук Н.А., Подколodный Н.Л., Ратушный А.В. Интегрированная компьютерная система по регуляции экспрессии генов эукариот // *Молекуляр. биология*. 2004. Т. 38, № 1. С. 69–81.
58. Ivanisenko V.A., Pintus S.S., Grigorovich D.A., Kolchanov N.A. PDBSiteScan: a program for search of the active, binding and posttranslational modification sites in the 3D structures of proteins // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. W549–W554.
59. Kolchanov N.A., Podkolodny N.L., Ananko E.A., Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A., Stepanenko I.L., Merkulova T.I., Lavryushev S.V., Grigorovich D.A., Kochetov A.V., Orlova G.V., Titov I.I., Vishnevsky O.V., Orlov Yu.L., Ivanisenko V.A., Vorobiev D.G., Oschepkov D.Yu., Omel'yanchuk N.A., Pozdnyakov M.A., Afonnikov D.A., Matushkin Yu.G., Likhoshvai V.A., Ratushny A.V., Katokhin A.V., Turnaev I.I., Proskura A.L., Suslov V.V., Nedosekina E.A. GENEEXPRESS – 2002: an integrated system on gene expression regulation // *Proc. of the Third Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2002)*. V. 3. P. 232–234.
60. Ristow M., Muller-Wieland D., Pfeiffer A., Krone W., Kahn C.R. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation // *N. Engl. J. Med.* 1998. V. 339. P. 953–959.
61. Barroso I., Gurnell M., Crowley V.E., Agostini M., Schwabe J.W., Soos M.A., Maslen G.L., Williams T.D., Lewis H., Schafer A.J., Chatterjee V.K., O'Rahilly S. Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension // *Nature*. 1999. V. 402. P. 880–883.
62. Hegele R.A., Cao H., Frankowski C., Matthews S.T., Leff T. PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy // *Diabetes*. 2002. V. 51. P. 3586–3590.
63. Agarwal A.K., Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. V. 87. P. 408–411.

64. Meirhaeghe A., Fajas L., Gouilleux F., Cotel D., Helbecque N., Auwerx J., Amouyel P. A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPAR gamma 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003. V. 23. P. 289–294.
65. Stead J.D., Buard J., Todd J.A., Jeffreys A.J. Influence of allele lineage on the role of the insulin minisatellite in susceptibility to type 1 diabetes // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. P. 2929–2935.
66. Kennedy G.C., German M.S., Rutter W.J. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription // *Nat. Genet.* 1995. V. 9. P. 293–298.
67. Chan S.J., Seino S., Gruppuso P.A., Schwartz R., Steiner D.F. A mutation in the B chain coding region is associated with impaired proinsulin conversion in a family with hyperproinsulinemia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 2194–2197.
68. Karvonen M.K., Pesonen U., Heinonen P., Laakso M., Rissanen A., Naukkarinen H., Valve R., Uusitupa M.I., Koulu M. Identification of new sequence variants in the leptin gene // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998. V. 83. P. 3239–3242.
69. Hoffstedt J., Eriksson P., Mottagui-Tabar S., Arner P. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin // *Horm. Metab. Res.* 2002. V. 34. P. 355–359.
70. Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P., Soos M.A., Rau H., Wareham N.J., Sewter C.P., Digby J.E., Mohammed S.N., Hurst J.A., Cheetham C.H., Earley A.R., Barnett A.H., Prins J.B., O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans // *Nature.* 1997. V. 387. P. 903–908.
71. Nestorowicz A., Glaser B., Wilson B.A., Shyng S.L., Nichols C.G., Stanley C.A., Thornton P.S., Permutt M.A. Genetic heterogeneity in familial hyperinsulinism // *Hum. Mol. Genet.* 1998. V. 7. P. 1119–1128.
72. Hani E.H., Boutin P., Durand E., Inoue H., Permutt M.A., Velho G., Froguel P. Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians // *Diabetologia.* 1998. V. 41. P. 1511–1515.
73. Nestorowicz A., Inagaki N., Gono T., Schor K.P., Wilson B.A., Glaser B., Landau H., Stanley C.A., Thornton P.S., Seino S., Permutt M.A. A nonsense mutation in the inward rectifier potassium channel gene, Kir6.2, is associated with familial hyperinsulinism // *Diabetes.* 1997. V. 46. P. 1743–1748.
74. Toh K.L., Jones C.R., He Y., Eide E.J., Hinz W.A., Virshup D.M., Ptacek L.J., Fu Y.H. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome // *Science.* 2001. V. 291. P. 1040–1043.
75. Archer S.N., Robilliard D.L., Skene D.J., Smits M., Williams A., Arendt J., Schantz M. von. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference // *Sleep.* 2003. V. 26. P. 413–415.

## Приложение

Полиморфизмы некоторых генов из генных сетей поддержания уровня глюкозы и регуляции циркадного ритма, ассоциированные с патологическими состояниями у человека

Ген/функция белка	Позиция в гене или белке	Положение полиморфного участка в белке или гене и сопряженное с ним нарушение функции	Эффект на уровне организма	Ссылка
1	2	3	4	5
Генная сеть регуляции уровня глюкозы				
<i>PPAR<math>\gamma</math></i> / транскрипционный фактор	Pro115Gln	Сайт фосфорилирования MAP-киназами (которые индуцируются инсулином). Нарушение фосфорилирования серина в 114-й позиции	Ускорение дифференцировки адипоцитов	[60]
<i>PPAR<math>\gamma</math></i> / транскрипционный фактор	Pro467Leu, Val290Met	Лигандсвязывающий домен	Нечувствительность к инсулину, диабет 2 типа, гипертония	[61]
<i>PPAR<math>\gamma</math></i> / транскрипционный фактор	T $\rightarrow$ A 1164 Phe388Leu	Спираль 8 в лигандсвязывающем домене	Наследственная липодистрофия	[62]
<i>PPAR<math>\gamma</math></i> / транскрипционный фактор	C $\rightarrow$ T 1273 в 6 экзоне Arg425Cys	Петля между спиралями 9 и 10 в лигандсвязывающем домене	Наследственная липодистрофия	[63]
<i>PPAR<math>\gamma</math></i> / транскрипционный фактор	$\gamma$ 3 промотор C $\rightarrow$ G –681 от начала экзона A2	В сайте связывания STAT5B нарушается взаимодействие транскрипционный фактор/ДНК	Повышение уровня ЛПНП	[64]
Ген инсулина/ гормон	VNTR* примерно 363 п.о. выше стар-та транскрипции: аллель I класса (28–44 повтора) аллель II класса (44–138 повтора), ал-лель III класса (138–159 повтора)	Полиморфный район содержит сайты связывания транскрипционного фактора Ptg-1, эффективность связывания с кото-рым зависит от типа повторов	Аллель I класса – предрас-положенность к диабету I типа аллель III класса – сниже-ние частоты заболеваемо-сти диабетом I типа	[65, 66]
Ген инсулина/ гормон	CAC $\rightarrow$ GAC His10Asp	Нарушение укладки проинсулина	Гиперинсулинемия	[67]

## Продолжение

1	2	3	4	5
<i>Ob</i> /гормон лептин	Две мутации одновременно: G328A Ala110Met и C → T в 33 позиции после терминирующего кодона TGA	–	Ожирение, низкий уровень лептина	[68]
<i>Ob</i> /гормон лептин	Промотор, –2548 G/A	Изменение уровня транскрипции	У гомозигот AA уровень мРНК лептина на 60 % выше, чем у GA гетерозигот и GG гомозигот	[69]
<i>Ob</i> /гормон лептин	Делеция G в 133 кодоне	Сдвиг рамки считывания	Ожирение в раннем возрасте, низкий уровень лептина	[70]
<i>ABCC8/SUR1</i> компонент калиевых каналов	1630 G → T 3992 G → A	Нарушение сплайсинга	Наследственная гиперинсулинемия	[71]**
<i>KCNJ11/KIR6.2</i> компонент калиевых каналов	G → A Glu23Lys	–	Ассоциация с диабетом 2 типа	[72]
<i>KIR6.2 = KCNJ11</i> белок калиевых каналов	Tug12Stop codon	Остановка трансляции	Отсутствие белка KIR6.2. Мутация обнаружена у большого числа следственной гиперинсулинемией	[73]
Генная сеть регуляции циркадного ритма				
<i>Per2</i> ** регулятор транскрипции	Экзон 17 A2106G Ser662Gly	Сайт связывания казеинкиназы Iε Меньшая степень фосфорилирования приводит к формированию более стабильного белка	Синдром ускорения фазы сна	[74]
<i>Per3</i> *** регулятор транскрипции	Район белка 973-1063 а.к. Аллель 4 повтора Аллель 5 повторов	Полиморфный район содержит вероятные сайты фосфорилирования казеинкиназой Iε	Аллель 4 повтора – ассоциация с синдромом задержки фазы сна	[75]

\* VNTR (variable number tandem repeats) – варьирующее число tandemных повторов. \*\* В этой работе описано около 20 различных мутаций гена SUR1, выявленных в группе людей с наследственной гиперинсулинемией и отсутствующих в контрольной группе (200 человек). \*\*\* Белки не являются транскрипционными факторами.