

Математическая модель, связывающая Ca^{2+} -зависимый сигнальный путь с регуляцией экспрессии генов в клетках скелетной мышцы человека

**Акбердин И.Р.^{1,2,3}, Вертышев А.Ю.⁴, Пинтус С.С.^{1,5}, Попов Д.В.⁶,
Колпаков Ф.А.^{1,5}**

¹ООО «БИОСОФТ.РУ», Новосибирск, Россия

²Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

⁴ЗАО «СИТЭС-ЦЕНТР», Москва, Россия

⁵Институт вычислительных технологий СО РАН, Новосибирск, Россия

⁶Государственный научный центр Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия

Аннотация. Адаптация клеток скелетных мышц к регулярным аэробным физическим нагрузкам обеспечивается активацией в них сигнальных путей во время и после каждого упражнения, приводящей к изменению экспрессии огромного количества генов. Несмотря на существующие попытки экспериментально исследовать механизмы регуляции и передачи сигналов при адаптации мышечных клеток к физической нагрузке, количественный вклад отдельных сигнальных молекул в регуляцию экспрессии генов внутриклеточного ответа до сих пор полностью не исследован. В работе представлена разработанная на основе модульного подхода математическая модель активации Ca^{2+} -зависимого сигнального пути с последующим изменением экспрессии генов раннего и отложенного ответов на физическую нагрузку в клетках скелетных мышц человека. Численный анализ модели выявил ключевые этапы в пути передачи сигнала и показал необходимость введения в модель параметров, характеризующих синтез и созревание транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию генов отложенного ответа для адекватного воспроизведения транскриптомных данных, полученных в экспериментах с участием добровольцев.

Ключевые слова: математическая модель, скелетная мышца, физическая нагрузка, Ca^{2+} -зависимый сигнальный путь, транскриптом, РНК секвенирование, регуляция экспрессии, BioUML.

ВВЕДЕНИЕ

Скелетные мышцы составляют около 40 % от массы тела взрослого человека и вносят существенный вклад в регуляцию метаболизма на уровне всего организма. Регулярные низкоинтенсивные упражнения (аэробные или выносливостные тренировки) оказывают значимое влияние на скелетные мышцы: выражено увеличивают капиллярную и митохондриальную плотность – показатели, влияющие на транспорт O_2 и CO_2 , на обмен метаболитов между кровью и мышцей, а также на процессы окислительного фосфорилирования. Эти функциональные изменения приводят к улучшению аэробной

работоспособности на уровне скелетных мышц и организма, а также к снижению факторов риска развития сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний [1, 2].

Во время аэробной физической нагрузки в работающей мышце происходят существенные метаболические изменения, вызывающие активацию множества сигнальных молекул. Один из наиболее важных сигнальных путей, активируемых при сократительной активности, это Ca^{2+} -зависимый сигнальный путь [2]. Увеличение содержания ионов кальция (Ca^{2+}) в миоплазме, вызванное мышечными сокращениями, значимо влияет на активацию сигнальных белков (Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые киназы, кальциневрин и др.) и может быть потенциально вовлечено в регуляцию экспрессии множества генов, ответственных за адаптацию мышечных клеток к аэробным упражнениям [3].

Известно, что даже в мышце, адаптированной к регулярным упражнениям (тренированная мышца), однократная аэробная нагрузка изменяет экспрессию сотен генов [4–6]; при этом на протяжении первых часов восстановления транскриптомный профиль выражено изменяется [5–7]. Однако эти изменения могут быть связаны не только с сократительной активностью как таковой, но с действием системных факторов и циркадных ритмов. В нашем предыдущем исследовании [8], сопоставляя транскриптомные ответы в работавшей и не работавшей (контрольной) мышце, впервые удалось выделить специфический для сократительной активности транскриптомный ответ для 1-го и 4-го часов восстановления после аэробного упражнения. Было показано, что доминирующий биологический процесс, ассоциированный с этим ответом – это регуляция транскрипции, т.е. увеличение экспрессии генов, кодирующих различные транскрипционные факторы и коактиваторы. Через час после окончания нагрузки экспрессировались гены, кодирующие транскрипционные факторы, играющие важную роль в регуляции мышечного метаболизма, такие как гены семейств *NR4A*, *AP-1* и *EGR*. Тогда как на четвертом часе восстановления экспрессировался другой набор генов-регуляторов транскрипции (таких как *PPARGC1A*, *ESRRG* и *VGLL2* гены), также играющих важную роль в регуляции метаболизма мышц. Это означает, что генная экспрессия сразу после окончания сократительной активности и на более поздних этапах восстановления может регулироваться различными механизмами. Очевидно, что эти механизмы достаточно сложны, но, можно предположить, что экспрессия генов раннего и отложенного (позднего) ответов обеспечивается некоторыми общими базисными механизмами регуляции генной экспрессии.

Стоит отметить, что, несмотря на современные достижения в развитии высокопроизводительных экспериментальных технологий и генерации разнообразных, гетерогенных омиксных данных, полученных на клетках скелетных мышц человека до и после физических нагрузок [4–8], целостное представление и детальное понимание взаимоотношений между сигнальными, метаболическими путями и процессами генетической регуляции в работающей мышечной клетке отсутствует. Метод математического моделирования представляет собой комплементарный экспериментальным методам подход для исследования молекулярных механизмов и сигнальных путей, лежащих в основе адаптации клеток скелетных мышц человека к аэробным физическим нагрузкам, на количественном уровне [9–11].

Для исследования механизмов регуляции двух наблюдаемых паттернов экспрессии генов в ответ на аэробную нагрузку мы разработали математическую модель, которая описывает последовательную активацию Ca^{2+} -зависимого сигнального пути и экспрессии генов раннего и отложенного ответов (1-ый и 4-ый часы после окончания физического упражнения, соответственно) в клетке скелетных мышц человека, на основе модульного подхода [12]. В качестве генов, моделирующих ранний и отложенный ответы, мы рассмотрели хорошо изученные гены *NR4A2*, *NR4A3* и *PPARGC1A*, соответственно. Известно, что белковые продукты этих генов являются важными

регуляторами митохондриального биогенеза и углеводно-жирового обмена [13–16], а Ca^{2+} -зависимый сигнальный путь за счет активации CREB1, CREB-связанных транскрипционных факторов и коактиваторов играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов *NR4A2*, *NR4A3* и *PPARGC1A* [17–20]. Численный анализ модели показывает, что для адекватного воспроизведения экспериментально наблюдаемых изменений экспрессии генов раннего и отложенного ответов, необходимо учитывать синтез и созревание транскрипционных факторов, регулирующих транскрипцию генов отложенного ответа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Транскриптомные данные

Для валидации разработанной нами модели, описывающей уровень экспрессии генов (выраженный в FPKM, Fragments Per Kilobase Million) и ее изменение на 1-м и 4-м часах после упражнения, были использованы собственные данные по специфическому для сократительной активности транскриптомному ответу в скелетной мышце человека, адаптированного к регулярным аэробным физическим нагрузкам [8]. Кратко, 7 молодых нетренированных мужчин участвовали в аэробной тренировке на велоэргометре (8 недель, 5 раз/неделю, 1 час/день). Через 48 часов после последней физической нагрузки они выполняли упражнение разгибание одной ноги в коленном суставе в течение 1 часа. Пробы мышечной ткани были взяты из наружной головки четырехглавой мышцы бедра работавшей и неработавшей контралатеральной (контрольной) ноги до, через 1 и 4 часа после упражнения. Специфический для сократительной активности генный ответ оценивался как разница в генной экспрессии между работавшей и неработавшей мышцей с помощью метода РНК-секвенирования. До упражнения различий в экспрессии генов между мышцами обнаружено не было.

Определение концентрации белков в мышечной клетке

Для определения начальной концентрации белков исследуемого Ca^{2+} -зависимого сигнального пути были использованы экспериментальные данные, полученные на мышечных клетках, или значения концентраций, опубликованные в более ранних математических моделях для скелетных мышц и кардиомиоцитов [21–23]. Определение концентрации белков, для которых не удалось найти количественные значения в литературе, проводилось на основе данных протеомного масс-спектрометрического исследования Мурджиа с соавторами [24]. В работе [24], данные были нормированы относительно актина (белок ACTA1), поэтому сначала на основе данных для клеток скелетных мышц кролика и человека [25–27] была определена усредненная концентрация актина в мышцах. Как было показано ранее, концентрация актина практически не зависит от типа мышечных волокон [28], поэтому ее можно использовать как референс для оценки концентрации белка в различных волокнах.

Для расчета относительной молярной концентрации белков Ca^{2+} -зависимого сигнального пути использовали значение величины iBAQ (intensity-based absolute quantification), полученной в масс-спектрометрических протеомных исследованиях [24] и нормированное на содержание актина, тогда как весовую концентрацию рассчитывали с учетом молекулярной массы соответствующих протеинов (см. таблицу SM1 в дополнительных материалах к статье).

На основании данных о значимой корреляции между экспрессией множества белков и их мРНК в тканях человека [29–32] для низкопредставленных белков (например, SAMKKII, PGC1 α , NR4A2), концентрация которых не была определена в масс-спектрометрических исследованиях [24], содержание белка рассчитывали на основании транскриптомных данных по уровню экспрессии (FPKM) соответствующей мРНК,

нормированному на экспрессию актина. Правомерность такого подхода была подтверждена при сопоставлении расчетных значений концентрации белков-субъединиц АМРК с данными по концентрации этих субъединиц, полученными с помощью масс-спектрометрии [24].

Разработка математической модели Ca^{2+} -зависимого сигнального пути

Реконструкцию Ca^{2+} -зависимого сигнального пути совместно с молекулярными механизмами регуляции транскрипции генов раннего и отложенного ответов на физическую нагрузку (рис. 1) в рамках стандарта SBGN [33] и построение соответствующей математической модели проводили в пакете программ BioUML [12]. Молекулярно-генетические процессы исследуемой системы распределены в двух клеточных компартментах: путь передачи сигнала, процессы трансляции и посттрансляционных изменений белка, кодируемого обобщенным геном раннего ответа, представлены в цитоплазме, тогда как процессы генетической регуляции – в ядре. Математическая модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ). Реконструированная сеть Ca^{2+} -зависимого сигнального пути включает 25 биологических молекул (мРНК, белки и низкомолекулярные соединения), представляющих вершины графа взаимодействий (таблица 1); а математическая модель состоит из 14 ОДУ, в основе которых были использованы механизмы моно- и бимолекулярных реакций для пути передачи сигнала, а также обобщенные функции Хилла – для процессов регуляции транскрипции генов [34].

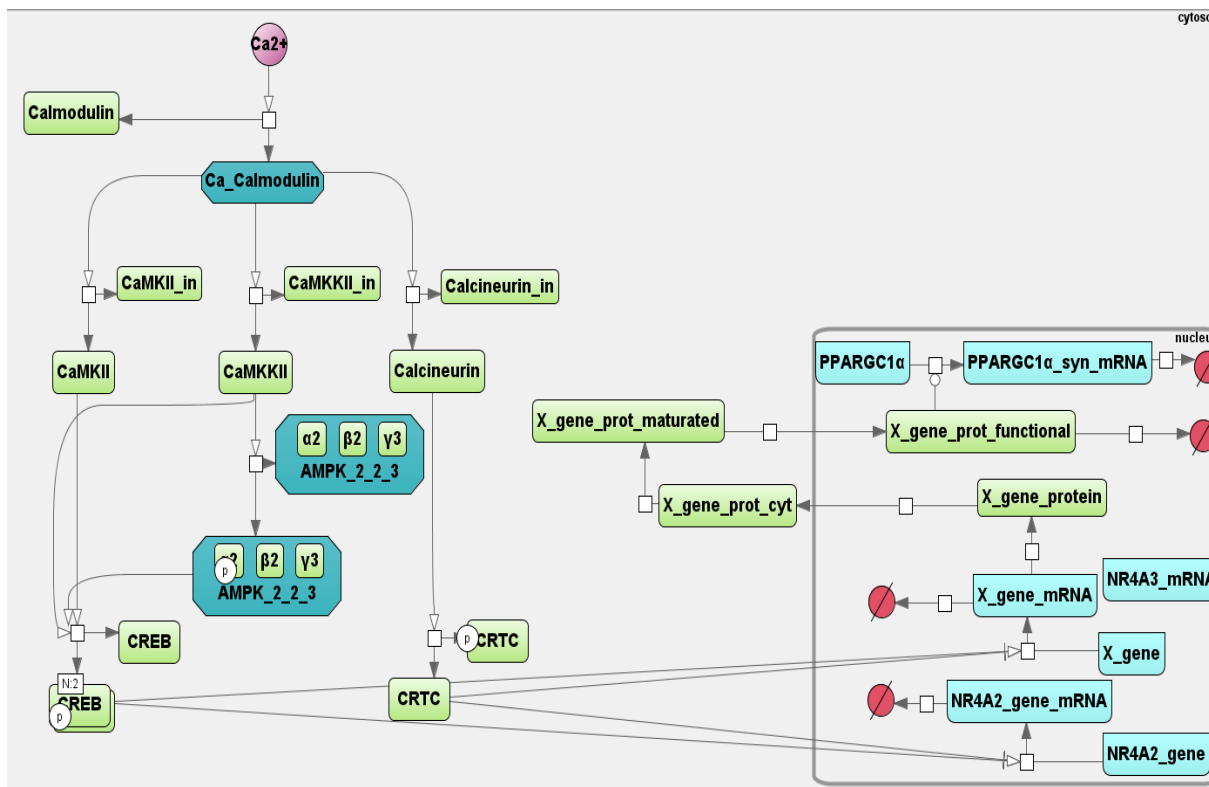


Рис. 1. SBGN диаграмма Ca^{2+} -зависимого сигнального пути, который приводит к активации экспрессии генов раннего (гены семейства *NR4A*) и отложенного (ген *PPARGC1A*) ответов в процессе адаптации мышечных клеток к физической нагрузке. Диаграмма реконструирована в пакете программ BioUML [12] и представляет сигнальный каскад в цитоплазме, тогда как процессы генетической регуляции экспрессии генов описаны в ядре мышечной клетки; *X_gene* – ген раннего ответа, кодирующий промежуточный фактор X, необходимый для активации транскрипции *PPARGC1A*.

Таблица 1. Список реакций в моделируемой системе передачи сигнала и регуляции экспрессии генов раннего (ERG) и отложенного ответов, а также уравнений их скоростей. Концентрации соответствующих веществ обозначены наклонным шрифтом.

| Наименование реакции | Химические уравнения и уравнения скоростей реакций |
|--|---|
| Формирование комплекса Ca ²⁺ -кальмодулин | $\text{CaM} + \text{Ca}^{2+} \xrightleftharpoons[K_{\text{CaCaM}_{\text{diss}}}]^{K_{\text{CaCaM}_{\text{assoc}}}} \text{CaCaM}$ $V_{\text{CaCaM}_{\text{forward}}} = K_{\text{CaCaM}_{\text{assoc}}} \cdot \text{Ca} \cdot \text{CaM}$ $V_{\text{CaCaM}_{\text{backward}}} = K_{\text{CaCaM}_{\text{diss}}} \cdot \text{CaCaM}$ |
| Активация CaMKII | $\text{CaMKII} + \text{CaCaM} \xrightleftharpoons[K_{\text{CaMKII}^* \text{toCaMKII}}]^{K_{\text{CaMKII}_{\text{toCaMKII}}}} \text{CaMKII}^*$ $V_{\text{CaMKII}^* \text{ forward}} = K_{\text{CaMKII}_{\text{toCaMKII}}} \cdot \text{CaMKII} \cdot \text{CaCaM}$ $V_{\text{CaMKII}^* \text{ backward}} = K_{\text{CaMKII}^* \text{toCaMKII}} \cdot \text{CaMKII}^*$ |
| Активация CaMKKII | $\text{CaMKKII} + \text{CaCaM} \xrightleftharpoons[K_{\text{CaMKKII}^* \text{toCaMKKII}}]^{K_{\text{CaMKKII}_{\text{toCaMKKII}}}} \text{CaMKKII}^*$ $V_{\text{CaMKKII}^* \text{ forward}} = K_{\text{CaMKKII}_{\text{toCaMKKII}}} \cdot \text{CaMKKII} \cdot \text{CaCaM}$ $V_{\text{CaMKKII}^* \text{ backward}} = K_{\text{CaMKKII}^* \text{toCaMKKII}} \cdot \text{CaMKKII}^*$ |
| Активация CaN | $\text{CaN} + \text{CaCaM} \xrightleftharpoons[K_{\text{CaN}^* \text{toCaN}}]^{K_{\text{CaN}_{\text{toCaN}}}} \text{CaN}^*$ $V_{\text{CaN}^* \text{ forward}} = K_{\text{CaN}_{\text{toCaN}}} \cdot \text{CaN} \cdot \text{CaCaM}$ $V_{\text{CaN}^* \text{ backward}} = K_{\text{CaN}^* \text{toCaN}} \cdot \text{CaN}^*$ |
| Фосфорилирование AMPK | $\text{AMPK} + \text{CaMKKII}^* \xrightleftharpoons[K_{\text{AMPK}^* \text{toAMPK}}]^{K_{\text{AMPK}_{\text{toAMPK}}}} \text{AMPK}^*$ $V_{\text{AMPK}^* \text{ forward}} = K_{\text{AMPK}_{\text{toAMPK}}} \cdot \text{AMPK} \cdot \text{CaMKKII}^*$ $V_{\text{AMPK}^* \text{ backward}} = K_{\text{AMPK}^* \text{toAMPK}} \cdot \text{AMPK}^*$ |
| Фосфорилирование CREB | $\text{CREB} + \text{CaMKII}^* + \text{CaMKKII}^* + \text{AMPK}^* \xrightleftharpoons[K_{\text{CREB}^* \text{toCREB}}]^{K_{\text{CREB}_{\text{toCREB}}}} \text{CREB}^*$ $V_{\text{CREB}^* \text{ forward}} = K_{\text{CREB}_{\text{toCREB}}} \cdot \text{CREB} \cdot \text{CaMKII}^* \cdot \text{CaMKKII}^* \cdot \text{AMPK}^*$ $V_{\text{CREB}^* \text{ backward}} = K_{\text{CREB}^* \text{toCREB}} \cdot \text{CREB}^*$ |
| Дефосфорилирование CRTC* | $\text{CRTC} + \text{CaN}^* \xrightleftharpoons[K_{\text{CRTC}^* \text{toCRTC}}]^{K_{\text{CRTC}_{\text{toCRTC}}}} \text{CRTC}^*$ $V_{\text{CRTC}^* \text{ forward}} = K_{\text{CRTC}_{\text{toCRTC}}} \cdot \text{CRTC} \cdot \text{CaN}^*$ $V_{\text{CRTC}^* \text{ backward}} = K_{\text{CRTC}^* \text{toCRTC}} \cdot \text{CRTC}^*$ |
| Транскрипция генов группы NR4A | $\odot \xrightarrow{\text{CREB}^* \cdot \text{CRTC}^*} \text{NR4A, mRNA}$ $V_{\text{mRNA}_{\text{NR4A2}}} = \frac{K_{\text{NR4A2}_{\text{basal}}} + \left(\frac{\text{CREB}^*}{K_{\text{NR4A2}_{\text{CREB}}}} \right)^h + W_{\text{NR4A2}_{\text{CREB}^* \cdot \text{CRTC}^*}} \cdot \left(\frac{\text{CREB}^*}{K_{\text{NR4A2}_{\text{CREB}}}} \right)^h \cdot \left(\frac{\text{CRTC}^*}{K_{\text{NR4A2}_{\text{CRTC}}}} \right)^h}{1 + \left(\frac{\text{CREB}^*}{K_{\text{NR4A2}_{\text{CREB}}}} \right)^h + W_{\text{NR4A2}_{\text{CREB}^* \cdot \text{CRTC}^*}} \cdot \left(\frac{\text{CREB}^*}{K_{\text{NR4A2}_{\text{CREB}}}} \right)^h \cdot \left(\frac{\text{CRTC}^*}{K_{\text{NR4A2}_{\text{CRTC}}}} \right)^h} \cdot \left(\frac{\text{CREB}^*}{K_{\text{NR4A2}_{\text{CREB}_1}}} \right)^h$ $V_{\text{mRNA}_{\text{NR4A3}}} = K_{\text{NR4A3}_{\text{basal}}} + \text{NR4A2}_{\text{mRNA}} (t - \tau)$ |
| Дегградация мРНК NR4A | $\text{NR4A}_{\text{mRNA}} \xrightarrow{K_{\text{deg NR4A}_{\text{mRNA}}}} \odot$ $V_{\text{mRNA}_{\text{degNR4A2}}} = K_{\text{deg NR4A2}_{\text{mRNA}}} \cdot \text{NR4A2}_{\text{mRNA}}$ $V_{\text{mRNA}_{\text{degNR4A3}}} = K_{\text{deg NR4A3}_{\text{mRNA}}} \cdot \text{NR4A3}_{\text{mRNA}}$ |

| Наименование реакции | Химические уравнения и уравнения скоростей реакций |
|--|--|
| Транскрипция ERG | $\odot \xrightarrow{CREB^*, CRTC^*} ERG, mRNA$ $V_{mRNA_{synERG}} = \frac{K_{ERG_{basal}} + \left(\frac{CREB^*}{K_{ERG_{CREB^*}}}\right)^h + w_{ERG_{CREB^*, CRTC^*}} \cdot \left(\frac{CREB^*}{K_{ERG_{CREB^*}}}\right)^h \cdot \left(\frac{CRTC^*}{K_{ERG_{CRTC^*}}}\right)^{h_1} \cdot \left(\frac{CREB^*}{K_{ERG_{CREB^*_1}}}\right)^h}{1 + \left(\frac{CREB^*}{K_{ERG_{CREB^*}}}\right)^h + w_{ERG_{CREB^*, CRTC^*}} \cdot \left(\frac{CREB^*}{K_{ERG_{CREB^*}}}\right)^h \cdot \left(\frac{CRTC^*}{K_{ERG_{CRTC^*}}}\right)^{h_1} + 1 + \left(\frac{CREB^*}{K_{ERG_{CREB^*_1}}}\right)^h}$ |
| Деграция мРНК ERG | $ERG, mRNA \xrightarrow{K_{deg_{ERG, mRNA}}} \odot$ $V_{mRNA_{degERG}} = K_{deg_{ERG, mRNA}} \cdot ERG_{mRNA}$ |
| Посттранскрипционные модификации мРНК ERG | $ERG, mRNA \xrightarrow{K_{matur_{ERG^*, mRNA}}} ERG^*, mRNA$ $V_{mRNA_{maturERG}} = K_{matur_{ERG^*, mRNA}} \cdot ERG_{mRNA}$ |
| Транспорт синтезированной мРНК ERG из ядра в цитоплазму | $ERG^*, mRNA \xrightarrow{K_{transport_{ERG^*, mRNA}}} ERG^*, mRNA$ $V_{mRNA_{transportERG^*}} = K_{transport_{ERG^*, mRNA}} \cdot ERG^*_{mRNA}$ |
| Трансляция и созревание белка ERG в цитоплазме | $ERG^*, mRNA \xrightarrow{K_{translation_{ERG, protein}}} ERG, protein$ $V_{prot_{translationERG}} = K_{translation_{ERG, protein}} \cdot ERG^*_{mRNA}$ |
| Транспорт зрелого белкового комплекса ERG из цитоплазмы в ядро | $ERG, protein \xrightarrow{K_{transport_{ERG, protein}}} ERG^*, protein$ $V_{prot_{transportERG}} = K_{transport_{ERG, protein}} \cdot ERG_{protein}$ |
| Деграция белкового комплекса ERG | $ERG^*, protein \xrightarrow{K_{deg_{ERG^*, protein}}} \odot$ $V_{prot_{degERG^*}} = K_{deg_{ERG^*, protein}} \cdot ERG^*_{protein}$ |
| Транскрипция PGC-1 α | $\odot \xrightarrow{ERG^*, protein} PPARGC1\alpha, mRNA$ $V_{mRNA_{synPPARGC1\alpha}} = \frac{K_{PPARGC1\alpha_{basal}} + \left(\frac{ERG^*_{protein}}{K_{PPARGC1\alpha_{ERG^*}}}\right)^{h_2}}{1 + \left(\frac{ERG^*_{protein}}{K_{PPARGC1\alpha_{ERG^*}}}\right)^{h_2}}$ |
| Деграция PGC-1 α мРНК | $PPARGC1\alpha, mRNA \xrightarrow{K_{deg_{PGC1\alpha, mRNA}}} \odot$ $V_{mRNA_{degPPARGC1\alpha}} = K_{deg_{PPARGC1\alpha, mRNA}} \cdot PPARGC1\alpha_{mRNA}$ |

* – активная форма или состояние белка

Параметры модели

Значения и размерности практически всех кинетических параметров модели были взяты из ранее опубликованных экспериментальных данных и математических моделей,

описывающих различные аспекты Ca^{2+} -зависимого сигнального пути (см. таблицу SM2 в дополнительных материалах к статье) [21–23, 35]. Значения остальных параметров были получены в процессе ручной адаптации модели к имеющимся экспериментальным данными по транскрипционной активности генов раннего и отложенного ответов: времени выхода на максимальный уровень транскрипции, максимальное значение FPKM до и после физической нагрузки, а также – времени, необходимого для возврата к базальному уровню транскрипции после физического упражнения [8].

Метод расчета модели

Численные решения разработанной динамической модели, представленной в виде системы обыкновенных дифференциальных уравнений, были получены на основе метода VODE [36], реализованного в пакете программ BioUML [12]. Для количественного воспроизведения динамики передачи сигнала и опосредованной активации экспрессии генов раннего и отложенного ответов была использована усредненная экспериментальная оценка пятикратного увеличения концентрации Ca^{2+} при переходе мышцы из состояния покоя к сократительной активности [37–39].

Анализ чувствительности модели

Анализ чувствительности разработанной модели к изменению констант скоростей реакций передачи Ca^{2+} -зависимого сигнала и процессов регуляции транскрипции даёт возможность оценить, насколько сильно равновесные концентрации веществ или стационарные значения переменных модели зависят от изменений того или иного параметра. Анализ чувствительности проводили на основе алгоритма локального поиска, реализованного в BioUML, с настройками по умолчанию [40]. В рамках этого подхода чувствительность рассчитывается для системы дифференциальных уравнений:

$$\frac{dc}{dt} = F(c, \alpha, t), \quad c(0) = c^0 \quad (1)$$

где c – вектор переменных модели (концентраций исследуемых веществ), α – вектор параметров модели (который может также включать начальные значения переменных c^0). Локальная ненормированная чувствительность $\frac{\partial c}{\partial \alpha_j}$ рассчитывается на основе аппроксимации:

$$\frac{\partial c}{\partial \alpha_j} = \frac{c_{ss}(\alpha_j + \Delta\alpha_j) - c_{ss}(\alpha_j)}{\Delta\alpha_j} \quad (2)$$

где $c_{ss}(\alpha_j)$ и $c_{ss}(\alpha_j + \Delta\alpha_j)$ соответствуют решениям алгебраических систем уравнений $F(c, \alpha_j) = 0$ и $F(c, \alpha_j + \Delta\alpha_j) = 0$, соответственно. В свою очередь, нормированная чувствительность рассчитывается на основе умножения каждого компонента $\frac{\partial c^k}{\partial \alpha_j}$

вектора $\frac{\partial c}{\partial \alpha_j}$ на нормировочный фактор $\frac{\alpha_j}{c_{ss}^k(\alpha_j)}$ [40].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Реконструкция сигнального пути и соответствующей математической модели

Схематическое представление Ca^{2+} -зависимого сигнального пути с последующей регуляцией экспрессии генов раннего и отложенного ответов в клетках скелетных мышц приведено на рисунке 2. Резкое изменение миоплазматической концентрации кальция

при сократительной активности приводит к связыванию ионов Ca^{2+} с кальмодулином (CaM). Формируемые комплексы Ca^{2+} -CaM стимулируют образование активных форм Ca^{2+} -кальмодулин-зависимых протеинкиназ II (CaMKII), CaMK киназ II (CaMKKII) и кальциневрина (кальций-зависимой серин/треонин-фосфатазы, CaN) [3, 41, 42]. Активация CaMKKII приводит к увеличению уровня фосфорилирования АМФ-зависимой протеинкиназы (АМПК) [41, 42], которая играет одну из ключевых ролей в регуляции внутриклеточного метаболизма скелетных мышц. В дополнение к этому, активность CaMKII, индуцируемая при сократительной активности, приводит к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB1 (cAMP response element-binding protein 1), тогда как CREB-регулируемый транскрипционный коактиватор 1, CRTC дефосфорилируется и активируется функционально активным CaN [43–45].

Как было показано ранее [8, 19, 46–48], уровни экспрессии генов *NR4A2*, *NR4A3* резко повышаются в первый час после аэробной физической нагрузки в результате активации Ca^{2+} /CaN-зависимых сигнальных путей. Функции этих генов связаны с увеличением массы и васкуляризации мышечной ткани, с регуляцией гликолиза, окислительного фосфорилирования и аутофагии.

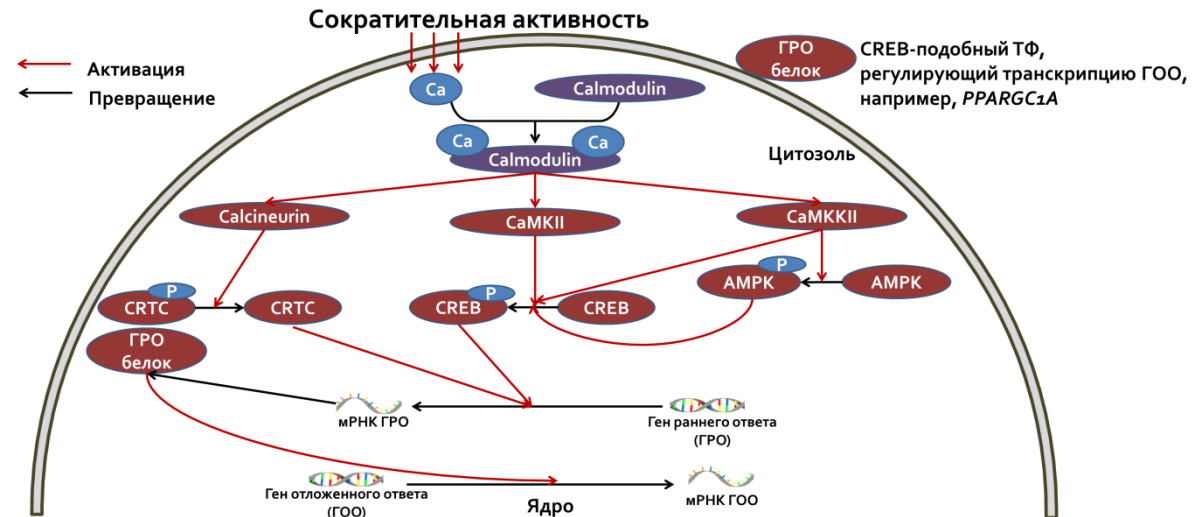


Рис. 2. Упрощенная схема Ca^{2+} -зависимого сигнального пути, активируемого при сократительной активности мышц. Сигнальный путь, в конечном счете, приводит к повышению уровня экспрессии генов раннего (ГРО) и отложенного ответов (ГОО), кодирующих белки различных регуляторов транскрипции (например, *NR4A2*, *NR4A3* и *PPARGC1A*), которые, в свою очередь, координируют экспрессию большого количества различных генов.

Известно, что CREB1 (и, по-видимому, другие CREB-подобные транскрипционные факторы) и его коактиватор CRTC играют важную роль в регуляции экспрессии гена *PPARGC1A* с канонического (проксимального) и с индуцибельного (дистального) промотора гена [45]. Хорошо известно, что в скелетных мышцах человека в ответ на однократную нагрузку экспрессия гена *PPARGC1A* происходит с задержкой (рис. 3): максимум транскрипционной активности достигается лишь на ~3–5 часах восстановления [8]. Поэтому, мы предположили существование промежуточного фактора, регулирующего транскрипцию *PPARGC1A*, при активации Ca^{2+} -зависимого сигнального пути, за счет увеличения экспрессии одного из генов раннего ответа, ГРО (рис. 1, 2). Анализ транскриптомных данных по специфическому для сократительной активности генному ответу [8] показал, что в качестве потенциального промежуточного активатора ГРО могут выступать CREB-подобные белки, а также белки семейств FOS и JUN. Более того, CREB1 может связываться с ДНК и регулировать экспрессию целевых генов в виде гомо- и гетеродимерного комплекса с белками этих семейств [49, 50].

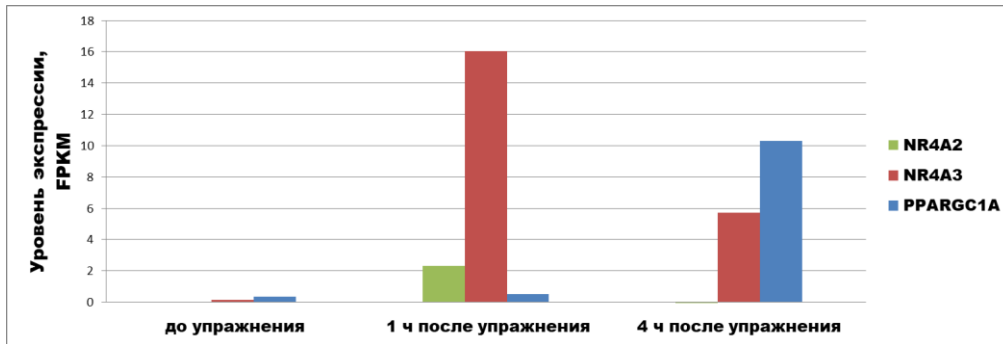


Рис. 3. Уровни экспрессии генов раннего и отложенного ответов, специфические для сократительной активности (разница экспрессий в работающей и неработающей ногах), до, через 1 и 4 часа после физического упражнения на основе анализа транскриптомных данных [8]. По оси X – время взятия пробы мышечной ткани; по оси Y – значение FPKM для мРНК соответствующего гена: столбцы зеленого цвета – ген *NR4A2*, красного цвета – ген *NR4A3*, синего цвета – ген *PPARGC1A*.

Для идентификации сайтов связывания транскрипционных факторов CREB, FOS и JUN семейств в промоторных областях генов *NR4A2*, *NR4A3* и *PPARGC1A*, мы провели биоинформатический анализ баз данных позиционных весовых матриц TRANSFAC [51] и результатов ChIP-seq исследований, представленных в GTRD [52] (таблица 2, рис. 4). Видно, что транскрипционные факторы из семейств FOS, JUN и CREB имеют общие сайты связывания в промоторах исследуемых генов раннего и отложенного ответов (*NR4A2*, *NR4A3* и *PPARGC1A*).

Таблица 2. Экспериментально подтвержденные сайты связывания транскрипционных факторов CREB, FOS и JUN семейств в промоторных областях генов *NR4A2*, *NR4A3* и *PPARGC1A* (база данных GTRD)

| ТФ | Промотор гена | Старт транскрипции (TSS) | Позиция сайта ТФ относительно TSS | Источник информации |
|--|--|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| pCREB1 | <i>NR4A2</i> (<i>ENSG00000153234</i>) | chr2:156342348 | -175 | [52] |
| | <i>NR4A3</i> (<i>ENSG00000119508</i>) | chr9:99821855 | 612 | [52] |
| | | | -279 | |
| | | | -53 | |
| <i>PPARGC1A</i> * (<i>XM_005248132</i>) | chr4:23904089 | 58 | [52] | |
| | | -153 | | |
| <i>PPARGC1A</i> # (<i>NM_013261</i>) | chr4:23890047 | 89 | [52] | |
| | | -117 | | |
| JUN | <i>NR4A2</i> | chr2:156342348 | -224 | [52] |
| | | | -33 | |
| | <i>NR4A3</i> | chr9:99821855 | 915 | [52] |
| | | | -200 | |
| | | -46 | | |
| | <i>PPARGC1A</i> * | chr4:23904089 | | |
| | <i>PPARGC1A</i> # | chr4:23890047 | -126 | [52] |
| JUND | <i>NR4A2</i> | chr2:156342348 | -166 | [52] |
| | <i>NR4A3</i> | chr9:99821855 | -901 | [52] |
| | | | -45 | |
| | <i>PPARGC1A</i> * | chr4:23904089 | | |
| <i>PPARGC1A</i> # | chr4:23890047 | -3 | [52] | |
| | | -114 | | |
| JUNB | <i>NR4A2</i> | chr2:156342348 | -239 | [52] |
| | | | -415 | |
| | <i>NR4A3</i> | chr9:99821855 | -917 | [52] |

| ТФ | Промотор гена | Старт транскрипции (TSS) | Позиция сайта ТФ относительно TSS | Источник информации |
|-------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| FOSL1 | | | -90 | |
| | <i>PPARGC1A</i> * | chr4:23904089 | | |
| | <i>PPARGC1A</i> # | chr4:23890047 | | |
| | <i>NR4A2</i> | chr2:156342348 | | |
| | <i>NR4A3</i> | chr9:99821855 | | |
| | <i>PPARGC1A</i> * | chr4:23904089 | | |
| FOSL2 | <i>PPARGC1A</i> # | chr4:23890047 | | |
| | <i>NR4A2</i> | chr2:156342348 | | |
| | <i>NR4A3</i> | chr9:99821855 | | |
| | <i>PPARGC1A</i> * | chr4:23904089 | | |
| FOS | <i>PPARGC1A</i> # | chr4:23890047 | | |
| | <i>NR4A2</i> | chr2:156342348 | -210 | [52] |
| | <i>NR4A3</i> | chr9:99821855 | -1017 | [52] |
| | | | -901 | |
| | | | -188 | |
| | | | -105 | |
| <i>PPARGC1A</i> * | chr4:23904089 | | | |
| <i>PPARGC1A</i> # | chr4:23890047 | | | |
| FOSB | <i>NR4A2</i> | chr2:156342348 | | |
| | <i>NR4A3</i> | chr9:99821855 | 50 | [52] |
| | <i>PPARGC1A</i> * | chr4:23904089 | | |
| | <i>PPARGC1A</i> # | chr4:23890047 | | |
| ATF3 | <i>PPARGC1A</i> # | chr4:23890047 | | |
| | <i>NR4A2</i> | chr2:156342348 | -198 | [52] |
| | <i>NR4A3</i> | chr9:99821855 | -828 | [52] |
| | | | -237 | |
| | | | -69 | |
| | | | -205 | |
| <i>PPARGC1A</i> * | chr4:23904089 | | | |
| <i>PPARGC1A</i> # | chr2:156342348 | -3 | [52] | |
| ATF4 | <i>PPARGC1A</i> # | chr4:23890047 | -151 | |
| | <i>NR4A2</i> | chr2:156342348 | | |
| | <i>NR4A3</i> | chr9:99821855 | | |
| | <i>PPARGC1A</i> * | chr4:23904089 | | |

* – альтернативный промотор *PPARGC1A*; # – канонический промотор *PPARGC1A*.

Экспериментально идентифицированные случаи образования гетеродимерных комплексов между транскрипционными факторами этих семейств [49, 50] и выявленные нами пересечения в их сайтах связывания в промоторных областях генов *NR4A2*, *NR4A3* и *PPARGC1A* позволяют предположить наличие дополнительного кооперативного механизма регуляции транскрипционной активности целевых генов для этих факторов. Более того, поскольку после окончания физической нагрузки уровень фосфорилирования многих сигнальных киназ очень быстро падает до базального уровня, то, как следует из схемы сигнального пути (рис. 2), уровень фосфорилированной активной формы CREB-подобных белков должен также уменьшаться в первые часы после физического упражнения.

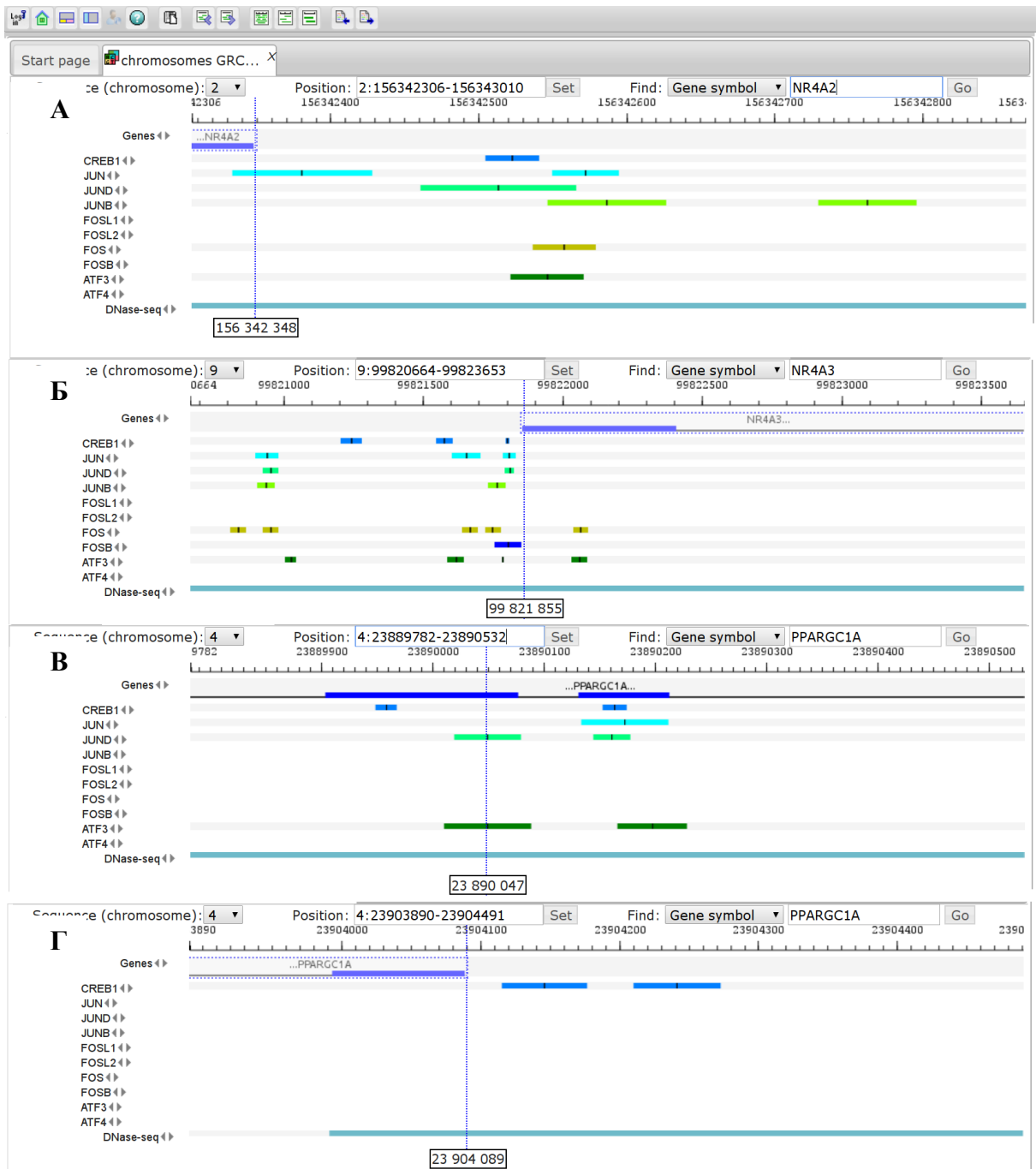


Рис. 4. Экспериментально подтвержденные сайты связывания транскрипционных факторов CREB, FOS и JUN семейств в промоторных областях генов *NR4A2*, *NR4A3* и *PPARGC1A* в геномном браузере системы GTRD [52]. Вертикальным пунктиром отмечены старты транскрипции, координата каждого старта транскрипции дана внизу в прямоугольнике: промоторная область гена *NR4A2* (ENSG00000153234) (А); промоторная область гена *NR4A3* (ENSG00000119508) (Б); область канонического промотора гена *PPARGC1A* (транскрипт NM_013261, координата старта транскрипта дана по аннотации NCBI версии 109.20190905) (В); область альтернативного промотора гена *PPARGC1A* (транскрипт XM_005248132, координата дана по аннотации NCBI версии 109.20190905) (Г).

В полногеномном исследовании на различных тканях человека было показано, что уровень фосфорилирования CREB^{Ser-133} не является определяющим фактором для регуляции его транскрипционной активности, что обусловлено наличием регуляторных партнеров CREB [53].

Математическая модель Ca^{2+} -зависимого сигнального пути (рис. 1) с учетом процессов регуляции экспрессии генов раннего (гены семейства *NR4A*) и отложенного (ген *PPARGC1A*) ответов была разработана на основе модульного подхода моделирования [11, 12].

Анализ собственных опубликованных [8] и неопубликованных транскриптомных данных, показывает, что максимум транскрипционной активности гена *NR4A2* наблюдается на первом часе после аэробной физической нагрузки, тогда как у гена *NR4A3* наблюдается некоторая временная задержка в достижении этого максимума после нагрузки. В связи с этим для описания скорости изменения концентрации мРНК *NR4A3* к базальной скорости транскрипции была добавлена скорость изменения концентрации *NR4A3* с запаздывающим аргументом (см. Материалы и Методы). Помимо этого, в работе Pattamaparanont с соавторами [54] было показано, что в области от -2.201 до -2.081 п.н. относительно старта инициации транскрипции гена *NR4A3* цитозин подвергается деметилированию в нескольких позициях, тогда как в промоторе гена *NR4A2* в большинстве тканей человека соответствующей эпигенетической регуляции обнаружено не было [53]. Поэтому для описания изменения концентрации мРНК гена *NR4A3* также было учтено влияние эпигенетических модификаций на скорость синтеза мРНК этого гена.

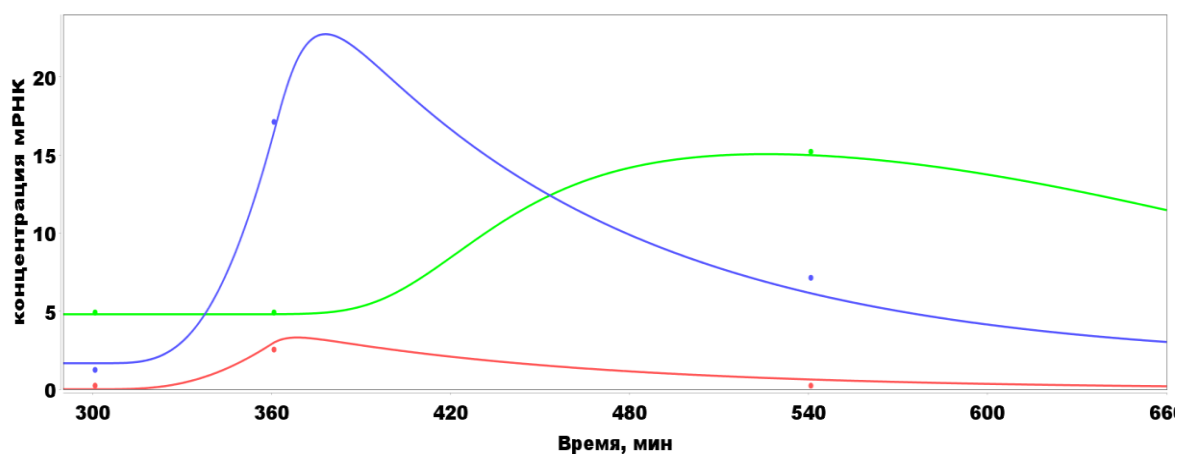


Рис. 5. Численный анализ изменения транскрипционной активности генов раннего и отложенного ответов на аэробную нагрузку. Экспериментальные данные [8] (уровень мРНК в скелетной мышце до, через 1 и 4 часа после физической нагрузки), отмеченные на рисунке точками: красным цветом – ген *NR4A2*, синим цветом – ген *NR4A3*, зеленым цветом – ген *PPARGC1A*. По оси X – время расчета (минуты), по оси Y – концентрация мРНК: для экспериментальных данных – в ФРКМ, для теоретических расчетов – в μM . Момент времени, соответствующий 300 и 360 минуте расчета – начало и окончание физического упражнения, соответственно.

Верификация модели

Согласно экспериментальным данным [8] транскрипционная активность *PPARGC1A* достигает своего максимума на 3–5 час после физического упражнения, как и восстановление её до базального уровня – на 8–12 часы после физической нагрузки. Изначально мы рассмотрели математическую модель без учёта формирования промежуточного фактора, регулирующего транскрипционную активность *PPARGC1A*. Однако численный анализ такой структуры модели продемонстрировал невозможность воспроизведения моделью указанных выше количественных характеристик, тогда как добавление процессов транскрипции-трансляции, приводящих к синтезу промежуточного транскрипционного фактора (X фактор) регуляции экспрессии *PPARGC1A*, позволило в точности воспроизвести динамическое поведение транскрипционной активности как генов раннего ответа (*NR4A2*, *NR4A3*), так и гена отложенного ответа, *PPARGC1A* после однократной нагрузки (рис. 5). Финальный

вариант структуры модели приведен в SBML-стандарте в файле SM3 в дополнительных материалах к статье.

Стоит отметить, что сдвиг по времени достижения максимальной транскрипционной активности у гена *NR4A3*, полученный при численном анализе модели, соответствует наблюдаемому феномену и в оригинальных неопубликованных данных, полученных с помощью технологии CAGE секвенирования. Интересно, что порядок значений кинетических параметров для процессов регуляции транскрипции и деградации мРНК, которые были получены в процессе адаптации модели к экспериментальным данным [8], соответствовал недавно опубликованным данным модели, описывающей участие гена *PPARGC1A* в регуляторных процессах системы циркадных ритмов [55].

Анализ чувствительности модели

Для выявления параметров модели, наиболее значимо влияющих на изменение концентраций мРНК генов раннего и отложенного ответа, мы провели анализ чувствительности в пакете программ BioUML (см. таблицу SM4 в дополнительных материалах к статье). На рисунке 6 приведены результаты анализа чувствительности расчетных значений концентраций мРНК этих генов к изменению наиболее влиятельных констант скоростей реакций.

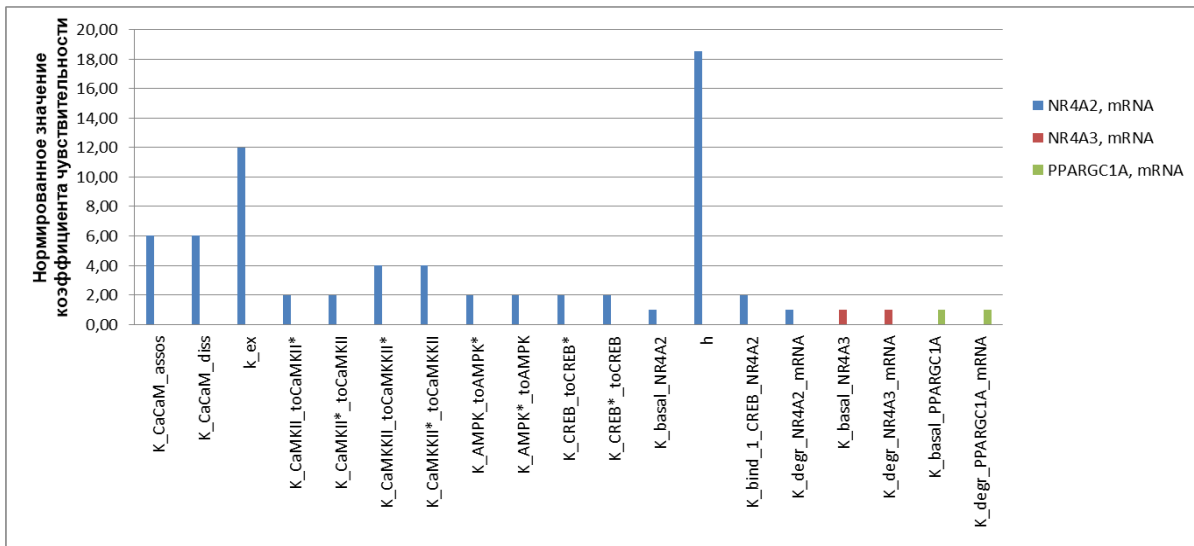


Рис. 6. Диаграмма влияния констант скоростей реакций Ca^{2+} -зависимого сигнального пути и процессов генетической регуляции на уровни экспрессии генов раннего и отложенного ответов. По оси X – название параметра (SM4), по оси Y – нормированное значение коэффициента чувствительности к варьированию данного параметра: синим цветом – для мРНК *NR4A2*, красным цветом – для мРНК *NR4A3*, зеленым цветом – для мРНК *PPARGC1A*. Чем выше значение коэффициента чувствительности по оси Y, тем более чувствительна к варьированию данного параметра стационарная концентрация мРНК соответствующего гена раннего и отложенного ответов.

Как видно из рисунка 6, стационарное значение концентрации мРНК генов раннего ответа (*NR4A2*) наиболее чувствительно к варьированию параметров, характеризующих как реакции активации Ca^{2+} -зависимого сигнального пути ($K_{\text{CaCaM}_{\text{assoc}}}$, $K_{\text{CaCaM}_{\text{diss}}}$ – константы ассоциации и диссоциации Ca^{2+} -CaM, соответственно, и k_{ex} – пороговое изменение концентрации Ca^{2+} в ответ на физическую нагрузку), так и процессы генетической регуляции (h , параметр Хилла – степенной показатель, определяющий сложность механизма регуляции экспрессии гена раннего ответа или субъединичную структуру комплекса CREB-подобных транскрипционных факторов); тогда как

стационарная концентрация мРНК генов отложенного ответа (*PPARGC1A*) зависит, главным образом, от конститутивной скорости его экспрессии и скорости деградации мРНК. Несмотря на то, что ген *NR4A3* активно транскрибируется уже через час после физической нагрузки [8], согласно анализу собственных неопубликованных транскриптомных данных наблюдается сдвиг максимума его транскрипционной активности после окончания физического упражнения. Анализ чувствительности модели показывает, что стационарная концентрация мРНК *NR4A3* также зависит от конститутивной скорости экспрессии и скорости деградации мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе представлена впервые разработанная математическая модель Ca^{2+} -зависимого сигнального пути, приводящего к активации экспрессии генов раннего и отложенного ответов в результате сократительной активности в клетках скелетных мышц человека. Численный анализ модели показал, что для адекватного воспроизведения экспериментально наблюдаемых изменений экспрессии генов раннего и отложенного ответов, необходимо учитывать синтез и созревание промежуточных транскрипционных факторов, регулирующих транскрипцию генов отложенного ответа, тогда как биоинформатический анализ оригинальных транскриптомных данных позволил предположить, что таковыми транскрипционными факторами могут являться CREB-подобные белки из семейств FOS и JUN, образующие гетеродимерные комплексы с белком CREB1. Более того, совместный анализ транскриптомных данных [8, 56] и результатов ChIP-seq исследований GTRD [52] дает возможность выдвинуть альтернативную гипотезу о том, что промежуточными факторами, регулирующими транскрипцию *PPARGC1A* с альтернативного промотора, могут быть и белки EGR1 и MYC, экспрессия которых существенно повышается через 30–60 минут после аэробной физической нагрузки. В ряде исследований установлено влияние увеличения экспрессии *EGR1* на последующее увеличение экспрессии *PPARGC1A* в тканях человека [57, 58], тогда как экспрессия *EGR1* быстро и существенно возрастает после механического растяжения [59]. При этом концентрация белка EGR1 возрастает в период с 1 часа по 6 час после растяжения, с пиком в районе 3–4 часа, что близко к началу существенного увеличения транскрипции *PPARGC1A*. В свою очередь, экспериментальные данные о влиянии MYC на экспрессию *PPARGC1A* противоречивы. С одной стороны, считается, что MYC увеличивает экспрессию всех активных генов за счет ускорения транскрипции [60–62] и участвует в процессах модификации хроматина [63–66]. С другой стороны, увеличение экспрессии *MYC* отрицательно влияет на экспрессию *PPARGC1A* [67, 68], в частности, в кардиомиоцитах [69] и других типах клеток, где MYC действует как репрессор [70]. Таким образом, в процессе развития модели EGR1 будет также рассматриваться, как вероятный кандидат на роль гена раннего ответа, положительно регулирующего экспрессию *PPARGC1A*.

В заключение отметим, что представленная математическая модель сигнального пути будет интегрирована в модульную версию многокомпарментной модели Ли с соавторами, опубликованную нами ранее [11]. В рамках этой модели для учета активирующего механизма на метаболизм клетки скелетной мышцы, связанного с физической нагрузкой, уравнения скоростей ферментативных реакций и процессов транспорта умножается на стрессовую функцию, которая зависит от обобщенного параметра мощности, определяющего интенсивность физической нагрузки. Чтобы комплексная модель более детально отражала реальные молекулярно-генетические процессы, активируемые в ответ на физическую нагрузку в клетках скелетных мышц человека, мы планируем заменить обобщенный параметр мощности на концентрацию формируемого комплекса Ca^{2+} -CaM, а также учесть *PPARGC1A*-опосредованную

регуляцию транскрипции ряда генов, кодирующих ферменты гликолиза и цикла трикарбоновых кислот.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00308 (17-00-00296).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*. 2012. V. 8. № 8. P. 457–465.
2. Hawley J.A., Hargreaves M., Joyne, M.J., Zierath J.R. Integrative biology of exercise. *Cell*. 2014. V. 159. №4. P.738–749.
3. Koulmann N., Bigard A.X. Interaction between signaling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. *Pflügers Archiv*. 2006. V. 452. № 2. P. 125.
4. Neubauer O., Sabapathy S., Ashton K.J., Desbrow B., Peake J.M., Lazarus R., Wessner B., Cameron-Smith D., Wagne, K.H., Haseler L.J., Bulmer A.C. Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling. *Journal of Applied Physiology*. 2013. V. 116. № 3. P. 274–287.
5. Vissing K., Schjerling P. Simplified data access on human skeletal muscle transcriptome responses to differentiated exercise. *Scientific data*. 2014. V. 1. P. 140041.
6. Popov D.V., Makhnovskii P.A., Kurochkina N.S., Lysenko E.A., Vepkhvadze T.F., Vinogradova O.L. Intensity-dependent gene expression after aerobic exercise in endurance-trained skeletal muscle. *Biology of sport*. 2018. V. 35. № 3. P. 277.
7. Dickinson J.M., D’Lugos A.C., Naymik M.A., Siniard A.L., Wolfe A.J., Curtis D.R., Huentelman M.J., Carroll C.C. Transcriptome response of human skeletal muscle to divergent exercise stimuli. *Journal of Applied Physiology*. 2018. V. 124. № 6. P. 1529–1540.
8. Popov D.V., Makhnovskii P.A., Shagimardanova E.I., Gazizova G.R., Lysenko E.A., Gusev O.A., Vinogradova O.L. Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2019. V. 316. № 4. P. E605–E614.
9. Li Y., Dash R.K., Kim J., Saidel G.M., Cabrera M.E. Role of NADH/NAD⁺ transport activity and glycogen store on skeletal muscle energy metabolism during exercise: *in silico* studies. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2009. V. 296. № 1. P. 25–46.
10. Akberdin I.R., Kazantsev F.V., Ermak T.V., Timonov V.S., Khlebodarova T.M., Likhoshvai V.A. *In Silico* Cell: Challenges and Perspectives. *Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2013. V. 8. № 1. P. 295–315. doi: [10.17537/2013.8.295](https://doi.org/10.17537/2013.8.295).
11. Kiselev I.N., Akberdin I.R., Vertyshev A.Y., Popov D.V., Kolpakov F.A. A Modular Visual Model of Energy Metabolism in Human Skeletal Muscle. *Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2019. V. 14. № 2. P. 373–392. doi: [10.17537/2019.14.373](https://doi.org/10.17537/2019.14.373).
12. Kolpakov F., Akberdin I., Kashapov T., Kiselev I., Kolmykov S., Kondrakhin Y., Kutumova E., Mandrik N., Pintus S., Ryabova A., Sharipov R., Yevshin I., Kel A. BioUML: an integrated environment for systems biology and collaborative analysis of biomedical data. *Nucleic Acids Research*. 2019. V. 47. № W1. P. W225–W233. doi: [10.1093/nar/gkz440](https://doi.org/10.1093/nar/gkz440).
13. Scarpulla R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological Reviews*. 2008. V. 88. № 2. P. 611–638.
14. Olesen J., Kiilerich K., Pilegaard H. PGC-1 α -mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2010. V. 460. № 1. P. 153–162.

15. Pearen M.A., Eriksson N.A., Fitzsimmons R.L., Goode J.M., Martel N., Andrikopoulos S., Muscat G.E. The nuclear receptor, Nor-1, markedly increases type II oxidative muscle fibers and resistance to fatigue. *Molecular Endocrinology*. 2012. V. 26. № 3. P. 372–384.
16. Pearen M.A., Goode J.M., Fitzsimmons R.L., Eriksson N.A., Thomas G.P., Cowin G.J., Wang S.C.M., Tuong Z.K., Muscat G.E. Transgenic muscle-specific Nor-1 expression regulates multiple pathways that effect adiposity, metabolism, and endurance. *Molecular Endocrinology*. 2013. V. 27. № 11. P. 1897–1917.
17. Yoshioka T., Inagaki K., Noguchi T., Sakai M., Ogawa W., Hosooka T., Iguchi H., Watanabe E., Matsuki Y., Hiramatsu R., Kasuga M. Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1 α gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009. V. 381. № 4. P. 537–543.
18. Bruno N.E., Kelly K.A., Hawkins R., Bramah-Lawani M., Amelio A.L., Nwachukwu J.C., Nettles K.W., Conkright M.D. Creb coactivators direct anabolic responses and enhance performance of skeletal muscle. *The EMBO journal*. 2014. V. 33. № 9. P. 1027–1043.
19. Goode J.M., Pearen M.A., Tuong Z.K., Wang S.C.M., Oh T.G., Shao E.X., Muscat G.E. The nuclear receptor, Nor-1, induces the physiological responses associated with exercise. *Molecular Endocrinology*. 2016. V. 30. № 6. P. 660–676.
20. Berdeaux R., Hutchins C. Anabolic and pro-metabolic functions of CREB-CRTC in skeletal muscle: advantages and obstacles for type 2 diabetes and cancer cachexia. *Frontiers in Endocrinology*. 2019. V. 10. P. 535.
21. Cui J., Kaandorp J.A. Simulating complex calcium-calcineurin signaling network. In: *International Conference on Computational Science*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008. P. 110–119.
22. Saucerman J.J., Bers D.M. Calmodulin mediates differential sensitivity of CaMKII and calcineurin to local Ca^{2+} in cardiac myocytes. *Biophysical Journal*. 2008. V. 95. № 10. P. 4597–4612.
23. Eilers W., Gevers W., Van Overbeek D., De Haan A., Jaspers R.T., Hilbers P.A., Van Riel N., Flück M. Muscle-type specific autophosphorylation of CaMKII isoforms after paced contractions. *BioMed Research International*. 2014. Article ID 943806. doi: [10.1155/2014/943806](https://doi.org/10.1155/2014/943806).
24. Murgia M., Toniolo L., Nagaraj N., Ciciliot S., Vindigni V., Schiaffino S., Reggiani C., Mann M. Single muscle fiber proteomics reveals fiber-type-specific features of human muscle aging. *Cell Reports*. 2017. V. 19. № 11. P. 2396–2409.
25. Yates L.D., Greaser M.L., Huxley H.E. Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle. *Journal of Molecular Biology*. 1983. V. 168. № 1. P. 123–141.
26. Hasten D.L., Morris G.S., Ramanadham S., Yarasheski K.E. Isolation of human skeletal muscle myosin heavy chain and actin for measurement of fractional synthesis rates. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1998. V. 275. № 6. P. E1092–E1099.
27. Borina E., Pellegrino M.A., D'Antona G., Bottinelli R. Myosin and actin content of human skeletal muscle fibers following 35 days bed rest. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2010. V. 20. № 1. P. 65–73.
28. Carroll C.C., Carrithers J.A., Trappe T.A. Contractile protein concentrations in human single muscle fibers. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2004. V. 25. № 1. P. 55–59.
29. Wilhelm M., Schlegl J., Hahne H., Gholami A.M., Lieberenz M., Savitski M.M., Ziegler E., Butzmann L., Gessulat S., Marx H., Mathieson T. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*. 2014. V. 509. № 7502. P. 582.

30. Edfors F., Danielsson F., Hallström B.M., Käll L., Lundberg E., Pontén F., Forsström B., Uhlén M. Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. *Molecular systems biology*. 2016. V. 12. № 10.
31. Fortelny N., Overall C.M., Pavlidis P., Freue G.V.C. Can we predict protein from mRNA levels? *Nature*. 2017. V. 547. № 7664. P. E19.
32. Wang D., Eraslan B., Wieland T., Hallström B., Hopf T., Zolg D.P., Zecha J., Asplund A., Li L.H., Meng C., Frejno M. A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. *Molecular systems biology*. 2019. V. 15. № 2.
33. Le Novère N., Hucka M., Mi H., Moodie S., Schreiber F., Sorokin A., Demir E., Wegner K., Aladjem M.I., Wimalaratne S.M., Bergman F.T. The systems biology graphical notation. *Nature Biotechnology*. 2009. V. 27. № 8. P. 735.
34. Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized Hill function method for modeling molecular processes. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. 2007. V. 5. № 02b. P. 521–531.
35. Sonntag A.G., Dalle Pezze P., Shanley D.P., Thedieck K. A modelling–experimental approach reveals insulin receptor substrate (IRS)-dependent regulation of adenosine monophosphate-dependent kinase (AMPK) by insulin. *The FEBS Journal*. 2012. V. 279. № 18. P. 3314–3328.
36. Brown P.N., Byrne G.D., Hindmarsh A.C. VODE: A variable-coefficient ODE solver. *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing*. 1989. V. 10. № 5. P. 1038–1051.
37. Benders A.A., Oosterhof A., Wevers R.A., Veerkamp J.H. Excitation-contraction coupling of cultured human skeletal muscle cells and the relation between basal cytosolic Ca^{2+} and excitability. *Cell calcium*. 1997. V. 21. № 1. P. 81–91.
38. Koopman W.J., Willems P.H., Oosterhof A., van Kuppevelt T.H., Gielen S.C. Amplitude modulation of nuclear Ca^{2+} signals in human skeletal myotubes: a possible role for nuclear Ca^{2+} buffering. *Cell calcium*. 2005. V. 38. № 2. P. 141–152.
39. Gejl K.D., Hvid L.G., Willis S.J., Andersson E., Holmberg H.C., Jensen R., Frandsen U., Hansen J., Plomgaard P., Ørtenblad N. Repeated high-intensity exercise modulates Ca^{2+} sensitivity of human skeletal muscle fibers. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2016. V. 26. № 5. P. 488–497.
40. Rabitz H., Kramer M., Dacol D. Sensitivity analysis in chemical kinetics. *Annual Review of Physical Chemistry*. 1983. V. 34. № 1. P. 419–461.
41. Jensen T.E., Rose A.J., Jørgens S.B., Brandt N., Schjerling P., Wojtaszewski J.F., Richter E.A. Possible CaMKK-dependent regulation of AMPK phosphorylation and glucose uptake at the onset of mild tetanic skeletal muscle contraction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007. V. 292. № 5. P. E1308–E1317.
42. Abbott M.J., Edelman A.M., Turcotte L.P. CaMKK is an upstream signal of AMP-activated protein kinase in regulation of substrate metabolism in contracting skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2009. V. 297. № 6. P. R1724–R1732.
43. Gehlert S., Bloch W., Suhr F. Ca^{2+} -dependent regulations and signaling in skeletal muscle: from electro-mechanical coupling to adaptation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. V. 16. № 1. P. 1066–1095.
44. Egan B., Zierath J.R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*. 2013. V. 17. № 2. P. 162–184.
45. Popov D.V. Adaptation of skeletal muscle to contractile activity of various duration and intensity: role of PGC-1 α . *Biochemistry (Moscow)*. 2018. V. 83. № 6. P. 781–799.
46. Amoasii L., Holland W., Sanchez-Ortiz E., Baskin K.K., Pearson M., Burgess S.C., Nelson B.R., Bassel-Duby R., Olson E.N. A MED13-dependent skeletal muscle gene program controls systemic glucose homeostasis and hepatic metabolism. *Genes & development*. 2016. V. 30. № 4. P. 434–446.

47. Amoasii L., Sanchez-Ortiz E., Fujikawa T., Elmquist J.K., Bassel-Duby R., Olson E.N. NURR1 activation in skeletal muscle controls systemic energy homeostasis. *PNAS*. 2019. V. 116. № 23. P. 11299–11308.
48. Chao L.C., Wroblewski K., Ilkayeva O.R., Stevens R.D., Bain J., Meyer G.A., Schenk S., Martinez L., Vergnes L., Narkar V.A., Drew B.G. Skeletal muscle Nur77 expression enhances oxidative metabolism and substrate utilization. *Journal of Lipid Research*. 2012. V. 53. № 12. P. 2610–2619.
49. Hai T., Curran T. Crossfamily dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *PNAS*. 1991. V. 88. P. 3720–3724.
50. Newman J.R., Keating A.E. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science*. 2003. V. 300. № 5628. P. 2097–2101.
51. Matys V., Fricke E., Geffers R., Gobling E., Haubrock M., Hehl R., Hornischer K., Karas D., Kel A.E., Kel-Margoulis O.V., Kloos D.U. TRANSFAC®: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *NAR*. 2003. V. 31. № 1. P. 374–378.
52. Yevshin I., Sharipov R., Kolmykov S., Kondrakhin Y., Kolpakov F. GTRD: a database on gene transcription regulation – 2019 update. *NAR*. 2018. V. 47. № D1. P. D100–D105. doi: [10.1093/nar/gky1128](https://doi.org/10.1093/nar/gky1128).
53. Zhang X., Odom D.T., Koo S.H., Conkright M.D., Canettieri G., Best J., Chen H., Jenner R., Herbolsheimer E., Jacobsen E., Kadam S. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *PNAS*. 2005. V. 102. № 12. P. 4459–4464.
54. Pattamaprapanont P., Garde C., Fabre O., Barrès R. Muscle contraction induces acute hydroxymethylation of the exercise-responsive gene *Nr4a3*. *Frontiers in Endocrinology*. 2016. V. 7. P. 165.
55. Foteinou P.T., Venkataraman A., Francey L.J., Anafi R.C., Hogenesch J.B., Doyle F.J. Computational and experimental insights into the circadian effects of SIRT1. *PNAS*. 2018. V. 115. № 45. P. 11643–11648.
56. Catoire M., Mensink M., Boekschoten M.V., Hangelbroek R., Müller M., Schrauwen P., Kersten S. Pronounced effects of acute endurance exercise on gene expression in resting and exercising human skeletal muscle. *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. P. e51066.
57. Fu M., Zhang J., Lin Y., Zhu X., Ehrenguber M.U., Chen Y.E. Early growth response factor-1 is a critical transcriptional mediator of peroxisome proliferator-activated receptor- γ 1 gene expression in human aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. V. 277. № 30. P. 26808–26814.
58. Mingui F.U., Zhang J., Yimin L.I.N., Xiaojun Z.H.U., Luning Z.H.A.O., Ahmad M., Ehrenguber M.U. Early stimulation and late inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) gene expression by transforming growth factor beta in human aortic smooth muscle cells: role of early growth-response factor-1 (Egr-1), activator protein 1 (AP1) and Smads. *Biochemical Journal*. 2003. V. 370. № 3. P. 1019–1025.
59. Pardo P.S., Mohamed J.S., Lopez M.A., Boriek A.M. Induction of Sirt1 by mechanical stretch of skeletal muscle through the early response factor EGR1 triggers an antioxidative response. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. V. 286. № 4. P. 2559–2566.
60. Lin C.Y., Lovén J., Rahl P.B., Paranal R.M., Burge C.B., Bradner J.E., Lee T.I., Young R.A. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*. 2012. V. 151. № 1. P. 56–67.
61. Nie Z., Hu G., Wei G., Cui K., Yamane A., Resch W., Wang R., Green D.R., Tessarollo L., Casellas R., Zhao K. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*. 2012. V. 151. № 1. P. 68–79.
62. Rahl P.B., Young R.A. MYC and transcription elongation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014. V. 4. № 1. P. a020990.

63. Frank S.R., Parisi T., Taubert S., Fernandez P., Fuchs M., Chan H.M., Livingston D.M., Amati B. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO reports*. 2003. V. 4. № 6. P. 575–580.
64. Faiola F., Liu X., Lo S., Pan S., Zhang K., Lyman E., Farina A., Martinez E. Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Molecular and Cellular Biology*. 2005. V. 25. № 23. P. 10220–10234.
65. Guccione E., Martinato F., Finocchiaro G., Luzi L., Tizzoni L., Dall'Olio V., Zardo G., Nervi C., Bernard L., Amati B. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nature Cell Biology*. 2006. V. 8. № 7. P. 764.
66. Knoepfler P.S., Zhang X.Y., Cheng P.F., Gafken P.R., McMahon S.B., Eisenman R.N. Myc influences global chromatin structure. *The EMBO Journal*. 2006. V. 25. № 12. P. 2723–2734.
67. Mastropasqua F., Girolimetti G. and Shoshan M. PGC1 α : friend or foe in cancer? *Genes*. 2018. V. 9. № 1. P. 48.
68. Tan Z., Luo X., Xiao L., Tang M., Bode A.M., Dong Z., Cao Y. The role of PGC1 α in cancer metabolism and its therapeutic implications. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2016. V. 15. № 5. P. 774–782.
69. Ahuja P., Zhao P., Angelis E., Ruan H., Korge P., Olson A., Wang Y., Jin E.S., Jeffrey F.M., Portman M., MacLellan W.R. Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010. V. 120. № 5. P. 1494–1505.
70. Sancho P., Burgos-Ramos E., Tavera A., Kheir T.B., Jagust P., Schoenhals M., Barneda D., Sellers K., Campos-Olivas R., Graña O., Viera C.R. MYC/PGC-1 α balance determines the metabolic phenotype and plasticity of pancreatic cancer stem cells. *Cell Metabolism*. 2015. V. 22. № 4. P. 590–605.

Рукопись поступила в редакцию 01.10.2019, переработанный вариант поступил 10.01.2020.
Дата опубликования 05.02.2020.

A Mathematical Model Linking Ca²⁺-Dependent Signaling Pathway and Gene Expression Regulation in Human Skeletal Muscle

**Akberdin I.R.^{1,2,3}, Vertyshev A.Yu.⁴, Pintus S.S.^{1,5}, Popov D.V.⁶,
Kolpakov F.A.^{1,5}**

¹*BIOSOFT.RU, LLC, Novosibirsk, Russian Federation*

²*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

³*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

⁴*CJSC "Sites-Tsentr", Moscow, Russian Federation*

⁵*Institute of Computational Technologies SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation*

⁶*Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Abstract. The physiological adaptation to aerobic endurance exercises is provided by activation of signaling pathways in skeletal muscle cells. Training-induced activation of specific signaling pathways results in significant transcriptional responses. Despite the ongoing endeavours to experimentally investigate regulatory mechanisms and signal transduction pathways involved in the contraction-induced adaptation, quantitative contribution of certain signal molecules in expression regulation of genes responsible for intracellular response has not been studied

comprehensively yet. The paper presents novel developed model linking Ca^{2+} -dependent signaling pathway and downstream transcription regulation of early and late response genes in human skeletal muscle during exercise. Numerical analysis of the model enabled to reveal crucial steps in this signal transduction pathway for the adaptation and demonstrated the necessity of consideration of additional transcription factors regulating transcription of late response genes in order to adequately reproduce gene expression data that were taken in human vastus lateralis muscle during and after acute cycling exercise.

Key words: *mathematical model, skeletal muscle, physical exercise, Ca^{2+} -dependent signaling pathway, transcriptome, RNA sequencing, regulation of expression, BioUML.*