

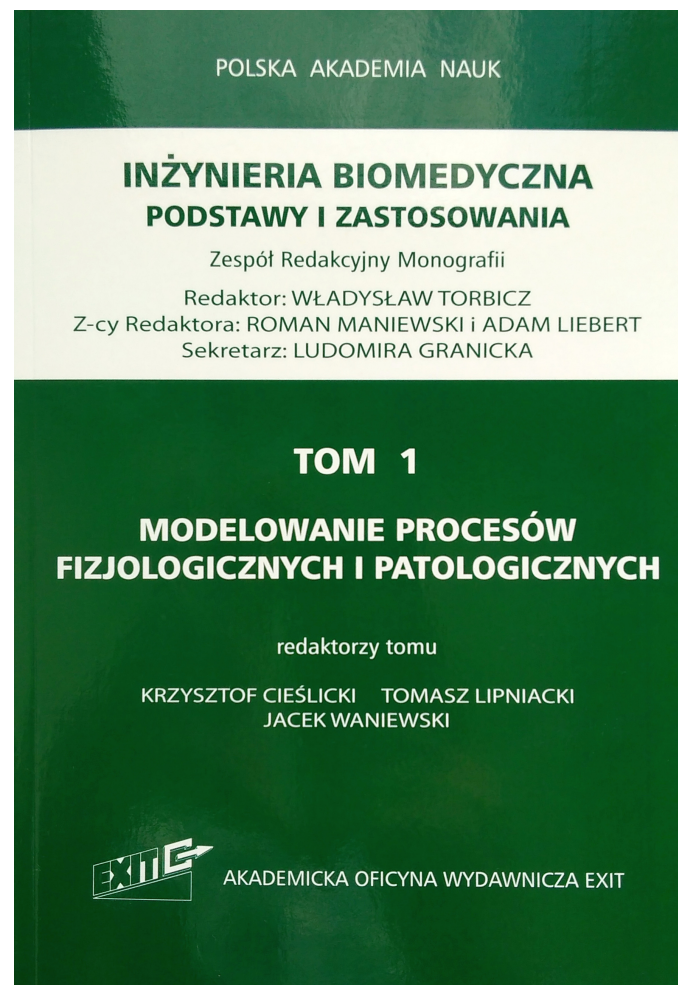
Niniejszy rozdział pochodzi z książki

*Inżynieria biomedyczna.
Podstawy i zastosowania*

pod redakcją Wł. Torbicza, z tomu pierwszego

*Modelowanie procesów fizjologicznych
i patologicznych.*

Książka została wydana w 2018 przez
Akademicką Oficynę Wydawniczą EXIT.



Rozdział 22

Modelowanie sieci sygnałowych

Marek KOCHAŃCZYK¹, Joanna JARUSZEWICZ-BŁOŃSKA¹,
Beata HAT¹, Paweł KOCIENIEWSKI¹, Maciej CZERKIES¹,
Wiktor PRUS¹, Zbigniew KORWEK¹, Marek KIMMEL²,
Tomasz LIPNIACKI¹

22.1. Wprowadzenie

Molekularne sieci regulatorowe odgrywają kluczową rolę w przetwarzaniu sygnałów biochemicznych w komórce. Przez sieć regulatorową rozumiemy układ reagujących ze sobą substratów (białek, mRNA, genów) odpowiedzialnych za regulację określonych biologicznych procesów komórkowych, takich jak odpowiedź antywirusowa, cykl komórkowy, przejście nabłonkowo-mezenchymalne. Od strony matematycznej, molekularna sieć regulatorowa może być postrzegana jako nieliniowy układ dynamiczny, w którym istotną rolę odgrywają efekty stochastyczne związane z małą liczbą reagujących cząsteczek, na przykład kopii genów, cząsteczek mRNA lub cytokin. Choć układy takie powinny być modelowane poprzez procesy stochastyczne, często użyteczne jest przybliżenie deterministyczne.

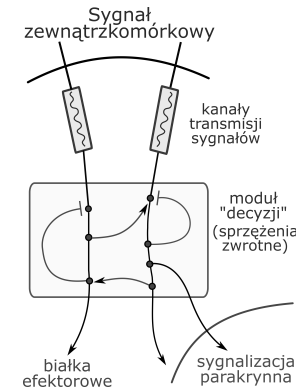
Przybliżenie deterministyczne umożliwia opis procesów regulatorowych poprzez układ nieliniowych równań różniczkowych zwyczajnych bądź cząstkowych. Pozwala to na przeprowadzenie analizy bifurkacyjnej układu, znalezienie stanów stacjonarnych i cykli granicznych, które mogą być następnie powiązane z biologicznymi stanami komórki. Rozwiązania przybliżenia deterministycznego są często podstawą do właściwej interpretacji trajektorii stochastycznych.

Molekularne sieci regulatorowe mogą być rozpatrywane z perspektywy przetwarzania informacji i podejmowania decyzji przez komórkę. Na rys. 22.1 przedstawiony jest ideogram procesu decyzyjnego w odpowiedzi

¹Pracownia Modelowania w Biologii i Medycynie, Zakład Biosystemów i Miękkiej Materii, Instytut Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk, ul. Adolfa Pawiańskiego 5B, 02-106 Warszawa, e-mail: tlipnia@ippt.pan.pl

²Department of Statistics, Rice University, 6100 Main St. 77005, Houston, Teksas, Stany Zjednoczone

na sygnał zewnątrzkomórkowy. W procesie możemy wyróżnić transmisję informacji, przetwarzanie zebranej informacji oraz aktywację białek efektorowych bądź białek sygnalizacyjnych, np. cytokin umożliwiających transmisję sygnałów do sąsiednich komórek. Wyodrębnienie poszczególnych faz przetwarzania sygnału ma jedynie charakter formalny – w rzeczywistości fazy te nie są rozdzielone ani w czasie, ani w przestrzeni komórkowej.



Rys. 22.1. Przekazywanie sygnału w komórce.

22.2. Cele badawcze

Podstawowym celem modelowania jest wyznaczenie molekularnej sieci sygnałowej rządzącej obserwowanym eksperymentalnie procesem. Mając zdefiniowany układ dynamiczny możemy scharakteryzować jego zachowanie, np. wyznaczyć punkty stałe, rozwiązania periodyczne, atraktory itp. Istotą modelowania jest rozwiązanie trudniejszego problemu odwrotnego: odgadnięcie układu dynamicznego w oparciu o jego zachowanie zbadane eksperymentalnie. Nie ma uniwersalnej metody rozwiązywania tego problemu, co więcej, zazwyczaj istnieje wiele układów dynamicznych/regulatorowych zgodnych z obserwacjami; dodatkowo nawet dla konkretnego układu regulatorowego parametryzacja jest zazwyczaj niejednoznaczna. Wobec niedostatku danych eksperymentalnych konstrukcja i parametryzacja modelu dająca dobrą zgodność z danymi eksperymentalnymi (dobry „fit”) nie oznacza, że model jest poprawny, a jego parametry odpowiadają parametrom rzeczywistym. Intuicyjnie największe szanse na poprawność ma najprostszy model dający dobrą zgodność z danymi eksperymentalnymi. W niniejszym opracowaniu proponujemy podejście do problemu konstrukcji modeli poprzez

analizę dynamiki prostych układów regulatorowych, a następnie wykorzystanie ich jako cegiełek do konstrukcji bardziej złożonych układów.

Celem naszych badań jest scharakteryzowanie procesów podejmowania decyzji w odpowiedzi na stres. Procesy decyzyjne zazwyczaj kojarzone są z wielostabilnością, w szczególności z bistabilnością. Atraktory układu takie jak punkty stałe czy cykle graniczne mogą być rozpatrywane jako predefiniowane odpowiedzi mające sens fizjologiczny. W procesie przetwarzania informacji komórka stara się przyporządkować otrzymany sygnał taką predefiniowaną odpowiedź. W pewnym sensie przypomina to rozpoznawanie mowy bądź obrazów. Mamy zakodowane pewne słowa i do wzorców słów redukujemy słyszane dźwięki. Redukcja ta jest elementem rozumienia i umożliwia dalsze przetwarzanie bądź przekaz informacji. Przekazanie zdania we własnym języku przez trzy kolejne osoby nie następuje trudności, podczas gdy wykonanie tego zadania w nieznanym języku jest niemal niemożliwe. Bistabilność bądź wielostabilność pojawia się już w stosunkowo prostych układach zawierających dodatnie sprzężenie zwrotne i dostatecznie silną nieliniowość. Układy takie są kandydatami na proste przełączniki decyzyjne, nie posiadają jednak zdolności do integrowania sygnałów. Bardziej adekwatnymi kandydatami wydają się być bardziej złożone układy zawierające kombinacje sprzężeń ujemnych i dodatnich, umożliwiające integrację szeregu sygnałów i tym samym podjęcie bardziej wyważonej decyzji. Nawet jeśli repertuar odpowiedzi jest stosunkowo skromny, system może przetwarzać wiele informacji. Dobrą analogię stanowi tu ustalanie wysokości stóp procentowych przez bank centralny; choć ilość przetwarzanych informacji (przynajmniej według zapewnień banku) jest ogromna, liczba potencjalnych decyzji jest niewielka. W niniejszym rozdziale na przykładach skonstruowanych przez nas modeli przeanalizujemy trzy charakterystyczne kombinacje sprzężeń zwrotnych dodatnich i ujemnych.

Punktem wyjścia do konstrukcji modelu matematycznego są dane eksperymentalne. Optymalnie jest, gdy konstrukcja modelu i eksperyment postępują równocześnie. Pozwala to na bieżącą weryfikację modelu, a także na projektowanie eksperymentów tak, aby uzyskać rozstrzygające dane. Naszą analizę zaczniemy zatem od omówienia technik eksperymentalnych istotnych w ilościowym opisie procesów regulatorowych. Następnie omówimy charakterystyczne elementy regulatorowe i ich dynamikę. W końcu przeanalizujemy kilka modeli regulatorowych stworzonych przez naszą grupę.

22.3. Techniki eksperymentalne

Współczesna biologia używa wielu wyspecjalizowanych technik eksperymentalnych umożliwiających wgląd w niemal każdy etap aktywacji komórkowej, poczynając od wiązania liganda przez receptor, poprzez ścieżkę prze-

kazywania sygnału do jądra komórkowego i uruchomienie ekspresji genów, aż do wydzielenia (sekrecji) przez komórkę substancji efektorowych. Istniejące techniki w dużej mierze skupiają się na określaniu poziomu mRNA interesujących nas genów, a także poziomu, lokalizacji i modyfikacji potranslacyjnych interesujących nas białek. Przegląd ważniejszych ścieżek sygnałowych oraz metod eksperymentalnych wykorzystywanych do ich badania można znaleźć na przykład w [1, 2].

22.3.1. Linie komórkowe

Znaczna część badań biologicznych jest wykonywana przy użyciu pierwotnych lub unieśmiertelnionych linii komórkowych. Wprowadzanie perturbacji jest podstawowym narzędziem umożliwiającym poznanie mechanizmów działania układu regulatorowego. W eksperymentach stosuje się szereg strategii stałego bądź tymczasowego modyfikowania wybranych elementów regulatorowych. Eliminacja ekspresji wybranych genów (ang. *knockout*) jest ostatnio najczęściej dokonywana poprzez edycję genomu za pomocą narzędzi takich jak TALEN lub CRISPR, dzięki którym można wprowadzać mutacje punktowe lub zdefiniowane delecje genów. Metody te wymagają wyizolowania pojedynczych klonów i utworzenia nowej stabilnej linii komórkowej, co jest procesem czasochłonnym. Dodatkowo całkowita utrata funkcji genu nie zawsze jest pożądana, ponieważ może okazać się śmiertelna dla komórek. W tych przypadkach można dokonać wyciszenia (ang. *knock-down*) genu, co skutkuje częściową i przejściową redukcją ekspresji, często wystarczającą do zbadania funkcji interesującego nas genu. Jest to najczęściej wykonywane przez tzw. interferencję RNA, przy użyciu małych cząsteczek RNA (siRNA lub shRNA), które specyficznie wiążą się do docelowego mRNA, przyspieszając jego degradację. Efektem końcowym jest potranskrypcyjne obniżenie ekspresji genów bez ingerencji w sekwencję genetyczną, czyli inaczej niż w przypadku *knockout*ów genowych. Bardziej zaawansowane techniki polegają na usunięciu wybranego genu lub zastąpieniu go innym genem kodującym nieco zmienione białko, np. z podmienionym pojedynczym aminokwasem. Taka technika pozwala na poznanie funkcji poszczególnych domen białkowych i specyficznych interakcji między białkami. Aby poznać wpływ danych czynników transkrypcyjnych na syntezę specyficznych białek, dokonuje się również edycji promotorów genów kodujących te białka.

22.3.2. Techniki analizy ekspresji genów

Translokacja czynników transkrypcyjnych do jądra zwykle prowadzi do zmian profilu ekspresji genów. Najczęściej stosowaną obecnie metodą analizy ekspresji genów, czyli oszacowania poziomu mRNA w komórce, jest łańcu-

chowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR). Jest to modyfikacja starszej metody PCR, która działa na zasadzie amplifikacji cząsteczek DNA (otrzymanych w procesie odwrotnej transkrypcji z mRNA) przez enzym zależny od temperatury nazywany polimerazą. Sekwencja docelowa (na przykład pojedynczy gen lub jego fragment) jest specyficznie amplifikowana przez zastosowanie pary starterów (ang. *primers*), czyli krótkich fragmentów jednoniciowego DNA, które stanowią punkt wyjścia dla dwukierunkowej syntezy DNA przez polimerazę. RT-PCR prowadzi się przy użyciu termocyklera wyposażonego dodatkowo w układy do wzbudzania i detekcji fluorescencji. W każdym cyklu wzrostu i obniżenia temperatury (prowadzącym do powielenia sekwencji) specyficzna sonda wiąże się do badanej sekwencji, a następnie jest usuwana przez polimerazę i rozpada się, generując fluorescencję mierzoną przez urządzenie. Określenie ilości mRNA odbywa się poprzez analizę zmierzonej fluorescencji w funkcji liczby cykli. Możliwe jest zarówno bezwzględne, jak i względne określenie poziomu mRNA, w zależności od tego, czy stosuje się krzywą wzorcową czy porównywanie próbki mierzonej z próbką referencyjną.

Nowszą alternatywą dla RT-PCR jest „cyfrowy” PCR (ang. *digital PCR*, dPCR). W metodzie tej wyjściowa mieszanina zostaje rozdzielona na kilkanaście tysięcy niezależnych reaktorów. Po dokonaniu określonej liczby cykli równoległe w każdym reaktorze określa się, w ilu z nich zarejestrowano emisję fluorescencji, co oznacza obecność w reaktorze przynajmniej jednej analizowanej cząsteczki mRNA (przepisanej uprzednio na DNA). Bezwzględna ilość produktu w początkowej reakcji określa się zakładając poissonowski rozkład mRNA w poszczególnych reaktorach. Zaletą metody dPCR jest możliwość wyznaczenia liczby cząsteczek mRNA w przeliczeniu na jedną komórkę.

Pomiary metodami RT-PCR i dPCR wykonuje się na populacjach komórek wypreparowanych w różnych odstępach czasu od momentu stymulacji. W ten sposób można scharakteryzować kinetykę aktywacji genów. Stwierdzenie relatywnie małej liczby cząsteczek mRNA istotnych komponentów ścieżki sygnalizacyjnej sugeruje dużą heterogenność odpowiedzi w populacji komórek.

22.3.3. Techniki analizy białek w komórce

Określanie ilości białek oraz ich stanu modyfikacji potranslacyjnych (np. fosforylacji na określonych rezydualach) jest zazwyczaj dokonywane za pomocą techniki Western blot. W metodzie tej komórki są poddawane lizie, dzięki której uwolnione zostają zawarte w nich białka. Białka te są następnie poddawane denaturacji i elektroforetycznej separacji na żelach poliakryloamidowych. Po transferze z żelu na specjalne błony poszczególnie

białka mogą być uwidocznione za pomocą specyficznych przeciwciał sprzężonych z enzymem, który w miejscu oznaczanego białka produkuje fluorescencyjny lub barwny produkt. Powstałe w ten sposób prążki odbite na kliszy fotograficznej lub rejestrowane cyfrowo mogą być następnie analizowane ilościowo lub półilościowo (za pomocą pomiarów densytometrycznych).

Analiza bezpośredniej interakcji między białkami może być eksperymentalnie weryfikowana np. za pomocą immunoprecypitacji kompleksów białkowych (ang. *protein complex immunoprecipitation*, Co-IP). W metodzie tej poziom różnych kompleksów białkowych zawierających interesujące nas białko *X* określane jest poprzez wychwycenie białka *X* za pomocą przeciwciał związanych na złożu agarozowym. Następnie za pomocą techniki Western blot (przy użyciu specyficznych przeciwciał) określane jest poziom białek związanych z wychwyconym białkiem *X*.

22.3.4. Techniki analizy białek wydzielanych przez komórkę

Komórki po stymulacji często uwalniają małe białka zwane cytokinami, które mogą wpływać na zachowanie się komórek uwalniającej (sygnalizacja autokrylna), otaczających komórek (sygnalizacja parakrylna) lub nawet bardziej odległych komórek i narządów (sygnał endokrylny). Eksperymentalnie ilości uwolnionych cytokin i innych cząsteczek można precyzyjnie określić stosując test immunoenzymatyczny, ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Jest to rodzaj testu immunologicznego (tj. wykorzystującego przeciwciała) opierającego się na podobnej zasadzie co Western blot. Medium zebrane z naczynia, w którym przebywały stymulowane komórki, przenosi się do płytki wielodołkowej pokrytej specjalnym przeciwciałem zaprojektowanym do przechwytywania docelowej cytokiny. Następnie wymywa się z dołków medium wraz z niezwiązanymi białkami, i aplikuje kolejne zestawy przeciwciał: pierwszorzędowe (również wiąże pożądaną cytokinę), a potem przeciwciała drugorzędowe (wiążące przeciwciała pierwszorzędowe) sprzężone z enzymem prowadzącym reakcję fluorescencyjną lub barwną. Intensywność zabarwienia pojawia się proporcjonalnie do ilości białka związanego przez przeciwciała i może być odczytywana przez czytnik spektrofotometryczny. Jako że seryjne rozcieńczenia standardowego białka są analizowane jednocześnie z badanymi próbkami, możliwe jest wygenerowanie krzywej wzorcowej i obliczenie z jej użyciem stężenia cytokiny. Modyfikacja testu ELISA w postaci testu ELISPOT (ang. *enzyme-linked immunospot assay*) łączy cechy metody analizy populacyjnej i analizy pojedynczych komórek, ponieważ umożliwia wizualizację poszczególnych komórek wydzielających cytokiny. Osiąga się to przez wysianie komórek na membranę pokrytą przeciwciałami, które przechwytyują cytokinę uwalnia-

ną z komórek po stymulacji. Dalszą detekcję przeprowadza się w podobny sposób do testu ELISA, co skutkuje powstaniem kolorowych plam w miejscach, gdzie cytokina została wydzielona. Wyniki mogą informować o liczbie i przestrzennym rozmieszczeniu komórek wydzielających daną cytokinę.

22.3.5. Mikroskopia fluorescencyjna – badanie odpowiedzi pojedynczych komórek

Do zrozumienia procesów regulatorowych istotna jest analiza sygnalizacji na poziomie pojedynczych komórek. Jest to kluczowe w przypadku, gdy pod wpływem sygnału komórki dzielą się na jakościowo różne podpopulacje. Wtedy dane populacyjne nie opowiadają żadnemu z procesów zachodzących w pojedynczych komórkach. Wśród metod wykorzystywanych do wizualizacji procesów na poziomie pojedynczych komórek najbardziej popularne są metody wykorzystujące mikroskopię fluorescencyjną. Komórki można zaszczepiać, stymulować i utrzymywać na szkiełkach mikroskopowych, a wybrane białka można „zabarwić” używając przeciwciał (jest to zatem kolejna forma immunobarwienia, tak jak Western blot i ELISA/ELISPOT). W tym przypadku przeciwciała drugorzędowe sprzężone są z fluorochromami (barwnikami fluorescencyjnymi), które pochłaniają energię światła o określonej długości fali i emitują światło o dłuższej fali. Mikroskopy fluorescencyjne lub ich zaawansowana modyfikacja, mikroskopy konfokalne, są wyposażone w kilka źródeł światła (zazwyczaj są to lasery lub LED wysokiej mocy) o różnych długościach fali, detektory i wzmacniacze sygnału, i są zdolne do jednoczesnej wizualizacji kilku białek. Pozwala to na obserwację obecności i lokalizacji tych białek, ich współwystępowania z innymi barwionymi białkami, a nawet ich stanu aktywacji (gdy stosuje się przeciwciała specyficzne dla aktywnej formy białka, np. sfosforylowanej) w każdej komórce w badanej populacji.

Oprogramowanie do przetwarzania obrazu mikroskopowego może być wykorzystane do uzyskania informacji dotyczących poziomu i lokalizacji białek. Poza pojedynczymi białkami, całe przedziały i struktury subkomórkowe (takie jak jądra lub cytoszkielet) mogą być barwione przy użyciu cząsteczek fluorescencyjnych nie będących przeciwciałami. Barwienie kwasów nukleinowych jest możliwe z kolei przy użyciu sond FISH (ang. *fluorescent in situ hybridization*). Są to fragmenty DNA i RNA znakowane fluorochromem z dużą komplementarnością do sekwencji docelowej. Zastosowanie sond jest podobne do technik opartych na przeciwciałach i może dostarczyć danych dotyczących obecności określonych markerów genowych lub zakażeń wirusowych, a także, poprzez wiązanie z mRNA, ujawnić przestrzenne i czasowe wzorce ekspresji genów (jako alternatywa do metody RT-PCR).

22.3.6. Cytometria przepływowa

Inną metodą wykorzystywaną przeciwciał znakowanych fluorochromami jest cytometria przepływowa. Komórki znakowane, podobnie jak w przypadku mikroskopii fluorescencyjnej, zawieszają się w strumieniu cieczy, która przechodzi przez zautomatyzowany system wykrywania (np. laser-detektor-wzmacniacz). W ten sposób można przeanalizować do kilku tysięcy komórek na sekundę, z natychmiastową kwantyfikacją zestawu parametrów, takich jak intensywność fluorescencji znakujących przeciwciał czy wielkość komórek. Wyniki mogą być prezentowane w postaci histogramu albo dwu- lub trójwymiarowych wykresów punktowych. W ten sposób można ujawnić niejednorodność hodowli komórkowej, na przykład pod względem obecności pewnego receptora na powierzchni komórek. Sortowanie komórek aktywne fluorescencją (ang. *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) idzie o krok dalej i umożliwia fizyczne rozdzielanie populacji analizowanych komórek w oparciu o różnice w analizowanych parametrach. Oba typy cytometrii mają w biologii i medycynie wiele zastosowań, takich jak diagnoza zmian nowotworowych, analiza ekspresji i lokalizacji białek czy pomiar wybuchu tlenowego.

Jednym z powszechnie stosowanych zastosowań cytometrii przepływowej jest pomiar frakcji komórek apoptotycznych. Apoptoza jest procesem zaprogramowanej śmierci komórkowej, zachodzącym powszechnie w organizmach wielokomórkowych i bardzo istotnym z punktu widzenia badań nad chorobami zakaźnymi czy rakiem. Będąc procesem ściśle regulowanym, apoptozie towarzyszy kilka charakterystycznych wydarzeń komórkowych, które mogą być wykorzystane do ilościowego określania frakcji komórek apoptotycznych w badanej populacji i odróżniania ich od komórek nekrotycznych (umierających z powodu uszkodzeń w sposób „nieregulowany”). Przykładową metodą pomiaru apoptozy przy użyciu cytometrii przepływowej jest test aneksyny V, który wykrywa fosfatydyloserynę eksponowaną na powierzchni komórek, które ulegają apoptozie.

22.3.7. Badania przyżyciowe na pojedynczych komórkach

Omówione metody analizy poziomu białek dają wgląd w heterogenność populacji komórek, ale nie pozwalają na analizę odpowiedzi pojedynczych komórek w czasie. Można to uzyskać poprzez użycie komórek, które przy użyciu technik inżynierii genetycznej zostały zmodyfikowane do ekspresji białek połączonych z fluorescencyjnym reporterem. W ten sposób ekspresję i lokalizację białka można obserwować w czasie rzeczywistym przy użyciu mikroskopu wyposażonego w komorę hodowlaną z regulowaną temperaturą i atmosferą. Wadą tej metody jest silna ingerencja w badany układ. Na przy-

kład analiza translokacji ważnego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B wymaga uzyskania linii wyrażającej zamiast białka RelA (będącego podjednostką NF- κ B) białko RelA połączone z fluorescencyjnym białkiem znacznikowym. Nie należy oczekiwać, że takie zmodyfikowane białko zachowa wszystkie funkcje oryginalnego białka.

22.4. Matematyczny opis dynamiki sieci regulatorowych

W tej sekcji omówimy podstawowe narzędzia wykorzystywane do matematycznego opisu dynamiki sieci regulatorowych, takie jak równania różniczkowe zwyczajne i cząstkowe, oraz procesy Markowa. Szczegółowe opracowanie tych metod można znaleźć w książkach [3–5].

22.4.1. Równania różniczkowe zwyczajne

Podstawowym narzędziem wykorzystywanym do opisu dynamiki sieci regulatorowych są układy równań różniczkowych zwyczajnych wynikające z prawa działania mas. Rozważane przez nas modele opisane są przez równania, które, tak jak poniższe równanie, zawierają człony trzech typów:

$$\frac{dX(t)}{dt} = aY(t)Z(t) - b\frac{X(t)}{K + X(t)} - cX(t).$$

Pierwszy człon wyraża syntezę produktu X (o stężeniu $X(t)$) w wyniku łączenia się substratów Y i Z (o stężeniach $Y(t)$ i $Z(t)$). Zgodnie z prawem działania mas powstawanie kompleksów X jest proporcjonalne do iloczynu stężeń reagujących substratów. Drugi człon opisuje ubytek kompleksu X na skutek reakcji katalizycznej typu Michaelisa-Menten; $b \times X(t)$ odpowiada maksymalnej szybkości reakcji osiągananej, gdy $X(t) \ll K$, zaś stała Michaelisa K odpowiada stężeniu substratu, przy którym reakcja osiąga połowę swojej maksymalnej szybkości. Ostatni człon opisuje spontaniczną degradację X z tempem c . Człon typu Michaelisa-Menten powstaje jako przybliżenie trzech reakcji: formowania kompleksu enzym-substrat, konwersji substratu do produktu przez enzym oraz rozpadu kompleksu enzym-produkt [2].

22.4.2. Równania różniczkowe cząstkowe

Opis poprzez równania różniczkowe zwyczajne jest uzasadniony, gdy reaktor (komórka bądź wyszczególniony przedział subkomórkowy) może być traktowany jako dobrze wymieszany, a liczba reagujących cząsteczek jest duża. W rzeczywistości oba kryteria rzadko są spełnione. Reaktor można traktować jako dobrze wymieszany, gdy charakterystyczny czas dyfuzji,

$T_d = L^2/D$, tj. czas, w którym cząsteczka o współczynniku dyfuzji D pokonuje średnio dystans równy średnicy reaktora L , jest mniejszy niż charakterystyczny czas reakcji T_r , będący odwrotnością tempa reakcji (w reaktorach chemicznych dobre wymieszanie może być uzyskane na skutek wymuszonych przepływów turbulentnych). W przeciwnym wypadku możemy oczekiwać, że stężenia substratów istotnie zależą od ich położenia. W takim przypadku właściwym sposobem opisu są równania różniczkowe cząstkowe typu reakcji-dyfuzji:

$$\frac{dX(\vec{r}, t)}{dt} = D\nabla^2 X(\vec{r}, t) + f(X(\vec{r}, t)),$$

gdzie funkcja $f(X(\vec{r}, t))$ opisuje procesy reakcji biochemicznych. Stosunkowo często można podzielić komórkę na przedziały, w których stężenia substratów są przestrzennie jednorodne, i dzięki temu zastąpić równania cząstkowe równaniami zwyczajnymi w poszczególnych przedziałach, z dodatkowymi członami transportu między przedziałami [6].

22.4.3. Procesy Markowa

Zastosowanie procesu stochastycznego do opisu układów biologicznych pozwala na uwzględnienie losowych fluktuacji stężeń molekuł, a tym samym na analizę heterogenności odpowiedzi komórek, niewidoczną w opisie poprzez równania różniczkowe. Do opisu sieci regulatorowych używa się procesów Markowa z czasem ciągłym, w którym dyskretna przestrzeń stanów procesu zdefiniowana jest przez liczby molekuł poszczególnych typów. Niech $P^{\Delta t}(x_1 \rightarrow x_2)$ określa prawdopodobieństwo przejścia w interwale czasu Δt pomiędzy x_1 i x_2 należącymi do przestrzeni stanów. Zgodnie z definicją jednorodnego procesu Markowa $P^{\Delta t}(x_1 \rightarrow x_2)$ nie zależy ani od bieżącego czasu t ani od historii przejść między stanami poprzedzającej osiągnięcie stanu x_1 [7]. Intensywności przejść, zdefiniowane jako pochodne prawdopodobieństw przejść:

$$p(x_1 \rightarrow x_2) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P^{\Delta t}(x_1 \rightarrow x_2)}{\Delta t},$$

związane są ze stałymi reakcji w opisie deterministycznym. Rozważmy prosty przykład, w którym dwa rodzaje białek, A i B, mogą tworzyć kompleks AB. Niech x_1 oznacza stan układu, w którym liczby molekuł A, B i kompleksu AB wynoszą odpowiednio N_A , N_B i N_{AB} , a x_2 stan, w którym liczby molekuł A, B i kompleksu AB wynoszą odpowiednio $N_A - 1$, $N_B - 1$ i $N_{AB} + 1$. W tym przypadku intensywności przejść spełniają $p(x_1 \rightarrow x_2) = k_C N_A N_B$ i $p(x_1 \leftarrow x_2) = k_D (N_{AB} + 1)$ gdzie k_C jest stałą asocjacji A i B, a k_D stałą dysocjacji kompleksu AB.

Ewolucję prawdopodobieństw $P(X(t))$ poszczególnych stanów układu opisuje równanie M (ang. *chemical master equation*) [5]:

$$\frac{dP(X(t) = x)}{dt} = \sum_{x'} [p(x, x') P(X(t) = x') - p(x', x) P(X(t) = x)],$$

gdzie $p(x, x')$ jest intensywnością przejścia ze stanu x' do stanu x . W powyższym równaniu sumowanie odbywa się po wszystkich stanach x' , z których możliwe jest przejście do stanu x bądź do których możliwe jest wyjście (w ramach jednej reakcji) ze stanu x . Matematycznie, równanie to jest tak zwanym równaniem perspektywnym dla ciągłych w czasie łańcuchów Markowa. Równanie M można rozwiązać jedynie dla niektórych układów, dlatego do analizy używa się zwykle symulacji numerycznych, pozwalających uzyskać trajektorie realizacji procesu Markowa w oparciu o algorytm Gillespiego [8]. Prawdopodobieństwa stanów można wtedy oszacować na podstawie dużej liczby trajektorii. Pierwszym krokiem algorytmu jest zadanie początkowych liczb molekuł i stałych reakcji definiujących intensywności przejść pomiędzy możliwymi stanami układu. Następnie na podstawie intensywności przejść losowana jest kolejna reakcja oraz z rozkładu wykładniczego czas jej zajęcia. Po wykonaniu wylosowanej reakcji adekwatnie aktualizowane są liczby molekuł w układzie i tym samym intensywności przejść. W kolejnych krokach symulacji losowanie czasu i typu reakcji oraz aktualizacja liczb molekuł powtarzane są iteracyjnie. Jako że algorytm jest obliczeniowo kosztowny, powstało wiele jego modyfikacji skracających czas obliczeń za cenę dokładności [9]. Algorytm Gillespiego został zaimplementowany w wielu narzędziach do symulacji stochastycznych, np. BioNetGen [10], oraz w postaci bibliotek dla języków R i Python [11, 12].

22.4.4. Procesy Markowa w przestrzeni

Czwartym, najbardziej dokładnym, ale też najbardziej wymagającym obliczeniowo sposobem opisu sieci regulatorowych jest opis poprzez procesy Markowa z rozdzielczością przestrzenną. W opisie tym stan układu określony jest nie tylko poprzez liczbę molekuł danego typu, ale również przez ich pozycję w komórce. Rozpatrywanie modeli stochastycznych w układach niejednorodnych bez rozdzielczości przestrzennej nie ma sensu. Okazuje się, że nawet gdy liczba cząsteczek w układzie jest duża, efekty stochastyczne mogą odgrywać lokalnie decydującą rolę. W pracy Kochońcuka i in. [13] pokazujemy, że lokalna aktywacja bistabilnego układu prowadzi do aktywacji globalnej na skutek propagacji fali biegnącej. Co więcej, w odróżnieniu od układów dobrze wymieszanych, dla których prawdopodobieństwo aktywacji maleje wykładniczo z rozmiarem układu, prawdopodobieństwo inicjacji

fali aktywującej rośnie wraz z rozmiarem układu. Istnieje szereg narzędzi numerycznych pozwalających na symulacje układów stochastycznych z rozdzielczością przestrzenną [14–18]. Zastosowane algorytmy są jednakże albo przybliżone, albo bardzo kosztowne numerycznie.

22.4.5. Modelowanie oparte na regułach (ang. *rule-based modeling*)

Białka, których interakcje tworzą sieci regulatorowe, same mają złożoną strukturę wewnętrzną, a niektóre ich rezylidua aminokwasowe mogą podlegać chemicznym modyfikacjom. Potranslacyjnym modyfikacjom ulega 15 spośród 20 typów aminokwasów białkowych. Do modyfikacji potranslacyjnych zaliczamy między innymi fosforylację, acetylację, hydroksylację, ubikwitynację czy glikozylację [2]. Modyfikacje te mogą wpłynąć na aktywność białka, stabilność, właściwości fizykochemiczne. Na nieco wyższym poziomie można wyróżnić domeny pełniące określone funkcje regulatorowe, katalityczne lub strukturalne. Wszystkie te elementy składowe mogą potencjalnie występować w różnych stanach i pełna charakterystyka danej cząsteczki białka wymaga ich zdefiniowania. Reakcje opisujące zmiany tych stanów mogą zachodzić niezależnie od siebie lub być uzależnione od konkretnych stanów innych elementów białka. W zależności od białka aminokwasy mogą być fosforylowane niezależnie od siebie bądź też fosforylacja jednych aminokwasów może wymagać sfosforylowania innych, tworzących uprzednio miejsce wiązania odpowiedniej kinazy. Ten stan rzeczy znacząco komplikuje opis systemu. Przykładowo kinaza CRAF posiada co najmniej 5 istotnych miejsc fosforylacji, zatem może istnieć w $2^5 = 32$ stanach; co więcej, kinaza ta tworzy heterodimery z kinazą BRAF również posiadającą 5 istotnych miejsc fosforylacji, co oznacza, że liczba potencjalnych typów dimerów wynosi $(2^5)^2 = 2^{10}$. Stan układu jest zatem zadany przez podanie ponad 2^{10} zmiennych określających liczby monomerów i heterodimerów w każdym ze stanów. Oznacza to, że w opisie deterministycznym taki układ wymaga ponad 1000 równań różniczkowych.

Zadanie tak dużego układu wymaga zastosowania modelowania oparteo na regułach, które pozwala w stosunkowo prosty sposób zapisać reakcje z uwzględnieniem wielu stanów zarówno poszczególnych białek, jak i innych substratów, np. genów. Występujące w układzie cząsteczki reprezentowane są jako obiekty o określonej strukturze zawierającej informację zarówno o ich transformacjach i stanach konformacyjnych lub chemicznych, takich jak fosforylacja, jak i o tworzeniu kompleksów z innymi cząsteczkami. Dla każdego typu reakcji zachodzącej w układzie formułowane są reguły. Reguły mogą być wspólne dla molekuł danego typu niezależnie od ich stanu, bądź różne w zależności od stanu molekuł biorących udział w reakcji. Możliwość

zastosowania jednej wspólnej reguły dla wielu możliwych stanów molekuly znacząco redukuje zapis modelu.

Jednym z narzędzi wykorzystywanych do modelowania opartego na regułach jest program BioNetGen [10]. Pozwala on na zdefiniowanie modelu za pomocą reguł, według których generowane są reakcje biochemiczne. Program umożliwia przeprowadzenie symulacji numerycznych zarówno stochastycznych (z użyciem algorytmu Gillespiego), jak i ich przybliżeń deterministycznych (poprzez całkowanie równań różniczkowych zwyczajnych). Metoda ta pozwoliła nam na analizę złożonych modeli układów biochemicznych [19, 20]. W pierwszej pracy analizowany model aktywacji receptorów limfocytów typu B opisany był układem przeszło 1000 równań różniczkowych.

BioNetGen używa metod symulacji, które są właściwe, kiedy dyfuzja cząsteczek w badanym układzie jest na tyle duża, że reaktor, w którym zachodzą modelowane reakcje, czyli komórka lub przedział subkomórkowy, można uznać za dobrze wymieszany. Do opisu i symulacji układów, dla których efekty przestrzenne są istotne, stworzyliśmy pakiet SPATKIN [14]. Pakiet ten umożliwia analizę procesów biochemicznych w układach białek zlokalizowanych na błonie komórkowej. Ograniczona dyfuzja reagujących ze sobą białek błonowych prowadzi do powstania niejednorodności przestrzennych, które mają istotny wpływ na dynamikę układu i proces przekazywania sygnału. Pakiet SPATKIN uwzględnia jednocześnie niejednorodności rozkładu substratów oraz stochastyczność procesu wynikającą z małej liczby reagujących cząsteczek. Modele specyfikowane są przez użytkownika w oparciu o reguły w języku będącym rozszerzeniem języka BioNetGen, co umożliwia uwzględnienie efektów przestrzennych symulowanych procesów.

22.5. Elementy regulatorowe i ich funkcje

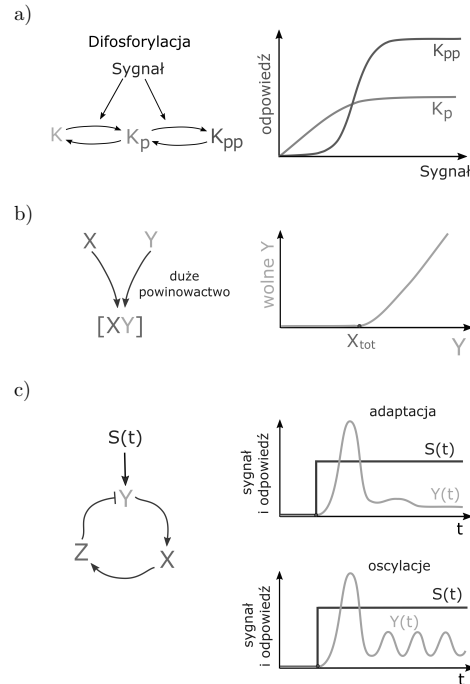
Sieci regulatorowe kodują i bezbłędnie przetwarzają informacje o stanie fizjologicznym komórki oraz o jej otoczeniu, a następnie uruchamiają adekwatną odpowiedź. Tworzą niezwykle złożoną strukturę składającą się z tysięcy oddziaływań. Poszukiwanie reguł rządzących tymi oddziaływaniami jest możliwe dzięki rozwojowi technik eksperymentalnych opisanych w poprzednich sekcjach. Okazuje się, że można sformułować ogólne zasady działania sieci regulatorowych, ponieważ składają się one z powtarzalnych elementów – motywów, z których zbudowana jest każda złożona sieć regulatorowa. Wyodrębnienie takich powtarzalnych elementów ułatwia intuicyjne zrozumienie działania bardziej skomplikowanych układów. Szczegółowe omówienie działania podstawowych motywów regulatorowych można znaleźć w [21]. W tej sekcji przybliżymy działanie najczęściej występujących elementów regulatorowych zilustrowanych na przykładach badanych przez nas układów.

22.5.1. Modyfikacje potranslacyjne

Istotnym mechanizmem przekazu sygnałów są potranslacyjne odwracalne modyfikacje białek. W tym kontekście najistotniejszą modyfikacją jest fosforylacja, której mogą ulegać 3 aminokwasy: seryna, treonina i tyrozyna. Fosforylacja katalizowana jest przez enzymy zwane kinazami, a defosforylacja katalizowana jest przez fosfatazy. Poszczególne aminokwasy białka mogą podlegać wielokrotnej przemianie między formą sfosforylowaną i niesfosforylowaną, z szybkością zależną od aktywności kinaz i fosfataz specyficznych dla danego białka i miejsca fosforylacji w komórce. Fosforylacja często prowadzi do aktywacji białek, w szczególności kinaz. Mechanizm ten odpowiedzialny jest za funkcjonowanie tzw. kaskad kinazowych. Wiele kaskad zaczyna się na poziomie receptorów – białek aktywowanych zwykle na skutek przyłączenia określonego liganda. Dla receptorów błonowych aktywującymi ligandami są m.in. cytokiny wydzielane przez inne komórki (regulacja parakrylna). Aktywacja receptora prowadzi do fosforylacji/aktywacji oddziałujących z nim kinaz, które następnie przekazują sygnał do kolejnej warstwy kinaz innego typu. Kaskady sygnałowe umożliwiają wzmocnienie sygnału. W pracach Lipniackiego i in. [22] i Taya i in. [23] przewidzieliśmy teoretycznie, a następnie wykazaliśmy eksperymentalnie, że aktywacja pojedynczych receptorów cytokiny TNF prowadzi poprzez kaskadę sygnalizacyjną do aktywacji dziesiątek tysięcy molekuł czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i tym samym aktywacji szeregu genów.

22.5.2. Podwójna fosforylacja/modyfikacja białek

Jedną z najważniejszych i najintensywniej badanych kaskad sygnałowych jest kaskada MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*). Kaskada ta odgrywa kluczową rolę w aktywacji podziału komórki i pomocniczą w szeregu innych procesów komórkowych. Cechą charakterystyczną tej kaskady jest konieczność podwójnej fosforylacji kinaz występujących w kaskadzie: MEK (przez kinazę RAF) i ERK (przez MEK); pojedynczo sfosforylowane kinazy MEK i ERK wykazują znikomą aktywność katalityczną. Konsekwencje takiej regulacji przedstawione są na rys. 22.2a. Dla niskiego poziomu sygnału liczba pojedynczo sfosforylowanych kinaz MEK rośnie liniowo wraz z poziomem sygnału, a liczba kinaz podwójnie sfosforylowanych rośnie kwadratowo wraz z sygnałem. Jako że ten sam mechanizm występuje w kinazie ERK sfosforylowanej przez MEK, liczba cząsteczek aktywnej kinazy ERK jest proporcjonalna do czwartej potęgi poziomu sygnału. Podwójna fosforylacja wprowadza więc nieliniowość, która powoduje ignorowanie małych sygnałów, a wzmocnienie silnych.



Rys. 22.2. Elementy regulatorowe – charakterystyczne odpowiedzi układu.

22.5.3. Kinetyka wysycenia

O kinetyce wysycenia mówimy w sytuacji, gdy dwa substraty X i Y wiążą się ze sobą z dużym powinowactwem (rys. 22.2b). Zmiany ilości wolnego Y zależą od ilości Y w stosunku do X. Jeśli poziom Y jest mniejszy niż X, to ilość wolnego Y jest znikoma. Wolny Y pojawi się, gdy pod wpływem sygnału poziom całkowitego Y przekroczy poziom całkowitego X. Jest to jeden z najprostszych mechanizmów nieliniowej odpowiedzi na sygnał. Taki mechanizm występuje na przykład w regulacji NF- κ B. W niestymulowanych komórkach poziom inhibitora I κ B α przekracza poziom NF- κ B, które wiąże się z nim z dużym powinowactwem i w kompleksie pozostaje nieaktywne. W odpowiedzi na sygnał (np. stymulację cytokiną TNF) I κ B α jest degradowane. Gdy jego poziom spadnie poniżej poziomu NF- κ B, pojawia się wolne

NF- κ B, które może być translokowane do jądra, gdzie aktywuje ekspresję genów istotnych w odpowiedzi odpornościowej. W rezultacie ilość NF- κ B translokowalnego do jądra zależy nieliniowo od wartości sygnału.

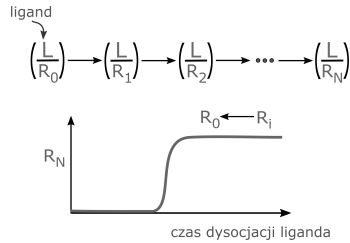
22.5.4. Ujemne sprzężenie zwrotne

Przetwarzanie sygnału w komórce zależy od topologii sieci interakcji i skal czasowych pętli sprzężeń zwrotnych. Powszechnie występujące sprzężenia ujemne zapewniają homeostazę komórki. Skutkiem stosunkowo szybkiego ujemnego sprzężenia jest pulsowa odpowiedź, a następnie adaptacja układu do stałego sygnału, tj. powrót w pobliże stanu sprzed występowania sygnału (rys. 22.2c). Sprzężenia ujemne związane ze znacznymi opóźnieniami mogą prowadzić do występowania w komórce gasnących bądź niegasnących oscylacji (cykli granicznych). Przykładem takiej regulacji jest ścieżka NF- κ B. Stymulacja prowadzi do aktywacji NF- κ B poprzez degradację jego inhibitora I κ B α . W ścieżce kluczową rolę odgrywa ujemne sprzężenie zwrotne NF- κ B–I κ B α : czynnik transkrypcyjny NF- κ B aktywuje transkrypcję I κ B α , które następnie wiąże NF- κ B wyłączając jego aktywność transkrypcyjną. Szereg pośrednich procesów, takich jak synteza mRNA I κ B α , jego redagowanie (ang. *splicing*), translokacja do cytoplazmy i translacja wprowadzają opóźnienie umożliwiające występowanie oscylacji [24]. Podobne oscylacje obserwowane są w układzie czynnika transkrypcyjnego p53 i jego inhibitora Mdm2 [25].

22.5.5. Kinetyczna weryfikacja

Mechanizm kinetycznej weryfikacji pozwala wychwycić nawet niewielkie różnice w powinowactwie ligandów do receptora. Wiązanie liganda do receptora inicjuje ciąg transformacji. Każda kolejna transformacja wymaga obecności liganda, aktywacja receptora następuje dopiero po ostatniej, n -tej transformacji. Załóżmy, że stała dysocjacji liganda wynosi k_D , a stała reakcji dla każdej transformacji wynosi k . Wtedy prawdopodobieństwo pokonania dowolnego kroku transformacji (pod warunkiem, że kroki wcześniejsze zostały pokonane) wynosi $p_0 = k/(k + k_D)$. Zatem prawdopodobieństwo aktywacji receptora wynosi $p = (p_0)^n$, czyli dla dużego n silnie maleje wraz ze wzrostem stałej dysocjacji k_D .

Mechanizm ten występuje w procesie aktywacji limfocytów T typu killer. Limfocyty T skanują powierzchnie innych komórek w poszukiwaniu antygenów – fragmentów obcych białek, na przykład białek wirusa. Mechanizm kinetycznej weryfikacji umożliwia wykrycie nawet niewielkiej liczby obcych antygenów o długim czasie wiązania (małym k_D) na tle dużej liczby związanych własnych antygenów, które mając krótszy czas wiązania nie są



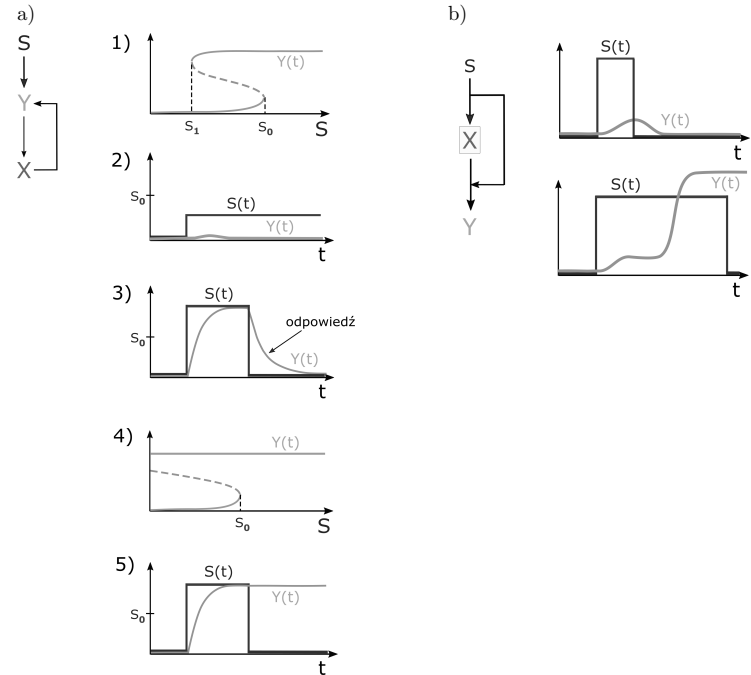
Rys. 22.3. Kinetyczna weryfikacja.

w stanie przejść kinetycznej weryfikacji i doprowadzić do aktywacji receptora. Mechanizm ten jest dodatkowo wspomagany przez sprzężenie dodatnie, w którym uczestniczy aktywny receptor, i sprzężenie ujemne aktywowane na wcześniejszym etapie [26, 27]. Wykrycie obcych antygenów prowadzi do aktywacji limfocytu T killer, który inicjuje apoptozę w komórce prezentującej antygeny. Mechanizm kinetycznej weryfikacji występuje również w aktywacji receptorów w innych komórkach, w elongacji peptydów podczas translacji, w procesie naprawy DNA i degradacji białek w komórkach eukariotycznych (rys. 22.19b i 22.19c).

22.5.6. Sprzężenie zwrotne dodatnie i sprzężenie wyprzedzające

Można wyróżnić dwa typy dodatnich sprzężeń zwrotnych: „klasyczne” dodatnie sprzężenie zwrotne oraz sprzężenie wyprzedzające (rys. 22.4a i 22.4b). Dodatnie sprzężenie zwrotne występujące samodzielnie może wprowadzić do układu bistabilność. Wykresy bifurkacyjne (rys. 22.4a-1 i 22.4a-4) prezentują odpowiednio bistabilność odwracalną i nieodwracalną. Przez s_0 i s_1 oznaczono punkty bifurkacji siodło-węzeł. W przypadku, gdy sygnał $S(t)$ jest mniejszy od s_0 , wówczas odpowiedź $Y(t)$ jest bardzo mała; sygnał zostaje zignorowany, rys. 22.4a-2. Jeżeli sygnał $S(t)$ przekroczy wartość s_0 i będzie przez dostatecznie długi czas pozostawał powyżej tej wartości, wówczas układ zostanie aktywowany, tj. przejdzie do wysokiego stanu stabilnego (górna gałąź diagramu bifurkacyjnego). Układ powróci do stanu początkowego dopiero, gdy sygnał przyjmie wartości poniżej $s_1 < s_0$ (rys. 22.4a-3). System bistabilny konwertuje zatem wejściowy sygnał na jedną z dwóch predefiniowanych odpowiedzi określonych przez stany stabilne układu.

W przypadku bistabilności nieodwracalnej (rys. 22.4a-4), układ po aktywacji pozostanie aktywny nawet jeśli sygnał zostanie wyłączony (rys. 22.4a-5). Taką bistabilność wykorzystuje się do modelowania procesów nieodwracalnych takich jak np. apoptoza.



Rys. 22.4. a) „Klasyczne” dodatnie sprzężenie zwrotne, b) sprzężenie wyprzedzające.

Drugim istotnym typem dodatniego sprzężenia jest sprzężenie wyprzedzające. Sprzężenie to składa się z dwóch równoległych ścieżek regulacji: krótszej oznaczonej jako ścieżka bezpośrednia od sygnału S do Y, oraz dłuższej prowadzącej przez X (rys. 22.4b). Do wzmocnienia sygnału dochodzi tylko w przypadku koincydencji czasowej sygnałów przekazywanych krótszą i dłuższą ścieżką. Sprzężenie wyprzedzające może zatem służyć jako filtr, wzmacniający odpowiednio długo trwający sygnał wejściowy oraz pomijający ten, który jest zbyt krótki. Sprzężenia zwrotne wyprzedzające są wnikliwie omówione w książce Uriego Alona [21].

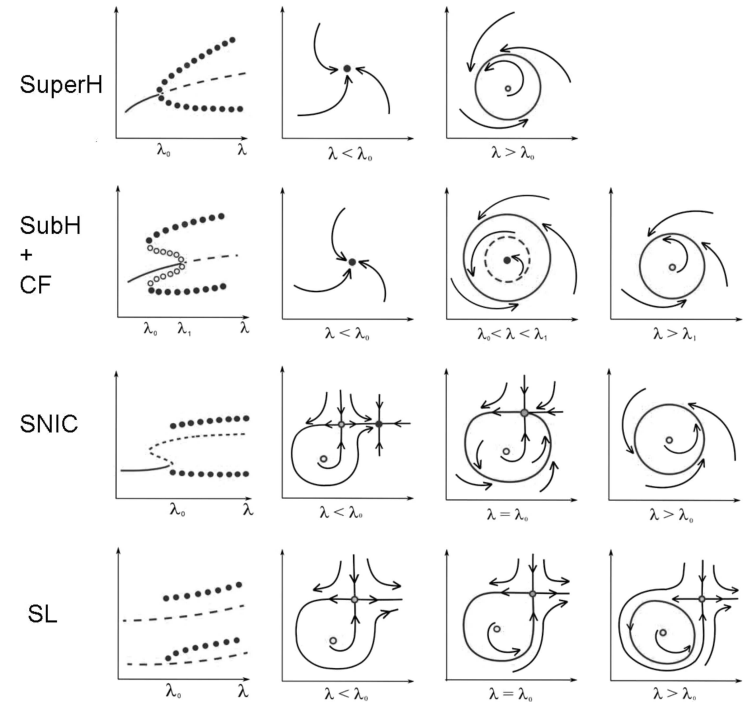
22.5.7. Bifurkacje

Można wyróżnić cztery główne typy bifurkacji kowymiaru 1 (bifurkacje powstałe w wyniku zaburzenia tylko jednego z parametrów) prowadzące

do oscylacji: nadkrytyczną Hopfa (SuperH), podkrytyczną Hopfa (SubH), siodło-węzeł na cyklu niezmienniczym (ang. *saddle-node on invariant circle*, SNIC), oraz bifurkację homokliniczną (ang. *saddle-loop*, SL) [28]:

- W bifurkacji SuperH stabilny cykl graniczny rodzi się z zerową amplitudą i skończonym (niezerowym) okresem w punkcie bifurkacji. Jednocześnie punkt stabilny, w otoczeniu którego narodził się cykl, traci swoją stabilność.
- W bifurkacji SubH stabilny punkt stały traci stabilność w wyniku scalenia z niestabilnym cyklem granicznym. Ten rodzaj bifurkacji jest zazwyczaj związany z bifurkacją siodło-węzeł dla orbit okresowych (ang. *cyclic fold*, CF), w której powstaje para składająca się ze stabilnej i niestabilnej orbity okresowej; para ta znika dla $\lambda \leq \lambda_0$. Powstające orbity mają skończony okres i niezerową amplitudę. Takie układy wykazują histerezę; stabilne i niestabilne oscylacje rodzą się wraz ze wzrostem parametru bifurkacji dla $\lambda \geq \lambda_0$. Oscylacje niestabilne zanikają, gdy parametr bifurkacji przekroczy λ_1 . Dla $\lambda \in (\lambda_0, \lambda_1)$ stabilny stan stały i stabilny cykl graniczny współistnieją.
- W bifurkacji siodło-węzeł na cyklu niezmienniczym (SNIC) w punkcie bifurkacji punkt siodłowy łączy się z niestabilnym stanem stałym prowadząc do powstania orbity homoklinicznej. Orbita ta następnie przekształca się w stabilny cykl graniczny.
- Bifurkacja homokliniczna (SL) jest w pewnym sensie podobna do SNIC; w punkcie bifurkacji powstaje orbita homokliniczna do siodła, która następnie daje początek stabilnemu cyklowi granicznemu. Z racji tego, że cykle graniczne w bifurkacjach SNIC i SL powstają z orbity homoklinicznej okres oscylacji dąży do nieskończoności przy zbliżaniu się parametru bifurkacyjnego do punktu bifurkacji. Należy zauważyć, że minimalny układ wykazujący bifurkację SL nie ma żadnego stabilnego stanu stacjonarnego lub cyklu granicznego dla $\lambda < \lambda_0$. Nie jest więc dobrym kandydatem dla modelu biologicznego.

Bifurkacja SuperH może powstać w układach regulacji mających pojedynczą pętlę sprzężenia zwrotnego ujemnego. Układy wzajemnie połączonych ujemnych i dodatnich pętli sprzężenia zwrotnego mogą generować bifurkację SubH lub SNIC, ale także bifurkację SuperH. Ogólnie rzecz biorąc, układy oparte na bifurkacji SuperH posiadają oscylacje o stosunkowo dobrze zachowanym okresie (który zmienia się powoli wraz z parametrem bifurkacji), ale o zróżnicowanej amplitudzie. Natomiast w przypadku bifurkacji SNIC i SL amplituda jest raczej stała, ale okres oscylacji może być arbitralnie duży.

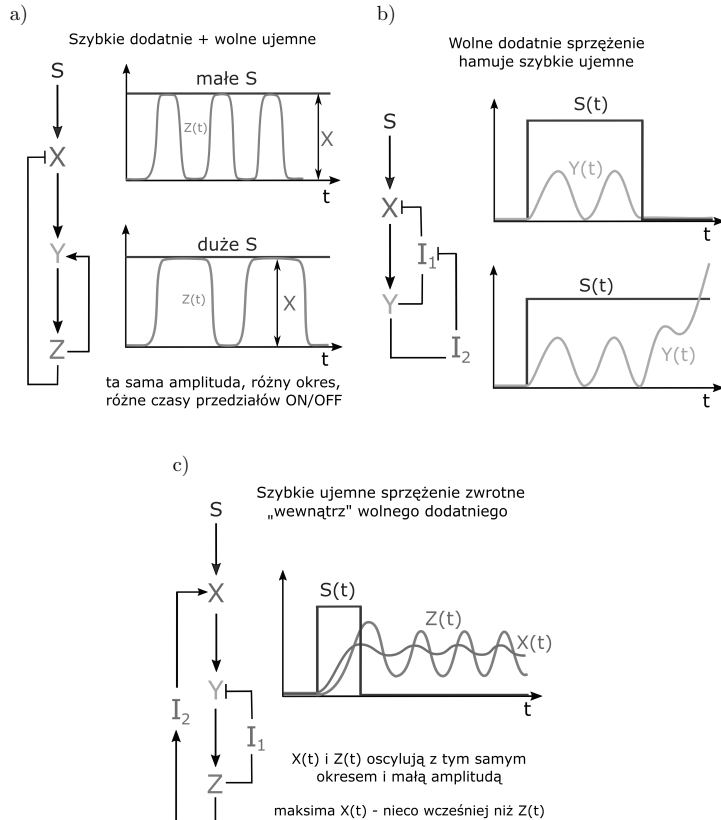


Rys. 22.5. Typy bifurkacji prowadzące do oscylacji.

22.5.8. Kombinacje dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych

Połączenie dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych (rys. 22.6) pozwala na bardziej złożone, jakościowo odmienne typy zachowań. Przedyskutujemy tu trzy, naszym zdaniem najistotniejsze, jakościowo różne przypadki istotne w modelach sieci regulatorowych stworzonych przez naszą grupę.

(i) W przypadku gdy szybka dodatnia pętla sprzężenia zwrotnego ($Y \rightarrow Z \rightarrow Y$) działa w krótkiej skali czasowej i jest osadzona wewnątrz wolnej pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego ($X \rightarrow Y \rightarrow Z \rightarrow X$; rys. 22.5a), układ może przełączać się okresowo pomiędzy dwoma predefiniowanymi stanami, np. aktywnym i nieaktywnym. Stany te wyznaczone są przez punkty stacjonarne układu bez sprzężenia ujemnego. Gdy pojawia się sygnał S o odpowiednio dużej wartości, wówczas układ $Y \rightarrow Z \rightarrow Y$ regulowany dodatnim



Rys. 22.6. Kombinacje dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych.

sprężeniem przechodzi do górnego stanu stacjonarnego. Aktywacja Z powoduje dezaktywację X, a następnie Y i Z; układ $Y \rightarrow Z \rightarrow Y$ powraca do swojego dolnego stanu stacjonarnego. Dezaktywacja Z likwiduje inhibicję X i układ jest znowu podatny na sygnał S. Opisany mechanizm prowadzi do oscylacji Z pomiędzy stanem aktywnym i nieaktywnym. Zauważmy, że amplituda oscylacji jest prawie niezależna od amplitudy sygnału, natomiast frakcja czasu, którą spędza układ w czasie aktywnym, rośnie wraz z sygnałem. W zależności od parametrów, dla odpowiednio dużej amplitu-

dy sygnału układ może trwale przejść do stanu aktywnego. Oscylacje tego typu są spodziewane, jeśli można wyróżnić dwa dobrze zdefiniowane stany, a przełączanie między nimi może mieć funkcję fizjologiczną.

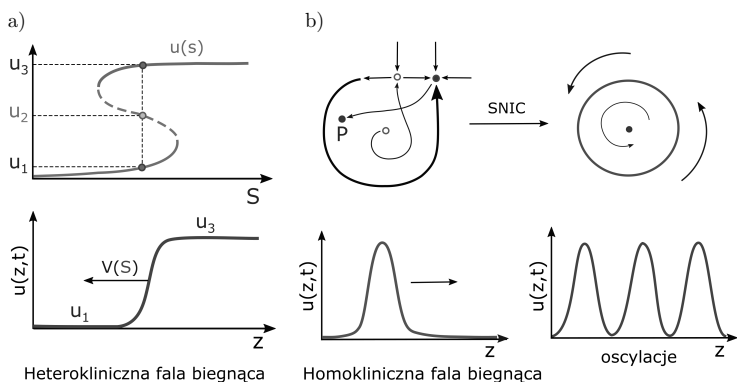
Taką kombinację sprzężeń rozważamy w modelu MAPK [29], w modelu autofagii (przełączenie między stanem translacji a stanem autofagii) [30], w modelu aktywacji limfocytów typu B (przełączenie między stanem aktywnym a nieaktywnym) [19]. Charakterystyczną bifurkacją dla tego typu układu jest bifurkacja siodło-węzeł na cyklu niezmienniczym (SNIC, rys. 22.5). W bifurkacji tej oscylacje rodzą się z niezerową amplitudą i nieskończonym okresem. W punkcie bifurkacji, $\lambda = \lambda_0$, obserwujemy orbitę homokliniczną do siodła, która dla $\lambda > \lambda_0$ zostaje zastąpiona przez cykl graniczny. W zależności od parametrów opisany układ może posiadać (zamiast bifurkacji SNIC) bifurkację subkrytyczną Hopfa oraz CF (rys. 22.5). Tak jak w przypadku bifurkacji SNIC, orbita stabilna ma zawsze amplitudę większą od pewnej krytycznej wartości. Oba przypadki są jakościowo różne od bifurkacji superkrytycznej Hopfa (rys. 22.5), w której oscylacje powstają mając skończony okres i zerową amplitudę.

(ii) W kolejnym przypadku wolna dodatnia pętla sprzężenia zwrotnego ($X \rightarrow Y \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow X$) wyłącza szybsze ujemne sprzężenie zwrotne ($X \rightarrow Y \rightarrow I_1 \rightarrow X$; rys. 22.6b). Pod wpływem sygnału układ przechodzi do fazy oscylacyjnej. Jeżeli czas trwania sygnału jest na tyle krótki, że sygnał nie pokona wolnej pętli dodatniej, oscylacje wygasają i układ powraca do stanu wyjściowego. Natomiast dla długotrwałych sygnałów pętla ujemnego sprzężenia zostaje przerwana i układ przełącza się do stanu różnego od wyjściowego. Można powiedzieć, że faza oscylacyjna zapewnia przedział czasowy zbierania i integracji różnych sygnałów zanim nastąpi przełączenie na inny (potencjalnie nieodwracalny) stan (np. apoptozę). Taką kombinację sprzężeń rozważamy w modelu p53 [31], w którym czas przejścia sygnału przez wolną pętlę to czas, który komórka przeznaczona na naprawę DNA. Jeżeli komórka naprawi DNA, wówczas sygnał S znika i poziom p53 spada. Jeżeli komórka nie naprawi DNA, to po kilku oscylacjach p53 przekracza pewien krytyczny poziom i zainicjowana zostaje apoptoza.

(iii) W przypadku, gdy wolna dodatnia pętla sprzężenia zwrotnego ($X \rightarrow Y \rightarrow Z \rightarrow I_1 \rightarrow X$) obejmuje szybką ujemną pętlę sprzężenia zwrotnego ($Y \rightarrow Z \rightarrow I_1 \rightarrow X$; rys. 22.6c), układ może wykazywać autonomiczne oscylacje. Pod wpływem sygnału S układ zaczyna oscylować. Dzięki dodatniej pętli sprzężenia wzrost poziomu Z zwiększa poziom X. Wzrost X umożliwia dalsze oscylacje nawet po zaniku sygnału S. Istotne jest opóźnienie czasowe pomiędzy Z a S, powodujące wygładzenie oscylacji S i utrzymanie pobudzenia układu na wystarczającym poziomie. Tę kombinację sprzężeń zaproponowaliśmy jako mechanizm dodatniej regulacji autokrynnej poprzez TNF dla szlaku sygnałowego NF- κ B.

22.5.9. Elementy regulatorowe w przestrzeni

Fale biegnące stanowią ważną klasę rozwiązań dla wielu typów układów równań różniczkowych cząstkowych typu reakcji-dyfuzji. Heterokliniczne fale biegnące mogą opisywać procesy przejść fazowych czy budowania się tkanek. Występują w układach bistabilnych. Front heteroklinicznej fali biegnącej przedstawionej na rys. 22.7a łączy dwa stabilne stany stacjonarne, u_1 i u_3 , i przesuwa się w taki sposób, że jeden ze stanów rozprzestrzenia się.



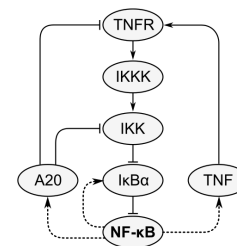
Rys. 22.7. Profil: a) heteroklinicznej i b) homoklinicznej fali biegnącej.

Fale homokliniczne opisują zjawiska polegające na propagacji impulsów i wzbudzeń ośrodka, np. propagację impulsów elektrycznych w układzie nerwowym. Występują często w układach, w których zachodzi bifurkacja SNIC. Rysunek 22.7b, lewa strona, przedstawia portret fazy dla układu posiadającego jeden stan stacjonarny stabilny, oraz punkt siodłowy i węzeł odpychający. Niewielkie odchylenie od stabilnego punktu stacjonarnego (do punktu P) powoduje, że trajektoria musi najpierw okrążyć węzeł zanim wróci do punktu stacjonarnego. Taką nieproporcjonalną do zaburzenia odpowiedź układu określa się jako wzbudzenie. Natomiast w układzie, którego portret fazy jest przedstawiony na rys. 22.7b po prawej stronie, propagują się oscylacje. Oba układy rozdziela bifurkacja SNIC.

22.6. Elementy regulatorowe w działaniu – wybrane studia szlaków sygnałowych

22.6.1. Sieć regulatorowa NF- κ B

NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*) jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym w procesach wrodzonej odporności komórkowej. W przypadku stwierdzenia przez odpowiednie receptory komórkowe obecności czynników pochodzących od patogenów (np. lipopolisacharydów ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych czy wirusowego dwuniciowego RNA) bądź cytokin pro-zapalnych (takich jak IL-1 czy TNF α), NF- κ B jest importowany do jądra komórkowego, w którym uruchamia transkrypcję wielu genów zaangażowanych w walkę z infekcją. Aby umożliwić szybką reakcję obronną, czynnik transkrypcyjny NF- κ B jest stale obecny w komórkach; w zwykłych warunkach braku stresu przebywa on w cytoplazmie w formie nieczynnej, związany ze swoimi inhibitorami – białkami z rodziny I κ B. Molekularny mechanizm inhibicji NF- κ B przez I κ B polega na zasłonięciu sekwencji lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization sequence, NLS*) NF- κ B. Sygnał od receptorów stymulowanych specyficznymi wymienionymi powyżej czynnikami jest przekazywany przez kinazy IKKK i IKK, prowadząc do fosforylacji I κ B (patrz tys. 22.8). Najważniejsza w regulacji NF- κ B izoforma I κ B, czyli I κ B α , jest fosforylowana przez IKK na Ser32 oraz Ser36, w rezultacie czego ulega ubikwitynacji i degradacji w proteasomach w ciągu kilku minut od stymulacji. Degradacja I κ B α prowadzi do odsłonięcia sekwencji NLS w NF- κ B i translokacji czynnika transkrypcyjnego do jądra. Po 15–30 minutach poziom jądrowego NF- κ B osiąga maksimum.



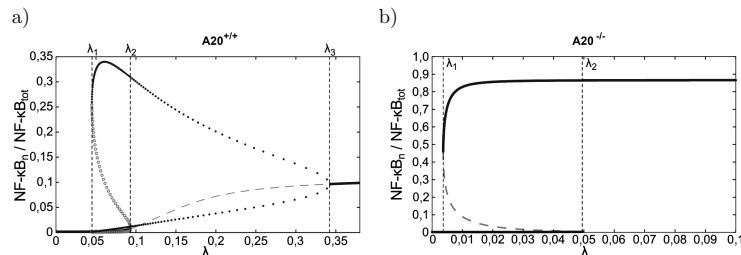
Rys. 22.8. Schemat układu regulatorowego NF- κ B. Linie zakończone grotami strzałek oznaczają oddziaływanie aktywujące, linie zakończone tępymi grotami – oddziaływanie dezaktywujące; linie przerywane oznaczają aktywność transkrypcyjną.

Wśród wczesnych genów, których ekspresję uruchamia NF- κ B, jest gen *NFKB1A*, który koduje I κ B α . Nowo powstałe I κ B α wnika do jądra i two-

rzy kompleks z NF- κ B, który jest transportowany (dzięki sekwencji eksportu w cząsteczce I κ B α) z powrotem do cytoplazmy. To sprzężenie zwrotne ujemne sprawia, że NF- κ B nie pozostaje dłużej w jądrze. Jeżeli kaskada kinaz jest wciąż aktywna, niedawno zsyntetyzowane I κ B α sekwestrujące NF- κ B w cytoplazmie może zostać sfosforylowane przez IKK, prowadząc do powtórzenia się serii powyżej opisanych zdarzeń. Takie następujące po sobie wzbudzenia NF- κ B przejawiają się jako oscylacje cytoplazmatyczno-jądrowe o okresie ok. 100 minut.

Sygnalizacja w kaskadzie kinaz jest kontrolowana przez ligazę ubikwitynową A20, która zarówno dezaktywuje IKK, jak i zatrzymuje aktywację IKKK. NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym *TNFAIP3* (genu A20), a zatem współtworzy z A20 kolejną pętlę sprzężenia zwrotnego ujemnego, modulując sygnalizację pro-zapalną. W komórkach pozbawionych A20, I κ B α jest stale degradowane, co sprawia, że NF- κ B utrzymuje się w jądrze na wysokim poziomie kilka godzin po stymulacji.

NF- κ B jest również czynnikiem transkrypcyjnym dla *TNFA*, czyli genu cytokiny pro-zapalnej TNF- α , która uwolniona z produkujących ją komórek auto- i parakrylnie aktywuje czynnik NF- κ B, współtworząc z nim pętlę sprzężenia zwrotnego dodatniego. W komórkach typu dzikiego mających wysoki poziom ekspresji TNF- α i jednocześnie wysoki poziom receptorów TNF, dochodzi do spontanicznej aktywacji NF- κ B, którego oscylacje (tzn. cyrkulacja między cytoplazmą a jądrem) mogą być podtrzymywane dzięki regulacji autokrynej bez dodatkowej stymulacji zewnątrzkomórkowej. Spontaniczna aktywacja NF- κ B, do której dochodzi w niektórych komórkach w populacji komórek, jest możliwa wskutek stochastyczności włączania i wyłączania genów oraz zróżnicowania poziomów ekspresji receptorów TNF oraz samego NF- κ B.



Rys. 22.9. Diagramy bifurkacyjne przedstawiające zachowanie frakcji NF- κ B oznaczonej NF- κ B_n/NF- κ B_{tot} w funkcji intensywności ekspresji genu TNF, λ : a) w komórkach typu dzikiego posiadających oba allele genu A20 oraz b) w komórkach z knock-outem genu A20.

W komórkach z delecją genu A20 stymulacja względnie niską dawką TNF- α może powodować długotrwałą aktywację NF- κ B. Taki skutek mutacji genu A20 jest przewidziany w pracy Pękalskiego i in. [32] jako jakościowa zmiana struktury bifurkacyjnej naszego modelu matematycznego układu NF- κ B (patrz rys. 22.9), który dla komórek typu dzikiego wykazuje obecność cykli granicznych, natomiast dla komórek z delecją genu A20 wykazuje bistabilność. Długotrwałe podniesiony poziom NF- κ B prowadzi do chronicznego stanu zapalnego oraz utrudnia usuwanie komórek przekształconych nowotworowo, ponieważ NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym dla genów o działaniu anty-apoptotycznym.

22.6.2. Sieć regulatorowa p53

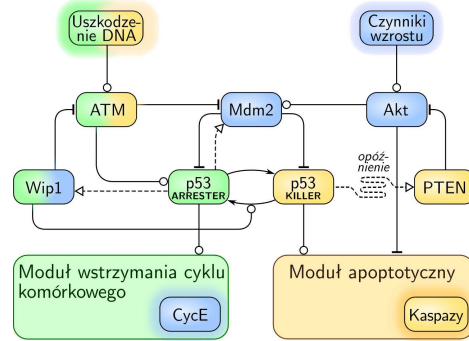
p53 jest jednym z najważniejszych białek supresorowych, które nadzoruje kluczowe procesy komórkowe takie jak zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawa uszkodzeń DNA, oraz, jeżeli uszkodzenia są zbyt duże, inicjację apoptozy.

Główną funkcją p53 jest regulacja procesu transkrypcji. p53 kontroluje ekspresję licznych genów kodujących białka pełniące przeciwstawne role: pro-przeżyciowe lub pro-apoptotyczne. Jego zdolność do regulacji ekspresji poszczególnych typów genów kontrolowana jest przez modyfikacje posttranslacyjne. W szczególności p53 może przyjmować dwa stany fosforylacji: 'p53_{ARRESTER}' (sfosforylowane na Ser15 i Ser20 – działa pro-przeżyciowo) oraz 'p53_{KILLER}' (sfosforylowane na Ser15, Ser20, oraz dodatkowo na Ser46 – działa pro-apoptotycznie). Fosfoforma p53_{ARRESTER} reguluje transkrypcję Mdm2 (swojego głównego inhibitora), p21 (białka zatrzymującego cykl komórkowy przez blokowanie cykliny E), oraz fosfatasy Wip1. Fosfoforma p53_{KILLER} reguluje transkrypcję pro-apoptotycznej fosfatasy PTEN oraz pro-apoptotycznego białka Bax.

Uszkodzenie DNA prowadzi do aktywacji kinazy ATM. Aktywne ATM fosforyluje Mdm2, przyspieszając jego degradację. To stabilizuje i aktywuje p53 przez sfosforylowanie do formy p53_{ARRESTER}. Fosfoforma p53_{ARRESTER} może być następnie sfosforylowana do formy p53_{KILLER}. Fosfoforma p53_{ARRESTER} indukuje syntezę Wip1 podtrzymując w ten sposób sygnał o uszkodzeniu DNA i zatrzymaniu cyklu komórkowego poprzez defosforylację ATM oraz hamuje apoptozę przez ułatwianie defosforylacji p53_{KILLER} do formy p53_{ARRESTER}. Gdy DNA zostanie naprawione, Wip1 umożliwi powrót układu do stanu przed uszkodzeniem DNA. p53_{KILLER} reguluje transkrypcję PTEN. PTEN inhibuje Akt i Mdm2, przez co umożliwia wzrost p53_{KILLER} do poziomu inicjującego apoptozę.

Decyzja o losie komórki z uszkodzonym DNA: model. Skonstruowaliśmy matematyczny model sieci regulatorowej białka p53, pozwalający

zrozumieć, jakie mechanizmy odpowiedzialne są za podejmowanie jednoznacznej decyzji o losie komórki: przeżyciu lub śmierci [31]. Model składa się z trzech modułów: układu głównego oraz dwóch podporządkowanych układów: odpowiedzialnego za zatrzymanie cyklu komórkowego i odpowiedzialnego za apoptozę (patrz rys. 22.10).



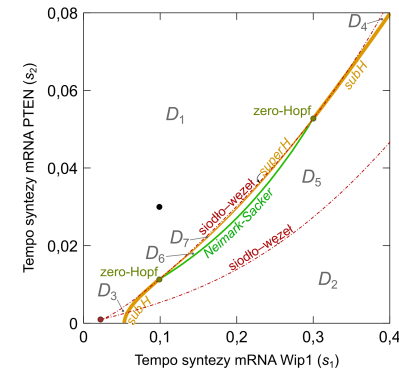
Rys. 22.10. Uproszczony schemat modelu. Linie przerywane zakończone strzałką oznaczają oddziaływania transkrypcyjne; linie ciągłe zakończone strzałką – transformacje białek; linie ciągłe zakończone kołem – pozytywny wpływ lub aktywację; linie ciągłe zakończone tępym grotem – ujemny wpływ. Białka pro-przeżyciowe są przedstawione w niebieskich polach; białka pro-apoptotyczne – w żółtych; białka indukujące zatrzymanie cyklu komórkowego – w zielonych.

W naszym modelu uszkodzenie DNA wywołane jest przez promieniowanie jonizujące. Niewielkie uszkodzenia DNA skutkują tymczasowym zatrzymaniem cyklu komórkowego, a następnie naprawą DNA i powrotem do cyklu komórkowego, podczas gdy rozległe uszkodzenia DNA prowadzą do zatrzymania cyklu komórkowego, a następnie do apoptozy. W przybliżeniu deterministycznym układ regulatorowy reprezentowany jest przez 33 równania różniczkowe zwyczajne, w źródłowym modelu stochastycznym stan układu zadany jest przez liczebności 33 substratów wyrażane w liczbach cząsteczek na komórkę.

Analiza bifurkacyjna modelu. Analiza bifurkacyjna pozwala znaleźć rozwiązania (w tym stabilne stany stacjonarne i cykle graniczne), które określają możliwe tymczasowe odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Osiągnięcie jednoznacznej decyzji o losie komórek jest zapewnione przez bistabilność modułu wstrzymania cyklu komórkowego, modułu apoptotycznego, oraz przede wszystkim przez szczególnie typ bistabilności modułu głównego (bistabilność rozumiana jako współistnienie dwóch stabilnych stanów ustalonych

lub współistnienie jednego stabilnego stanu ustalonego i jednego stabilnego cyklu granicznego).

Moduł główny. Moduł ten kontrolowany jest przez fosfatazy Wip1 i PTEN, których poziomy ekspresji różnią się zasadniczo wśród komórek nowotworowych. Z tego powodu współczynniki syntezy Wip1 i PTEN wybraliśmy jako parametry bifurkacyjne. Dodatkowo, PTEN wykazuje wolną dynamikę w porównaniu z innymi zmiennymi modelu, a jego stopniowa akumulacja po uszkodzeniu DNA kontroluje zachowanie całego układu. W rezultacie można przewidzieć zachowanie układu poprzez analizę bifurkacyjną, w której PTEN jest parametrem bifurkacyjnym. Struktura bifurkacyjna modułu głównego umożliwia współistnienie stabilnego cyklu granicznego oraz stabilnego stanu ustalonego. Taka struktura w procesie podejmowania decyzji o losie komórki pozwala komórkom na bezpośrednie przełączenie z cyklu granicznego (oscylacje p53ARRESTER i p53KILLER indukujące zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawę uszkodzeń DNA) do apoptotycznego stanu stabilnego. Próg apoptotyczny przekroczony zostaje tylko dla „wysokiego” stanu ustalonego p53KILLER i „niskiego” stanu ustalonego sfosforylowanego Akt.

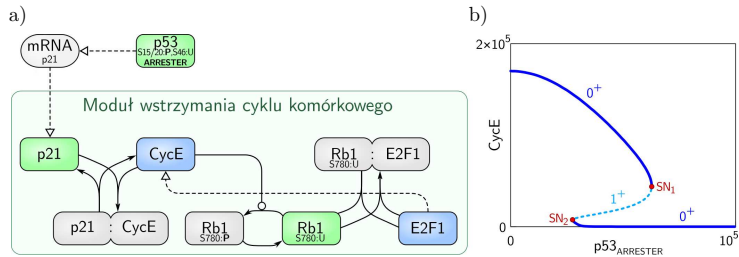


Rys. 22.11. Dwuwymiarowy diagram bifurkacji. Czarna kropka wskazuje wartości nominalne parametrów s_1 i s_2 . Linie bifurkacji dzielą obszary parametrów na siedem podobszarów D_1, \dots, D_7 .

Ten rodzaj regulacji zapewnia, że decyzja o losie komórek jest nieodwracalna. Takie przełączenie jest możliwe dzięki istnieniu subkrytycznej bifurkacji Neimarka-Sackera, w której cykl graniczny traci swoją stabilność poprzez połączenie z niestabilnym torusem inwariantnym. Bardzo dobre omówienie analizowanych w modelu bifurkacji znajduje się w monografii

Yurija A. Kuznetsova, współtwórcy pakietu MATCONT, który umożliwił nam wyznaczenie diagramów bifurkacyjnych [28]. Dwuwymiarowy diagram bifurkacji w płaszczyźnie współczynników syntezy mRNA Wip1 i PTEN obejmuje trzy istotne rodzaje bifurkacji: Hopfa, siodło-węzeł i Neimarka-Sackera. Układ oscyluje w obszarze parametrów na prawo od linii bifurkacji Hopfa, tzn. oscylacje mogą wynikać albo ze wzrostu syntezy Wip1, albo zmniejszenia syntezy PTEN. Linie bifurkacji dzielą płaszczyznę na podobszary charakteryzujące się różnymi typami zachowań układu: monostabilnością, bistabilnością i oscylacjami periodycznymi. Bistabilność występuje w obszarze pomiędzy dwiema liniami bifurkacji siodło-węzeł.

Moduł wstrzymania cyklu komórkowego – bistabilność odwracalna. Moduł ten kontrolowany jest przez $p53_{ARRESTER}$. Fosfoforma $p53_{ARRESTER}$ indukuje syntezę p21. p21 wiąże i hamuje cyklinę E (CycE), która odgrywa kluczową rolę w przejściu od fazy G1 do fazy S i jest rozważana w modelu jako znacznik progresji cyklu komórkowego. p21 jest obecna na niskim poziomie przez większość cyklu (tj. gdy większość CycE jest wolna). Wraz ze wzrostem poziomu p21 zmniejsza się frakcja wolnej CycE (co prowadzi do defosforylacji Rb1 i inhibicji E2F1). Dla pewnego poziomu p21 układ szybko przechodzi do stanu, w którym większość E2F1 jest inhibowana oraz poziom CycE jest bliski zera (rys. 22.12b).



Rys. 22.12. Schemat i diagram bifurkacji modułu wstrzymania cyklu komórkowego. a) Białka indukujące zatrzymanie cyklu komórkowego są przedstawione w zielonych polach, białka wzbudzające cykl komórkowy – w niebieskich, inne białka lub kompleksy białkowe – w szarych. Pogrubione 'P' oznacza sfosforylowane rezydium białka. Konwencja strzałek jest taka sama jak na rys. 22.10. b) Diagram bifurkacyjny CycE vs. $p53_{ARRESTER}$ (parametr bifurkacyjny). Linie ciągłe i przerywane odpowiadają stabilnym i niestabilnym stanom stacjonarnym. SN_1 i SN_2 oznaczają bifurkacje siodło-węzeł. 1^+ oraz 0^+ oznaczają liczbe wartości własnych z dodatnimi częściami rzeczywistymi dla odpowiednio niestabilnego oraz stabilnych stanów ustalonych.

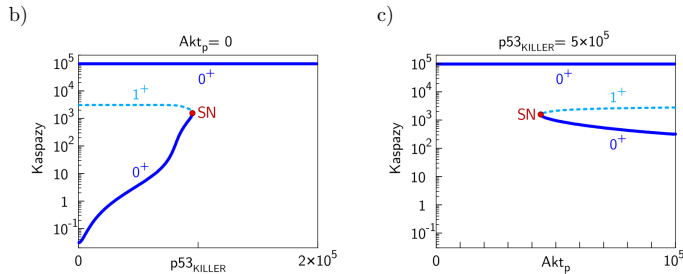
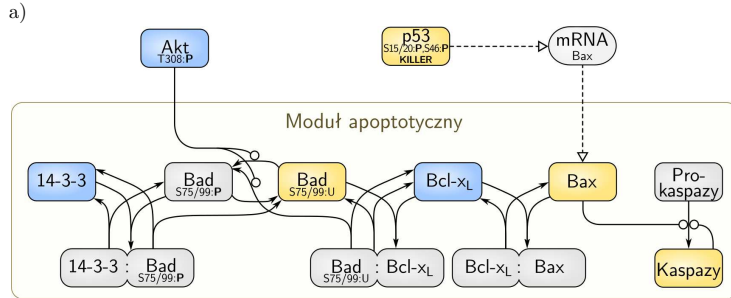
Moduł wstrzymania cyklu komórkowego wprowadza bistabilność dla pewnego zakresu poziomów $p53_{ARRESTER}$ (rozważanego jako parametr bifur-

kacyjny) i umożliwia wyjście z cyklu komórkowego i powrót do niego na zasadzie przełącznika (rys. 22.12b). Niski poziom $p53_{ARRESTER}$ odpowiada wysokiemu poziomowi CycE, przy którym komórka może przejść przez fazę cyklu komórkowego. Wraz ze wzrostem poziomu $p53_{ARRESTER}$, poziom CycE maleje do momentu, gdy stan stabilny straci stabilność w punkcie bifurkacji siodło-węzeł; wtedy układ przełącza się na niższy stabilny stan stały, w którym cykl komórkowy zatrzymuje się. Gdy wysoki poziom $p53_{ARRESTER}$ obniża się, układ przechodzi bifurkację i komórka powraca do cyklu komórkowego.

Moduł apoptotyczny – bistabilność nieodwracalna. Moduł ten jest kontrolowany przez $p53_{KILLER}$, który aktywuje transkrypcję pro-apoptycznego białka Bax, oraz przez Akt, który hamuje apoptozę przez fosforylację białka 14-3-3. W tym module rozważamy dwa typy parametrów wejściowych związane z występowaniem dwóch efektów: pro-przeżyciowego, który nasila się wraz z poziomem fosforylowanego Akt (Akt_p), oraz pro-apoptycznego, który nasila się wraz z poziomem $p53_{KILLER}$. Akumulacja $p53_{KILLER}$ powoduje akumulację Bax. Komórki nieapoptyczne charakteryzują się stosunkowo wysokim poziomem Akt_p oraz brakiem lub bardzo niskim poziomem $p53_{KILLER}$. W komórkach tych nie dochodzi do apoptozy, ponieważ Bax zostaje zneutralizowany poprzez sekwestrację przez pro-przeżyciowy Bcl- x_L . Jest to możliwe, ponieważ inne białko pro-apoptyczne, Bad, które może wiązać Bcl- x_L , jest nadal fosforylowane przez Akt_p i sekwestrowane przez białko pro-przeżyciowe 14-3-3. Defosforylacja Akt (uważana tutaj za sygnał pro-apoptyczny) prowadzi do defosforylacji Bad i jego uwolnienia z kompleksu z 14-3-3. Następnie Bad wiąże się z Bcl- x_L wypierając Bax, co prowadzi do aktywacji kaspaz i apoptozy.

Do analizy bifurkacyjnej modułu apoptotycznego wybraliśmy jako parametry bifurkacyjne $p53_{KILLER}$ i Akt_p (rys. 22.13b i 22.13c). Model przewiduje, że dla bardzo niskiego poziomu Akt_p oraz odpowiednio niskiego poziomu $p53_{KILLER}$ komórka może pozostawać zarówno w stabilnym stanie apoptotycznym, jak i w stabilnym stanie przeżyciowym, charakteryzującymi się odpowiednio wysokim i niskim poziomem kaspaz. Apoptotyczny przełącznik (aktywacja kaspaz) następuje w punkcie bifurkacji siodło-węzeł gdzie znika stabilny stan przeżyciowy (istnieje tylko stan apoptotyczny). Dla wysokiego poziomu $p53_{KILLER}$ oraz odpowiednio wysokiego poziomu Akt_p układ wykazuje bistabilność.

Najważniejszą różnicą pomiędzy dynamiką modułu zatrzymania cyklu a modulem apoptozy jest to, że ta pierwsza oparta jest na odwracalnej bistabilności i obejmuje jeden sygnał wejściowy, $p53_{ARRESTER}$, którego poziom jest wystarczająco wysoki, aby zatrzymać cykl komórkowy, podczas gdy poziom $p53_{KILLER}$ nie przekracza progu apoptotycznego. Z kolei indukcja apoptozy wymaga obecności dwóch sygnałów jednocześnie (wzrostu



Rys. 22.13. Schemat i diagram bifurkacji modułu apoptotycznego. a) Białka pro-przeżyciowe przedstawione są w niebieskich polach, białka pro-apoptyczne – w żółtych, inne białka lub kompleksy białkowe – w szarych. Oznaczenia strzałek są takie same jak na rys. 22.10. b) Diagram bifurkacji dla kaspazy vs. $p53_{KILLER}$ (parametr bifurkacji). c) Diagram bifurkacji dla kaspazy vs. Akt_p (parametr bifurkacji). Skala logarytmiczna na pionowych osiach w b) i c).

$p53_{KILLER}$ i zmniejszenia fosforylowanego Akt) i jest procesem nieodwracalnym, tzn. nie ma możliwości powrotu z apoptozy do stanu przeżycia (nawet jeśli $p53_{KILLER}$ spada do zera lub Akt_p rośnie do swojej maksymalnej wartości).

Rola pętli sprzężeń zwrotnych. Podjęcie jednoznacznej decyzji o losie komórki, przeżyciu lub śmierci, możliwe jest dzięki istnieniu licznych przeplatających się pętli sprzężeń zwrotnych obejmujących różne skale czasowe, dających początek szerokiemu spektrum zachowań. Sieci regulatorowe z ujemnymi pętlami sprzężeń zwrotnych mogą powodować oscylacyjne reakcje na stymulacje i umożliwiają adaptację do zmiany poziomu stymulacji. Istnienie dodatnich sprzężeń zwrotnych może z kolei prowadzić do bistabilności (lub wielostabilności).

W module głównym można wyróżnić ponad dziesięć pętli sprzężeń zwrotnych, z których następujące cztery pełnią kluczowe funkcje: dwie pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego (regulowane odpowiednio przez Mdm2 i Wip1) odpowiedzialne za oscylacje, oraz dwie antagonistyczne pętle dodatniego sprzężenia zwrotnego (regulowane odpowiednio przez Wip1 i PTEN) odpowiedzialne za bistabilność. Pętla ujemnej, w której pośredniczy Wip1, zapobiega gromadzeniu się $p53_{KILLER}$ (poprzez defosforylację $p53_{KILLER}$ do $p53_{ARRESTER}$), podczas gdy pętla dodatnia, w której pośredniczy PTEN, wspiera akumulację $p53_{KILLER}$. Pętla PTEN wynika z podwójnej negacji i obejmuje kilka substratów pośredniczących (PTEN, PIP2/PIP3, Akt, Mdm2), dlatego jej dynamika jest wolniejsza. W rezultacie nawet w komórkach ze znacznym uszkodzeniem DNA, akumulacja $p53_{KILLER}$ (a tym samym przejście do stanu apoptozy) trwa dłużej, co daje czas komórce na naprawę DNA. Jeśli DNA zostanie naprawione zanim sygnał przejdzie przez pętlę PTEN, komórka przeżyje. Jeśli jednak naprawa DNA trwa zbyt długo, zwycięża pętla sprzężenia zwrotnego z udziałem PTEN i komórka ulega apoptozie.

Rola Wip1 i PTEN – modelowanie rakowych linii komórkowych. Decyzja o przeżyciu lub śmierci komórki jest osiągnięta w wyniku interakcji dwóch antagonistycznych fosfataz, Wip1 i PTEN. Nasz model pokazuje, że wrażliwość na apoptozę wzrasta wraz z ekspresją PTEN i zmniejsza się wraz z ekspresją Wip1, co potwierdza funkcje pro-przeżyciowe Wip1 oraz funkcje pro-apoptyczne PTEN.

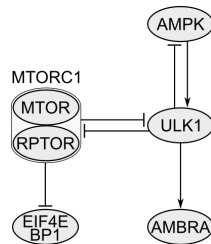
Analiza modelu pokazuje, dlaczego linie komórkowe wyprowadzone z linii rakowych, które charakteryzują się różnymi poziomami ekspresji fosfataz Wip1 i PTEN, wykazują szerokie spektrum odpowiedzi na uszkodzenie DNA: z szybkiego przejścia do wysokiego poziomu $p53_{KILLER}$ w komórkach z wysokim poziomem PTEN oraz niskim Wip1, do długotrwałych oscylacji poziomów $p53$ w komórkach ze zmetylowanym promotorem PTEN (np. linia komórkowa raka piersi MCF-7).

Jako że linie komórek nowotworowych mają różne poziomy ekspresji Wip1 i PTEN, spodziewamy się, że będą różnie reagować na napromieniowanie (różne nowotwory mają zróżnicowaną wrażliwość na radioterapię). Nasza analiza wskazuje, że skłonność komórek do apoptozy wywoływanej napromieniowaniem wzrasta wraz z poziomem ekspresji PTEN i maleje wraz z poziomem ekspresji Wip1. W szczególności przeprowadzona analiza wyjaśnia wysokie wskaźniki przeżycia napromieniowanych komórek MCF-7, dla których ekspresja Wip1 jest znacznie zwiększona, podczas gdy ekspresja PTEN jest zmniejszona [33, 34]. Ta linia komórkowa reaguje na wysoką dawkę napromieniowania poprzez długotrwałe oscylacje, pokazując, że nawet trwałe uszkodzenie DNA nie wywołuje apoptozy. Silna zależność krytycznej dawki napromieniowania od ekspresji PTEN i Wip1 może sugerować,

ze wstępne potraktowanie komórek nowotworowych (z funkcjonalnym p53) czasowo działającymi lekami w celu podwyższenia ekspresji PTEN lub w celu wyeliminowania ekspresji Wip1 może zwiększyć skuteczność radioterapii.

22.6.3. Sieć regulująca procesy autofagii i translacji

Ograniczenie dostępnych substancji odżywczych kieruje komórki do apoptozy. Innym typem odpowiedzi komórkowej w takich warunkach może być autofagia (zwana też autofagocytzą), polegająca na trawieniu przez komórkę mniej istotnych białek w celu uzyskania energii bądź odzyskania cząsteczek budulcowych, głównie aminokwasów. Komórki wdrażające program autofagii jednocześnie wstrzymują syntezę nowych białek. Wzajemne wykluczanie katabolicznej autofagii i anabolicznej translacji jest możliwe dzięki układowi regulatorowemu, którego dwa główne elementy, czyli sprzyjający translacji kompleks MTORC1 i uruchamiający autofagię ULK1, wzajemnie się inhibują (rys. 22.14). Proces translacji jest kontrolowany przez kinazę MTOR, która skompleksowana z RPTOR w MTORC1 fosforyluje represory translacji (takie jak czynnik EIF4EBP1 i kinaza S6K1), dezaktywując je. Uruchomienie autofagii przez kinazę ULK1 głównie polega na uwolnieniu związanego z cytoskieletem białka AMBRA1, które (wspomagając interakcję BECN1 z PIK3C3) uczestniczy w przestrzennej organizacji autofagosomów.



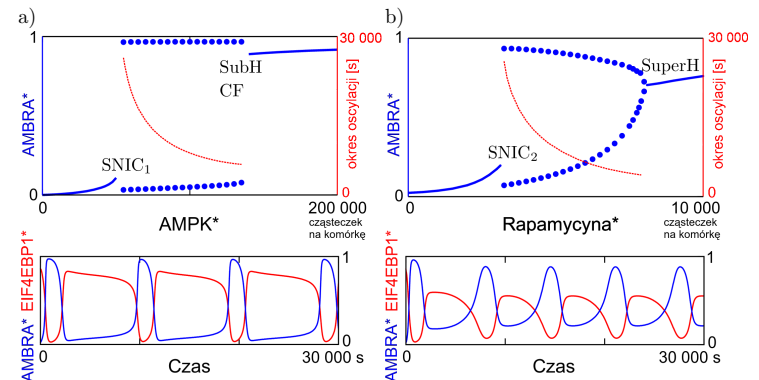
Rys. 22.14. Schemat przełącznika translacja-autofagia. Inhibicja EIF4BP1 wspomaga translację, zaś aktywacja AMBRA inicjuje autofagię.

Wspomniana wzajemna inhibicja mTORC1 oraz ULK1 wynika z ich aktywności kinazowej i bezpośredniej wzajemnej inhibitorowej fosforylacji. Fosforylacja RPTOR w MTORC1 przez ULK1 sprawia, że potencjalne substraty MTOR nie są rekrutowane do MTORC1. Z kolei ULK1 sfosforylowana przez mTOR nie wykazuje aktywności kinazowej i dodatkowo traci powinowactwo do kinazy AMPK. AMPK jest istotnym dla autofagii czujnikiem poziomu energii w komórce, którego aktywność kinazowa rośnie wraz

ze wzrostem proporcji AMP do ATP. Brak interakcji ULK1 i AMPK uniemożliwia aktywującą fosforylację ULK1 przez AMPK.

Gdy interakcja ULK1 i AMPK jest możliwa, ULK1 dezaktywując fosforyluje AMPK. W układzie regulatorowym z dotychczas omówioną wzajemną inhibicją wprowadza to dodatkowe sprzężenie zwrotne ujemne. Należy oczekiwać, że działa ono w skali czasowej wolniejszej aniżeli aktywacja ULK1 przez AMPK; w przeciwnym razie sprzężenie to uniemożliwiłoby ULK1 osiągnięcie dłuższego okresu pełnej aktywności, poważnie ograniczając możliwość zainicjowania programu autofagii.

Analiza modelu matematycznego [30] opisanej sieci interakcji pokazuje, że bez sprzężenia ujemnego ULK1-AMPK układ regulatorowy wykazuje bistabilność w szerokim zakresie poziomu aktywnego AMPK, który jest w modelu surogatem zapotrzebowania komórki na energię. Uwzględnienie relatywnie wolnego sprzężenia ULK1-AMPK powoduje oscylacje poziomów aktywnych białek o kilkugodzinnym okresie (rys. 22.15, dolne panele). Wysokiemu (niskiemu) poziomowi aktywnego białka AMBRA1 towarzyszy niski (wysoki) poziom aktywnego EIF4EBP1. Oscylacje te, mające charakter relaksacyjnego oscylatora, można interpretować jako odpowiadające następującym po sobie fazom, w których naprzemiennie stabilnie dominują trans-



Rys. 22.15. Diagramy bifurkacyjne (górny rząd) i oscylacje poziomów aktywnego białka AMBRA, oznaczonego AMBRA*, oraz aktywnego EIF4EBP1, oznaczonego EIF4EBP1*, w odpowiedzi na a) aktywację AMPK, AMPK* oraz b) rapamycynę związaną z pomocniczym białkiem FKBP1A, oznaczoną Rapamycyna*. Z wyjątkiem parametrów bifurkacyjnych, poziomy wszystkich białek są podane jako ułamek wszystkich cząsteczek danego rodzaju w komórce. Na diagramach a) i b) ciągle niebieskie linie oznaczają wartości stanów stacjonarnych, niebieskie linie kropkowane dolny i górny zakres oscylacji, a linia czerwona okres oscylacji, który logarytmicznie rozbiega do nieskończoności w punktach bifurkacji SNIC₁ i SNIC₂.

lacja (wysoki poziom aktywnego EIF4EBP1; faza dłuższa) oraz autofagia (wysoki poziom aktywnego AMBRA1; faza krótsza).

Co ciekawe, również w przypadku alternatywnej stymulacji rapamycyną – lekiem immunosupresyjnym, którego mechanizm działania polega na inhibicji MTOR – można zaobserwować oscylacyjne zachowanie modelowanego układu. W przeciwieństwie do oscylacji spowodowanych niskim poziomem ATP w komórce (czyli wysokim poziomem aktywnego AMPK), charakter oscylacji w przypadku stymulacji rapamycyną zdaje się nie mieć charakteru relaksacyjnego oscylatora (czasy trwania obu faz są zbliżone, a przebieg poziomów aktywnych białek jest bliższy sinusoidalnemu). Szczegółowa analiza bifurkacyjna układu pokazuje (rys. 22.15, górne panele), że gdy parametrem bifurkacyjnym jest aktywny AMPK, cykl graniczny powstaje/znika wskutek dwóch nielokalnych bifurkacji (typu SNIC oraz typu subkrytycznego punktu Hopfa z towarzyszącym mu CF (rys. 22.5), natomiast gdy parametrem bifurkacyjnym jest poziom rapamycyny, cykl graniczny powstaje/znika wskutek bifurkacji SNIC oraz bifurkacji nadkrytycznej Hopfa). Taka nietrywialna struktura dynamiczna modelowanego układu wynika z połączenia motywu dodatniego sprzężenia opartego na wzajemnej inhibicji (odpowiadającej podwójnej negacji) z pętlą sprzężenia zwrotnego ujemnego o dłuższej skali czasowej.

Z perspektywy fizjologii komórki w warunkach niedoboru aminokwasów przeplatające się fazy autofagii i translacji wydają się być logicznym rozwiązaniem. Niedobór składników budulcowych białek wstrzymuje translację, a proces autofagii umożliwia ich uzupełnienie. Wzrost poziomu aminokwasów umożliwia kontynuację translacji – procesu koniecznego do przetrwania komórki. Autofagia pełni również istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej, prowadząc do zamknięcia i trawienia patogenów w autofagosomach, które mogą tworzyć się z szorstkiej siateczki wewnątrzplazmatycznej po usunięciu z niej rybosomów. Co ciekawe, rybosomy znajdujące się na siateczce wykorzystywane są do syntezy białek wirusowych. A zatem uruchomienie autofagii zarówno blokuje syntezę białek wirusowych, jak i umożliwia ich degradację.

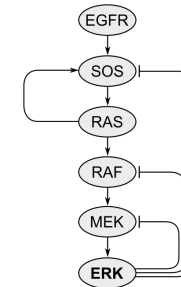
22.6.4. Sieć regulatorowa MAPK/ERK

Wspomniane w podrozdziale 22.5 motywy sprzężonych i odwracalnych reakcji, takich jak cykle fosforylacji–defosforylacji czy np. cykl GTP–az, są wykorzystywane w kluczowym szlaku sygnalizacyjnym używanym do stwierdzenia obecności i generowania odpowiedzi na czynniki wzrostu, czyli w ścieżce kinaz MAP (ang. *mitogen-associated protein kinase*). W stworzonym przez nas modelu [29], opartym na układzie równań różniczkowych zwyczajnych, uwzględniliśmy pętlę sprzężenia zwrotnego dodatniego między

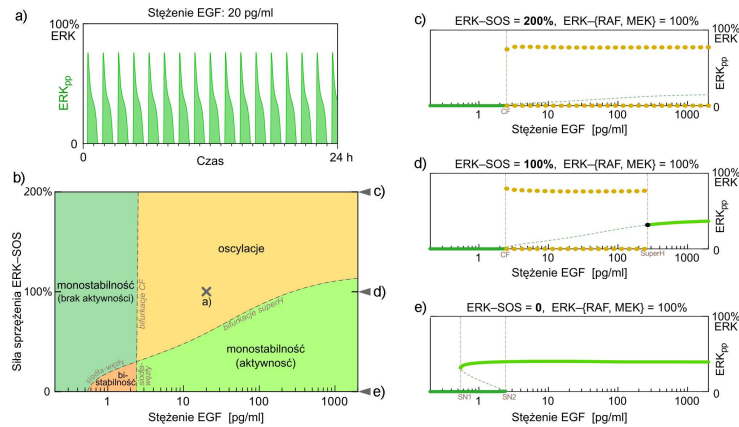
RAS i SOS oraz trzy pętle sprzężeń ujemnych inicjowane przez aktywną kinazę ERK i wyłączające MEK, RAF, oraz SOS (rys. 22.16). W oparciu o symulacje dynamiki sieci interakcji oraz analizę bifurkacyjną pokazano, że połączenie wymienionych pętli sprzężeń zwrotnych prowadzi do oscylacji poziomu aktywnego (czyli podwójnie sfosforylowanego) ERK (rys. 22.17). Taka dynamika ERK została zaobserwowana w eksperymentach na pojedynczych komórkach przeprowadzonych w grupie Johna Albecka (UC Davis) za pomocą szybkich bioczuJNIKÓW opartych na zależnej od fosforylacji translokacji jądrowej (ang. *kinase translocation reporter*, KTR) [35]. W zgodzie z wynikami eksperymentalnymi otrzymany model generuje oscylacje o częstotliwości zależnej od poziomu stymulacji receptora EGF (EGFR) i wrażliwe na poziom ekspresji EGFR.

Na podstawie modelu scharakteryzowano funkcjonalne znaczenie poszczególnych pętli sprzężeń w odniesieniu do ich topologicznej lokalizacji w sieci interakcji. W ten sposób pokazano, że pętla ujemnego sprzężenia od ERK do SOS oraz pętla dodatniego sprzężenia między RAS i SOS, która jest zlokalizowana wewnątrz tej pierwszej, są wystarczające do generowania obserwowanych relaksacyjnych oscylacji aktywnego ERK w odpowiedzi na stymulację EGF (rys. 22.17). Pokazaliśmy, że pozostałe dwie pętle sprzężeń ujemnych od ERK do MEK i od ERK do RAF, czyli białek znajdujących się w kaskadzie poniżej białek pętli sprzężenia dodatniego SOS-RAS, mają mniejsze znaczenie dla dynamiki układu, przejawiające się głównie w modulacji kształtu profilu czasowego aktywnego ERK.

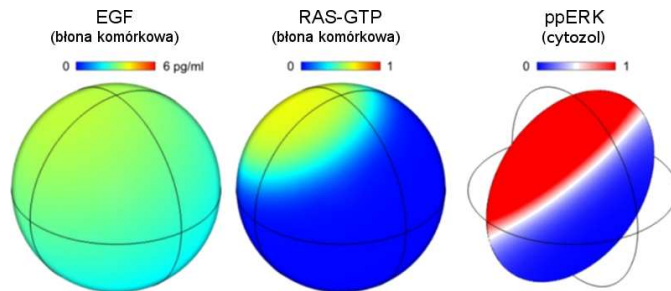
Konstruując model czasoprzestrzenny, przeanalizowaliśmy konsekwencje lokalizacji białek biorących udział w poszczególnych pętlach w różnych przedziałach subkomórkowych (rys. 22.18) [36]. Pokazaliśmy, że kombinacja szybkiego sprzężenia zwrotnego dodatniego między białkami wolno dyfun-



Rys. 22.16. Schemat układu regulatorowego kinaz MAP (MAPK). Między RAS i SOS występuje sprzężenie zwrotne dodatnie. ERK współtworzy aż trzy sprzężenia zwrotne ujemne, z których jedno angażuje SOS.



Rys. 22.17. Charakterystyka dynamiki modelu MAPK. a) Trajektoria oscylującego aktywnego (tj. podwójnie sfosforylowanego) białka ERK (czyli ERKpp) dla stymulacji komórki nabłonkowym czynnikiem wzrostu (EGF) o stężeniu 20 pg/ml, dla domyślnych parametrów opisujących siły sprzężeń zwrotnych. b) Diagram bifurkacyjny pokazujący możliwe zachowania układu w zależności od siły sprzężenia zwrotnego ERK_{pp}-SOS i stężenia EGF-u. c), d), e) Zachowania ERK_{pp} dla siły sprzężenia zwrotnego ujemnego ERK_{pp}-SOS dwa razy większej od domyślnej w modelu (c), dla domyślnej siły sprzężenia ERK_{pp}-SOS (d), przy wyłączeniu sprzężenia ERK_{pp}-SOS (e). Zielone pogrubione linie oznaczają stabilne stany stacjonarne, cienkie przerywane – niestabilne stany stacjonarne, a pomarańczowe kropki – zakres cyklu granicznego.



Rys. 22.18. Przestrzenny aspekt procesu aktywacji kaskady MAPK. W odpowiedzi na puls EGF (lewy panel) aktywowane jest błonowe białko Ras do formy Ras-GTP (środkowy panel), co prowadzi do podwójnej fosforylacji i tym samym aktywacji kinazy ERK w cytoplazmie (prawy panel).

dującymi na błonie komórkowej oraz powolnego ujemnego sprzężenia zwrotnego angażującego relatywnie szybciej dyfundujące białka cytozolu prowadzi do dynamiki lokalnego włączania/globalnego wyłączenia (ang. *local excitation/global inhibition*, LEGI). Jest to prawdopodobny mechanizm, dzięki któremu kaskada MAPK może zamieniać parakryne sygnały EGF, prowadzące do niejednorodnej na błonie komórkowej aktywacji (i nanoklasteryzacji) RAS, w niejednorodne pulsy cytozolowej aktywności ERK.

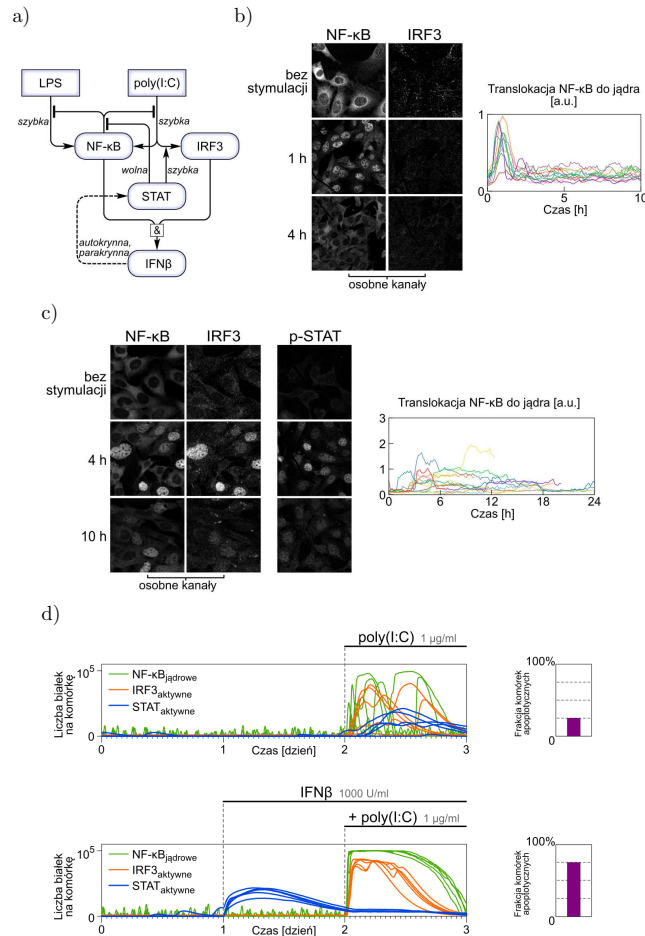
22.7. Eksperymenty i modelowanie w sygnalizacji immunologicznej

W ciągu ostatnich lat przeprowadziliśmy serię eksperymentów, w których analizowaliśmy odpowiedź komórek na analog wirusowego materiału genetycznego, poly(I:C), oraz na bakteryjne lipopolisacharydy (LPS). Na podstawie tych badań skonstruowaliśmy matematyczny model nieswoistej odpowiedzi immunologicznej [37]. Najważniejsze interakcje uwzględnione w modelu zostały przedstawione na schemacie sieci regulatorowej, rys. 22.19a.

Łącząc techniki eksperymentalne i stochastyczne symulacje modelu, wykazaliśmy, że sprzężenia zwrotne pomiędzy ścieżkami IRF3, NF- κ B i STAT prowadzą do binarnej odpowiedzi na poly(I:C) oraz dynamicznie odmiennej, pulsowej odpowiedzi na LPS, rys. 22.19b i 22.19c. W odpowiedzi na LPS aktywowana jest ścieżka NF- κ B, natomiast w odpowiedzi na poly(I:C) aktywowana jest zarówno ścieżka NF- κ B, jak i IRF3. Jednoczesna aktywacja obu ścieżek jest konieczna do syntezy interferonu β (IFN β), który następnie aktywuje ścieżkę STAT. STAT z kolei stabilizuje aktywację NF- κ B i IRF3, rys. 22.19c. Część komórek w odpowiedzi na infekcję wydziela IFN β , który przygotowuje sąsiednie komórki do szybkiej odpowiedzi na kontakt z wirusem. Komórki te szybciej ulegają apoptozie, co ogranicza rozprzestrzenianie się wirusa, rys. 22.19d. W ten sposób odpowiedź jest koordynowana na poziomie populacji komórek.

Eksperymenty zostały przeprowadzone na dzikich oraz zmodyfikowanych mysich embrjonalnych fibroblastach (MEF). Modyfikacje polegały bądź na nokautach: podjednostki RelA NF- κ B lub genu STAT1, bądź na wprowadzeniu do genomu komórek z nokautem RelA zmodyfikowanego genu kodującego białko fuzyjne RelA-GFP. Zostały zbadane odpowiedzi komórek na trzy rodzaje stymulacji: LPS, poly(I:C) oraz poly(I:C) po wcześniejszej prestymulacji IFN β . Przeprowadziliśmy również eksperymenty, w których zostały zablokowane receptory interferonu.

Na podstawie wyników przeprowadzonych eksperymentów zbudowaliśmy model układu w postaci procesu Markowa. Do symulacji stochastycznych według algorytmu Gillespiego oraz analizy deterministycznej procesu



Rys. 22.19. Model nieswoistej odpowiedzi immunologicznej [37]. a) Schemat sieci regulatorowej. Ostre groty strzałek oznaczają interakcje aktywujące, tępe – dezaktywujące. Ujemne sprzężenia zwrotne, w których uczestniczy NF-κB, są osłabiane przez sygnalizację IFNβ-STAT. b) Immunostaining i obrazy przyżyciowe pokazujące pulsową aktywację NF-κB w odpowiedzi na LPS. c) Binarna aktywacja NF-κB i IRF3 w odpowiedzi na poly(I:C) jest stabilizowana przez autokrynną sygnalizację STAT. d) Symulacje modelu matematycznego. 24-godzinna prestymulacja IFNβ zwiększa poziom aktywacji NF-κB i IRF3 oraz frakcję komórek apoptotycznych.

użyliśmy programu BioNetGen. W modelu uwzględniliśmy 19 genów następujących białek: IκBα, A20, IFNβ, PKR, OAS1A, IRF7, STAT1, STAT2, RIG-I, SOCS1, TNFα, IL6, RANTES, CCL2, ISG54, ISG56, IRF1, IRF5, ISG15, ich transkrypty, 4 typy receptorów: TLR4, RIG-I, MAVS, IFNAR, oraz 13 innych białek: SOCS1, TBK1, TAK1, TRAF3, A20, IKK, PKR, OAS1A, IκBα, NF-κB, IRF3, STAT1, STAT2. W modelu zostały uwzględnione także różne stopnie fosforylacji, translokacja czynników transkrypcyjnych między jądrem a cytoplazmą oraz procesy homo- i heterodimeryzacji. Uwzględnione zostały również trzy typy stymulacji: LPS, poly(I:C) oraz poly(I:C) po wcześniejszej prestymulacji IFNβ. Rozważaliśmy także przypadek zablokowanych receptorów interferonu.

Do parametryzacji modelu zostały wykorzystane pomiary populacyjne poziomów mRNA przy użyciu RT-PCR i dPCR. Na podstawie wyników RT-PCR, metodą $\Delta\Delta C_T$, otrzymaliśmy relatywne zmiany poziomów mRNA dla wszystkich typów stymulacji w kilku punktach czasowych. Pomiary uzyskane przy pomocy dPCR dla wybranych punktów czasowych pozwoliły na przeliczenie uzyskanych wcześniej wartości $\Delta\Delta C_T$ dla wszystkich punktów czasowych i wszystkich typów stymulacji na liczby cząsteczek mRNA na komórkę. Dynamika zmian poziomu i aktywacji białek w populacji komórek oraz translokację jądrową IRF3 i NF-κB (średnie populacyjne) zostały zmierzone metodą Western blot po uprzednim rozdzieleniu na część jądrową i cytoplazmatyczną, z użyciem przeciwciał specyficznych dla natywnych i sfosforylowanych form białek. Natomiast technika immunostaining dla utrwalonych komórek oraz badania przyżyciowe na komórkach z fuzyjnym białkiem RelA-GFP pozwoliły określić dynamikę translokacji NF-κB i IRF3 do jądra oraz aktywację STAT1 w pojedynczych komórkach, rys. 22.19b i 22.19c. Do parametryzacji modelu wykorzystaliśmy również pomiary populacyjne poziomu IFNβ uzyskane metodą ELISA. Pomiary częstości apoptozy porównywaliśmy z częstością aktywacji obu ścieżek: NF-κB i IRF3, rys. 22.19d.

Dla wszystkich rozważanych typów stymulacji oraz w przypadku zablokowanych receptorów interferonu uzyskaliśmy dobrą zgodność odpowiedzi w modelu z wynikami eksperymentów. Uwzględnione w modelu sprzężenia i interakcje pomiędzy białkami wyjaśniają obserwowaną w eksperymentach dynamikę odpowiedzi zarówno na infekcję wirusową, jak i bakteryjną.

Modelowanie tak złożonych szlaków sygnałowych jest niezwykle pracochłonne zarówno w sensie budowy modelu jak i projektowania doświadczeń potwierdzających lub falsyfikujących model. Można też spotkać się z poglądem, że prawie każdy z mechanizmów zawartych w modelu jest już znany. Jednak tylko synteza tych wszystkich mechanizmów pozwala na poznanie odpowiedzi systemu na różne warianty bodźców, oraz na refleksję dotyczącą funkcji układu biologicznego i jego ewolucji.

22.8. Podsumowanie

Powyższy rozdział jest subiektywnym omówieniem modelowania procesów regulatorowych w komórkach w odpowiedzi na stres. Celem opracowania było nie tyle obiektywne przedstawienie obecnego stanu nauki światowej, ile uwypuklenie aspektów modelowania, które wydają się autorom najważniejsze, i zilustrowanie ich badaniami prowadzonymi w naszej pracowni we współpracy zagranicznej.

Konstrukcja modeli matematycznych jest jedną z metod zrozumienia sygnalizacji komórkowej. Zazwyczaj uważa się, że dane eksperymentalne mogą służyć do weryfikacji poprawności modeli, niemniej jednak często model waliduje dane bądź umożliwia interpretację serii eksperymentów. Zbiór wniosków z danych, niepołączonych spójną teorią ilościową, pozostaje tylko zbiorem eksperymentalnie uprawdopodobnionych hipotez.

Odpowiedź na stres stanowi część procesów regulatorowych, które utrzymują homeostazę komórki. Ta część jest zarówno niezwykle interesująca, jak i istotna z medycznego punktu widzenia. Procesy obrony odpornościowej, karcinogenezy, apoptozy, autofagii, a nawet podziału komórkowego mogą być analizowane jako odpowiedź na stres, o podłożu wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowym. W naszym rozumieniu istotą odpowiedzi komórkowej jest zebranie informacji i przypisanie tej informacji zdefiniowanemu odpowiedzium fizjologicznym. Przypisanie to może nie oznaczać deterministycznej relacji. Wręcz przeciwnie, w organizmie wielokomórkowym częstą strategią jest różnicowanie odpowiedzi w populacji komórek. Jest to możliwe dzięki szumowi molekularnemu i mechanizmom wzmocnienia sygnału. Heterogenność odpowiedzi powoduje konieczność prowadzenia badań eksperymentalnych na pojedynczych komórkach oraz zastosowania procesów stochastycznych w celu prawidłowej interpretacji zjawisk.

Bibliografia

1. Alberts B., Bray D., Hopkin K.: Podstawy biologii komórki. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2005.
2. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: Biochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009.
3. Murray J.D.: Mathematical biology: I: An introduction. Springer, 2002.
4. Forys U.: Matematyka w biologii. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2005.
5. Van Kampen N.G.: Stochastic processes in physics and chemistry. North Holland, 2007.
6. Godfrey K.: Compartmental models and their application. Academic Press, 1983.

7. Feller W.: Wstęp do rachunku prawdopodobieństwa. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.
8. Gillespie D.T.: Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J. Phys. Chem.*, 81(25), 1977, s. 2340–2361.
9. Gillespie D.T.: Approximate accelerated stochastic simulation of chemically reacting systems. *J. Chem. Phys.*, 115(4), 2001, art. 1716.
10. Faeder J.R. i in.: Rule-based modeling of biochemical systems with BioNetGen. *Methods Mol. Biol.*, 500, 2009, s. 113–167.
11. Pineda-Krch M.: GillespieSSA: implementing the stochastic simulation algorithm in R. *J. Stat. Softw.*, 25(12), 2008, s. 1–18.
12. Maarleveld F.J. i in.: StochPy: a comprehensive, user-friendly tool for simulating stochastic biological processes. *PLoS ONE*, 8(11), 2013, art. e79345.
13. Kočańczyk M. i in.: Stochastic transitions in a bistable reaction system on the membrane. *J. R. Soc. Interface*, 10(84), 2013, art. 20130151.
14. Kočańczyk M. i in.: Spatkin: a simulator for rule-based modeling of biomolecular site dynamics on surfaces. *Bioinformatics*, 33(22), 2017, s. 3667–3669.
15. Andrews S.S.: Smoldyn: particle-based simulation with rule-based modeling, improved molecular interaction, and a library interface. *Bioinformatics*, 33, 2017, s. 710–717.
16. Lis M. i in.: Efficient stochastic simulation of reaction–diffusion processes via direct compilation. *Bioinformatics*, 25, 2009, s. 2289–2291.
17. Schaff J.C. i in.: Rule-based modeling with virtual cell. *Bioinformatics*, 32, 2016, s. 2880–2882.
18. Sorokina O. i in.: A simulator for spatially extended kappa models. *Bioinformatics*, 29, 2013, s. 3105–3106.
19. Barua D. i in.: A computational model for early events in B cell antigen receptor signaling: analysis of the roles of Lyn and Fyn. *J. Immunol.*, 189(2), 2012, s. 646–658.
20. Varga A. i in.: RAF1/BRAF dimerization integrates the signal from RAS to ERK and ROK α . *Sci. Signal*, 10(469), 2017, art. eaai8482.
21. Alon U.: An introduction to systems biology: design principles of biological circuits. Chapman & Hall/CRC, 2007.
22. Lipniacki T. i in.: Single TNF α trimers mediating NF-kappaB activation: stochastic robustness of NF-kappaB signaling. *BMC Bioinformatics*, 8, 2007, art. 376.
23. Tay S. i in.: Single-cell NF- κ B dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature*, 466, 2010, s. 267–271.
24. Hoffmann A. i in.: The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*, 298(5596), 2002, s. 1241–1245.

25. Geva-Zatorsky N. i in.: Oscillations and variability in the p53 system. *Mol. Syst. Biol.*, 2, 2006, art. 2006.0033.
26. Altan-Bonnet G., Germain R.N.: Modeling T cell antigen discrimination based on feedback control of digital ERK responses. *PLoS Biol.*, 3(11), 2005, art. e356.
27. Lipniacki T. i in.: Stochastic effects and bistability in T cell receptor signaling. *J. Theor. Biol.*, 254, 2008, s. 110–122.
28. Kuznetsov Y.: *Elements of applied bifurcation theory*. Springer, 1998.
29. Kochańczyk M. i in.: Relaxation oscillations and hierarchy of feedbacks in MAPK signaling. *Sci. Rep.*, 6, 2017, art. 38244.
30. Szymańska P. i in.: Computational analysis of an autophagy/translation switch based on mutual inhibition of mTORC1 and ULK1. *PLOS One*, 10(3), 2015, art. e0116550.
31. Hat B. i in.: Feedbacks, bifurcations, and cell fate decision-making in the p53 system. *PLOS Comput. Biol.*, 12(2), 2016, art. e1004787.
32. Pękalski J. i in.: Spontaneous NF- κ B activation by autocrine TNF α signaling: A computational analysis. *PLOS One*, 8(11), 2013, art. e78887.
33. Li J. i in.: Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23. *Nat. Genet.*, 31, 2002, s. 133–134.
34. Khan S. i in.: PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int. J. Cancer.*, 112, 2004, s. 407–410.
35. Albeck J.G. i in.: Frequency-modulated pulses of ERK activity transmit quantitative proliferation signals. *Mol. Cell*, 49(2), 2013, s. 249–261.
36. Kholodenko B.N., Hancock J.F., Kolch W.: Signalling ballet in space and time. *Net. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11(6), 2010, s. 414–26.
37. Czerkies M. i in.: Cell fate in antiviral response arises in the crosstalk of IRF, NF- κ B and JAK/STAT pathways. *Nat. Commun.* (w druku).